

## **1 Einleitung**

### **1.1 Immunüberwachung von Tumorwachstum**

Obwohl es Rudolf Virchow bereits 1863 gelang, Leukozyten-Infiltrate im Tumorgewebe nachzuweisen (Übersicht in Mantovani et al. 1992), so war es doch erst Paul Ehrlich, der - als einer der ersten Wissenschaftler - 1909 die Hypothese einer körpereigenen Tumorbekämpfung postulierte. Wenn Ehrlich vor fast 100 Jahren noch keine tumorspezifische Immunantwort vermutete, so leitete er dennoch aus Tierversuchen ab, daß der „Virulenz von Tumorzellen“ „Schutzvorrichtungen des Organismus“ entgegenwirken können. Je nach Stärke einer der beiden Komponenten stehen entweder Tumorwachstum oder Tumorelimination im Vordergrund. Nachdem es - parallel zu den Erfolgen der Strahlentherapie und der Chemotherapie - viele Jahrzehnte relativ still um dieses Thema war, gibt es gerade in neuerer Zeit zahlreiche Hinweise dafür, daß das Immunsystem die Entstehung maligner Erkrankungen überwachen und bekämpfen kann (so genannte Immunosurveillance bzw. Immunoediting - zusammengefaßt in Smyth et al. 2001a und Dunn et al. 2002).

Die Hypothese einer Immunüberwachung von Tumoren wird durch verschiedene Befunde, wie Spontanremissionen, Korrelation von Immunalteration und Tumorentstehung, sowie Berichte zur Korrelation von tumorgerichteten Immunantworten und Tumorregression, gestützt. Spontanremissionen sind für eine Vielzahl von malignen Erkrankungen beschrieben, darunter z. Bsp. für das kolorektale Karzinom (KRK) (Beechey et al. 1986), das Mammakarzinom (MK) (Übersicht in Larsen et al. 1999), das Melanom (Mackensen et al. 1994), die akute myeloische Leukämie (AML) (Tzankov et al. 2001) und für Lungen- und Lebermetastasen eines resezierten nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinoms (NSCLC) (Kappauf et al. 1997). Es ist bekannt, daß immunsupprimierende Erkrankungen sowie eine immunsuppressive Medikation das Risiko erhöhen, eine maligne Erkrankung zu entwickeln: So beschrieben Starzl et al. (1984) z. Bsp. sowohl die Induktion von malignen Lymphomen bei organtransplantierten Patienten unter post-operativer Steroid-Therapie als auch die vollständige Rückbildung dieser Lymphome nach Absetzen der immunsuppressiven Medikation. Es besteht zudem eine Korrelation zwischen immunologischen Dysfunktionen und der Entstehung von malignen Erkrankungen, wie z. Bsp. durch den Nachweis HIV-

assoziierter Lymphome gezeigt werden konnte (Levine et al. 1994; Übersicht in Boshoff & Weiss 2002).

Andere immunologische Dysfunktionen wie molekulare T-Zell-Veränderungen und verminderte Zytokin-Produktion (IL-2) (Zea et al. 1995), reduzierte Expression von Signalmolekülen auf antigenpräsentierenden Zellen (Schmielau et al. 2001) oder die Induktion von T-Zell-Anergie durch fehlende Kostimulation bei der Antigenpräsentation (Guinan et al. 1994) scheinen ebenfalls das Auftreten von malignen Erkrankungen zu begünstigen. Darüber hinaus wurden erhöhte Apoptose-Raten von Immunzellen (Schmielau et al. 2001) und erniedrigte absolute T-Zell-Zahlen im peripheren Blut von KRK-Patienten (Hernandez et al. 1978) als tumorbegünstigende Faktoren beschrieben.

Daneben ergeben sich Hinweise für eine Immunantwort gegen Tumoren aus dem Vorkommen zytotoxischer T-Zell-Infiltrate im Tumorgewebe und einer damit einhergehenden Tumorregression (Mackensen et al. 1994), sowie für den Nachweis spontaner tumorspezifischer humoraler (Disis et al. 1994 a + 1997 + 2000a; Ward et al. 1999) und zellulärer Immunantworten im peripheren Blut von Patienten mit verschiedenen Tumoren, wie dem KRK (Nagorsen et al. 2000), Melanom (Pittet et al. 1999; Lee et al. 1999; Letsch et al. 2000), Neuroblastom (Rodolfo et al. 2003) und der AML (Scheibenbogen et al. 2002).

## **1.2 Immuntherapie von Tumoren**

Mit dem Nachweis von Immunantworten gegen Tumoren wuchs das Interesse, das Immunsystem auch gezielt therapeutisch zu nutzen, um gegen maligne Erkrankungen vorzugehen. Erste Untersuchungen zur "adoptiven Immuntherapie" wurden bereits 1958 von De Vries unternommen, gefolgt von Mathé 1965, der nachweisen konnte, daß mit dem Transfer immunkompetenter Zellen bei Knochenmarkstransplantationen nicht nur eine "Graft-versus-Host", sondern auch eine "Graft-versus-Leukaemia"-Reaktion vermittelt werden konnte. Die Weiterentwicklung dieses Konzepts beinhaltet den adoptiven Transfer von ex vivo aktivierten, tumorinfiltrierenden Lymphozyten (TIL) (Schiltz et al. 1997) oder lymphokin-aktivierten Killerzellen (LAK) (Rosenberg et al. 1986). Diese ex-vivo-Aktivierung geschieht, indem die Lymphozyten entweder mit autologen bzw. allogenen Tumorzellen oder mit synthetischen Peptid- bzw. Protein-Bestandteilen von Tumor-assoziierten Antigenen (TAA) in vitro inkubiert werden. Zusätzlich erfolgt eine Stimulation durch Zytokine, wie IL-

2, GM-CSF, IL-4, oder IL-7 (Rosenberg et al. 1986 + 1988; Goedegebuure et al. 1995; Chang et al. 1997; Plautz et al. 1999; Knutson et al. 2002). Auf diese Weise generierten Verdegaal et al. 1999 bei einer MK-Patientin verschiedene Klone zytotoxischer T-Zellen (CTL), die in Abhängigkeit von der Stimulator-Zell-Linie entweder weitläufige Reaktivität gegen HLA-A\*0201-positive Tumorzellen verschiedenen Ursprungs - MK, Nierenzellkarzinom (RCC), malignes Melanom - aufwiesen, oder deren antitumorale Reaktivität auf die Stimulator-Zell-Linie beschränkt war. In beiden Fällen lysierten die CTL keine normalen Zellen aus Brust- oder Nierengewebe, sondern waren tumorzellspezifisch.

Ein weiterer immuntherapeutischer Ansatz besteht in der direkten Verabreichung von Zytokinen. Mehrere Arbeitsgruppen konnten deutliche immunmodulatorische Effekte von IL-2 allein (Rosenberg 2001) oder IL-2 in Kombination mit weiteren Zytokinen, wie IL-12 oder GM-CSF, bei Patienten mit Melanom, MK und anderen nachweisen (Legha et al. 1997; Keilholz et al. 1998, Molto et al. 1999, Meehan et al. 2001, Sosemann et al. 2001). Des Weiteren wurden klinische Erfolge mit IFN- $\gamma$  (Aulitzky et al. 1989), IFN- $\gamma$  (Pavone et al. 2001) und TNF- $\alpha$  (Lienard et al. 1992) bei Patienten mit RCC, Melanom und Sarkomen verzeichnet, sowie die Induktion von tumorspezifischen CTL durch IL-18 in Kombination mit dendritischen Zellen und natürlichen Killerzellen erreicht (Tanaka et al. 2000).

Ein weiteres Beispiel für eine effiziente Immunmodulation bei Tumorpatienten ist der Einsatz bakterieller Substanzen (Übersicht in Nagorsen et al. 2002b). BCG (Bacille Calmette Guérin) ist die wohl häufigst eingesetzte und klinisch effizienteste unspezifische Immuntherapie unter der Verwendung von Bakterien. Es wird seit Jahrzehnten erfolgreich beim Blasenkarzinom eingesetzt, wo es lokal eine unspezifische zelluläre Immunantwort induziert, die antitumoral aktiv ist (Saint et al. 2000; Prescott et al. 2000; van der Meijden et al. 2001; Amling et al. 2001). Auf diese Weise können 80% der Carcinomata in situ eradiziert und die Rezidivraten um 43% gesenkt werden (Amling et al. 2001).

Eine neuere Therapie-Strategie stellt die "aktive spezifische Immuntherapie" (ASI) dar, die im Sinne einer aktiven Impfung wirkt und die Aktivierung einer spezifischen tumorgerichteten Immunantwort zum Ziel hat. Als ASI im engeren Sinne wird eine Impfung mit autologen Tumorzellen verstanden. Vermorken et al. kombinierten die Administration von autologen

Tumorzellen mit der gleichzeitigen Gabe von BCG bei Patienten mit KRK und konnten damit vor allem Erfolge bei Stadium II erzielen und hier die Rezidivrate um 61% senken (Vermorken et al. 1999). Seit vielen Jahren untersucht man die Verabreichung ganzer Tumorzellen oder Tumorzell-Lysate. Neben Vakzine-Präparationen aus reinen Tumorzellen wurden auch Hybride aus Tumorzellen und antigenpräsentierenden Zellen als Impfstoffe entwickelt, mit dem Ziel, die Effizienz von Tumorzell-Vakzinen zu steigern (Dunnion et al. 1999). Umstritten ist in diesem Zusammenhang die Studie von Kugler et al. (2000), in der die Verabreichung von Hybriden aus autologem Tumor und heterologen dendritischen Zellen zu einer Ansprechrate von 40% bei Patienten mit Nierenzellkarzinomen führte.

Ein wichtiger Schritt bei der Weiterentwicklung von Vakzinierungsstrategien war die Charakterisierung von TAA. Seit Beginn der neunziger Jahre sind zahlreiche TAA für verschiedene Tumorentitäten beschrieben worden, wie z. Bsp. MAGE, MelanA/MART-1, Tyrosinase, Ep-CAM, her-2/neu und CEA (van der Bruggen et al. 1991; Boon & van der Bruggen 1996; Übersicht in Coulie et al. 1999). Es wurden effektive Strategien entwickelt, um TAA zu identifizieren, die von spezifischen T-Zellen erkannt werden. Dies führte zur Charakterisierung von verschiedenen TAA-Gruppen mit mittlerweile über 60 MHC-Klasse-I-relevanten TAA (Renkvist et al. 2001). Dies ermöglichte schließlich die Entwicklung spezifischer TAA-Vakzine aus synthetischen Proteinen oder Peptiden (Übersicht in Scheibenbogen et al. 2003). Darüber hinaus wurden damit Zielstrukturen für passive Immuntherapien, wie z. Bsp. Antikörper-Therapien, definiert. Immunisierungsversuche in Maus-Modellen haben entscheidend dazu beigetragen, wichtige Erkenntnisse zur Entwicklung von anti-Tumor-Vakzinen zu gewinnen. So konnten durch den Einsatz von Peptid-, Protein- oder DNA-Vakzinen und den Einsatz ganzer Zell-Vakzine mehrfach Tumor-Abstoßungsreaktionen beobachtet werden (Katsumata et al. 1995; Essermann et al. 1999; Amici et al. 1998 + 2000; Dakappagari et al. 2000; Cefai et al. 1999; Reilly et al. 2000 + 2001; Ercolini et al. 2003). Darüber hinaus konnten im Tierversuch durch diese Vakzine sogar peptidspezifische humorale und zelluläre (CD4+ und CD8+ T-Zellen) Immunantworten induziert werden. Diese richteten sich gegen die TAA Ep-CAM (Ras et al. 1997), her-2/neu (Cefai et al. 1999; Dakappagari et al. 2000; Reilly et al. 2000 + 2001) und CEA (Ras et al. 1997; Kass et al. 1999; Grosenbach et al. 2001).

Die Erforschung der Tumorimmunologie beim Menschen beruht zum größten Teil auf Untersuchungen am malignen Melanom, das als hoch immunogener Tumor gilt. Die meisten

Daten zu Vakzinierungsstrategien liegen daher für das maligne Melanom vor (Valmori et al. 2002 b; Übersicht in Scheibenbogen et al. 2003). Aber auch bei MK-Patientinnen (Disis et al. 1999 + 2000 b + 2002; Braun et al. 1999; Jiang et al. 2000; Arlen et al. 2000) und KRK-Patienten (Tsang et al. 1997; Arlen et al. 2000; Staib et al. 2001) sind durch den Einsatz von Peptid-, Protein- oder DNA-Vakzinen bereits TAA-spezifische humorale und zelluläre Immunantworten gegen Ep-CAM, her-2/neu und CEA induziert worden (s. auch Übersicht in Scheibenbogen et al. 2003).

Eine große Bedeutung in der spezifischen Immuntherapie hat inzwischen auch die Verwendung von Antikörpern, die sich gegen definierte TAA richten. Der zur Behandlung solider Tumoren zurzeit klinisch wichtigste Vertreter ist Trastuzumab (Herceptin®), ein humanisierter monoklonaler Antikörper, der mit hoher Affinität und Spezifität an die extrazelluläre Domäne des her-2/neu-Rezeptors bindet (Goldenberg et al. 1999). Die genauen Wirkmechanismen des Trastuzumabs sind nicht geklärt. Seine Aktivität entfaltet Trastuzumab wahrscheinlich nach Bindung an das her-2/neu-Antigen der Tumorzelle über die Blockierung der rezeptorabhängigen Wachstums-Signaltransduktion. (Sliwkowski et al. 1999) Man weiß außerdem, daß der Trastuzumab / her-2/neu-Komplex Effektorzellen anzieht, die ihrerseits die Tumorzelle töten (ADCC, antibody dependent cellular cytotoxicity) (Sliwkowski et al. 1999; Clynes et al. 2000). Darüber hinaus ist für Trastuzumab eine Blockade des zellulären DNA-Reparaturmechanismus gezeigt worden. Diese könnte den Synergismus von Antikörpertherapie und Chemotherapie erklären (Baselga et al. 1998 + 2001; Sliwkowski et al. 1999, Slamon et al. 2001).

Ein weiterer monoklonaler Antikörper ist Edrecolomab (Panorex®), ein anti-Ep-CAM Antikörper (IgG2a), der zunächst erfolgreich zur adjuvanten Therapie des fortgeschrittenen KRK eingesetzt wurde (Riethmuller et al. 1994 + 1998; Adkins et al. 1998; Schwartzberg et al. 2001; Haller et al. 2001), dann jedoch aufgrund widersprüchlicher Ergebnisse (Riethmuller et al. 1994 + 1998; Fiedler et al. 2001) für diese Indikation inzwischen nicht mehr zugelassen ist. Inzwischen wird Edrecolomab auch beim MK klinisch getestet (Adkins et al. 1998; Braun et al. 1999). Die Wirksamkeit von Edrecolomab wird derzeit allerdings kontrovers diskutiert. Vorherrschender Wirkmechanismus ist wahrscheinlich ebenfalls die antikörpervermittelte zelluläre Zytotoxizität (ADCC), sowie die Aktivierung einer komplementvermittelten Zytolyse (CDC, complement mediated cytotoxicity) (Adkins et al. 1998; Haller et al. 2001).

### 1.3 Aktivierung von tumorspezifischen T-Zellen

Bei der Immunüberwachung von Tumoren spielen T-Zellen eine zentrale Rolle und sind Untersuchungsgegenstand der vorliegenden Arbeit. Der Begriff "immunosurveillance" zur Charakterisierung dieses Phänomens wurde erstmals 1967 durch Burnet geprägt (Burnet 1967). Die Identifizierung immunogener TAA Anfang der 90er Jahre und die Erkenntnis, daß die Induktion spezifischer T-Zellen über die Aktivierung professioneller antigenpräsentierender Zellen erfolgt, hat entscheidend dazu beigetragen, Aufschlüsse über tumorspezifische T-Zell-Immunität zu erlangen (Übersicht in Smyth 2001a).

TAA werden von antigenpräsentierenden Zellen, wie dendritischen Zellen oder Makrophagen, endozytotisch aufgenommen und zunächst in 8-12 Aminosäuren lange Peptidfragmente in Proteosomen zerschnitten. Danach werden sie von spezialisierten Transportmolekülen (TAP: transporter associated with antigen presentation) in das endoplasmatische Retikulum befördert und verbinden sich dort mit für sie spezifischen MHC-I- und MHC-II-Molekülen. Aktivierte antigenpräsentierende Zellen gelangen schließlich zum Lymphknoten, wo sie die TAA über das MHC-Molekül an der Zell-Oberfläche präsentieren (Übersicht in Banchereau & Steinman 1998; Übersicht in Steinman et al. 1999a; Übersicht in Lanzavecchia & Sallusto 2001; Übersicht in Smyth 2001a). Hier binden CD4<sup>+</sup> T-Zellen an MHC-Klasse-II/TAA-Komplexe, CD8<sup>+</sup> T-Zellen über den T-Zell-Rezeptor an MHC-Klasse-I/TAA-Komplexe der antigenpräsentierenden Zelle (Übersicht in Davis et al. 1998; Turley et al. 2000; Übersicht in Smyth 2001a). CD4<sup>+</sup> T-Helfer-Zellen spielen bei der Sensibilisierung zytotoxischer T-Lymphozyten gegen Tumoren eine wichtige Rolle, indem sie die Aktivierung antigenpräsentierender Zellen über die CD40L/CD40-Interaktion stimulieren (Übersicht in Smyth 2001a). Außerdem regulieren sie die von der antigenpräsentierenden Zelle induzierte T-Zell-Aktivierung, indem sie dendritischen Zellen erst die "Erlaubnis" erteilen, T-Zellen zu aktivieren ("licence-model") (Matzinger & Guerder 1989; Schoenberger et al. 1998; Bennett et al. 1998). Daneben sind CD4<sup>+</sup> T-Helfer-Zellen für die Aufrechterhaltung von CD8-Memory-Zellen und deren Überleben von Bedeutung (Wang & Rosenberg 1999 b).

Zur Aktivierung und Differenzierung CD8<sup>+</sup> T-Zellen sind neben der Antigenpräsentation über den MHC-Klasse-I/TAA-Komplex eine Reihe von weiteren Faktoren notwendig, die in ihrer Summe darüber entscheiden, ob eine produktive T-Zell-Antwort induziert wird, oder statt dessen Toleranz bzw. Anergie (Boise et al. 1995; Iezzi et al. 1998; Kurts et al. 1997; Morgan et al. 1999; Übersicht in Banchereau & Steinman 1998; Übersicht in Lanzavecchia &

Sallusto 2000 + 2001; Übersicht in Turley 2002). Hierzu gehört die Interaktion von kostimulatorischen Molekülen (B7) auf der antigenpräsentierenden Zelle mit denen auf der T-Zelle (CD28)(Iezzi et al. 1998; Übersicht in Banchereau & Steinman 1998; Schrum et al. 2000), sowie die gleichzeitige Zytokin-Sekretion (IL-2) durch die T-Zelle (Übersicht in Schwartz 1992; Boise et al. 1995). Außerdem spielt die Dauer dieser Interaktion zwischen antigenpräsentierender Zelle und T-Zelle eine Rolle (Iezzi et al. 1998; Übersicht in Lanzavecchia & Sallusto 2001). Dies ist wichtig zu berücksichtigen, da die meisten TAA ursprünglich Selbst-Antigene sind und auch auf gesundem Gewebe exprimiert werden. So ist es möglich, daß sie statt einer T-Zell-Immunität eine T-Zell-Toleranz induzieren (Marincola 1997; Coulie et al. 1999, Kawakami et al. 2000; Übersicht in Smyth 2001a; Übersicht in Anichini 2004), denn eigen-reaktive T-Zellen unterliegen im Thymus der klonalen Deletion (Ye et al. 1994). Fehlen z. Bsp. kostimulatorische Faktoren, können die T-Zellen zwar ihre Liganden binden, produzieren aber kein IL-2 und proliferieren nicht. Sie werden statt dessen anergisch (Lanzavecchia & Sallusto 2000 + 2001). Fehlende Kostimulation wurde bereits als Phänomen für Selbst-Antigene beschrieben (Übersicht in Smyth 2001a).

Ausschlaggebend für die Umgehung der Tumor-Toleranz scheint die Existenz sog. "Gefahren-Signale", wie IFN- $\gamma$ , TNF, CD40L und IL-1 $\beta$ , zu sein, die gesunde Zellen nicht aussenden (Übersicht in Smyth 2001a). Hierzu zählt ebenfalls die Expression "streß-induzierter" Liganden, wie MICA und Rae-1, die von transformierten Zellen exprimiert werden und mit natürlichen Killerzellen interagieren, die wiederum die Perforin-vermittelte Apoptose der Tumorzelle triggern (Übersicht in Smyth 2001a).

Der Nachweis tumorspezifischer T-Zellen fast ausschließlich bei Patienten in metastasierten Stadien legt nahe, daß die Aktivierung und Differenzierung tumorspezifischer T-Zellen überwiegend in den peripheren lymphatischen Organen geschieht (Nagorsen 2000; Übersicht in Smyth 2001a; Mortarini 2003; Übersicht in Anichini 2004). Es gibt aber erste Hinweise, daß schon der Primärtumor spezifische T-Zellen induzieren kann.

Die Tumorzell-Lyse durch aktivierte spezifische CTL erfolgt in erster Linie durch die Exozytose zytoplasmatischer Granula wie Perforin oder Granzym B (Übersicht in Smyth 2001 a+b). Ein weiterer Mechanismus ist die Fas-Liganden-vermittelte Apoptose-Induktion (Übersicht in Graubert et al. 1996; Übersicht in Smyth 2001a). Darüber hinaus sezernieren aktivierte zytotoxische T-Zellen Zytokine, wie TNF- $\alpha$ , die direkt zytotoxisch auf ihre

Zielzellen wirken (Übersicht in Smyth 2001a). IFN- $\gamma$  beeinflusst außerdem die Tumorbekämpfung, indem es anti-angiogenetisch wirkt, sowie die Hochregulation von HLA-Klasse-I-Molekülen auf Tumorzellen fördert (Dobranski et al. 2000+2001; Übersicht in Smyth 2001a).

CD8<sup>+</sup> antigenspezifische T-Zellen wurden nach verschiedenen Kriterien unterteilt. Die gängigste Theorie beschreibt die Existenz von vier T-Zell-Untergruppen mit unterschiedlichen Migrations-Eigenschaften und Effektorfunktionen (Übersicht in Lanzavecchia & Sallusto 2000; Sallusto & Lanzavecchia 1999 + 2001):

Demnach stellen die erste Gruppe naive T-Zellen dar, die nach Antigenkontakt über die antigenpräsentierende Zelle nach stunden- bis tagelanger Aktivierungsphase (Iezzi et al. 1998) klonal expandieren und zur zweiten Gruppe, den terminal differenzierten zytotoxischen T-Effektor-Zellen ausreifen. Im Anschluß an ihre zelltötende Aktivität unterliegen diese T-Zellen in der Regel dem "activation-induced-cell-death" (Boise et al. 1995; Übersicht in Steinmann et al. 1999 a+b; Übersicht in Lanzavecchia & Sallusto 2000 + 2001). Ein Teil der Zellen überlebt jedoch (Übersicht in Schwartz 1992; Boise et al. 1995) und bildet wahrscheinlich den Pool für zwei weitere CD8<sup>+</sup> T-Zell-Gruppen: Zentrale T-Memory-Zellen und Effektor-T-Memory-Zellen (Übersicht in Lanzavecchia & Sallusto 2000 + 2001; Sallusto & Lanzavecchia 2001). Zentrale T-Memory-Zellen exprimieren den Homing-Rezeptor CCR7, sie wandern in periphere Lymphknoten und können dort eine sekundäre Immunantwort generieren. Effektor-T-Memory-Zellen besitzen keinen Homing-Rezeptor und sind dadurch in der Lage, in entzündetes Gewebe (evtl. Tumorgewebe) einzuwandern. (siehe auch Champagne et al. 2000).

#### **1.4 Tumorassoziierte Antigene**

TAA sind Zielstrukturen an Tumorzellen, über die T-Zellen einen Tumor erkennen und zerstören können. Die Identifizierung der ersten TAA gelang 1991 van der Bruggen et al. beim malignen Melanom mit Hilfe des "T lymphocyte epitope cloning", auch "autologous typing" genannt. Mit diesem Verfahren, das das Klonieren von T-Zellen durch Stimulieren mit autologen Tumorzellen ("direct immunology") beinhaltet, wurden die meisten Tumorantigene charakterisiert (Boon et al. 1997). Inzwischen existieren aber auch alternative Methoden zur Charakterisierung der molekularen Struktur von immunogenen TAA, wie die Analyse von

cDNA-Expressionssystemen (Boon & van der Bruggen 1996; Wang & Rosenberg 1999 b) und die SEREX-Technik (serological analysis of cDNA expression libraries), die höhere Sensitivitäten und Spezifitäten aufweisen (Old & Chen 1998; Wang & Rosenberg 1999 b).

#### **1.4.1 Gruppen tumorassoziierter Antigene**

Entsprechend des Erscheinungsbildes werden fünf Hauptgruppen von Tumorantigenen unterschieden, die von CTL erkannt werden können. Eine Übersicht einiger humaner TAA laut dieser Einteilung ist in Tabelle 1.1 dargestellt.

##### **1.4.1.1 Aktivierungs-Antigene (Cancer/testis-Antigene)**

Die erste Gruppe der TAA beinhaltet die tumorspezifischen Aktivierungs-Antigene, die auch als "tumorspecific shared antigens" bezeichnet werden (Wang et al. 1999 a+b). Diese werden von Genen kodiert, die in normalem Gewebe lediglich ruhen, aber bei verschiedenen Tumor-Typen in aktivierter Form vorliegen (Boon et al. 1997). Als Prototyp dieser Gruppe sei die Familie der Cancer/testis-Antigene (C/T-AG) genannt (Coulie et al. 1999; Renkvist 2001). Hierzu zählen: MAGE; BAGE; GAGE, sowie NY-ESO-1 und OY-TES-1 und andere (Boon & van der Bruggen 1996; Scanlan et al. 1998; Wang & Rosenberg 1999 b; Old 2001)

Die Expression von Cancer/testis-Antigenen beschränkt sich in gesundem Gewebe auf den Hoden und die Plazenta, besteht aber zusätzlich bei einer großen Bandbreite verschiedener Tumoren mit unterschiedlichen histologischen Ursprüngen: Melanom, Blasenkarzinom, Bronchialkarzinom und Kopf-Hals-Tumoren (Boon et al. 1997; Van den Eynde & Boon 1997; Old & Chen 1998).

Neben den Cancer/testis-Antigenen zählen auch die Muzine zur Gruppe der Aktivierungsantigene, die man vor allem als Oberflächenproteine auf Mamma-, Ovarial- und Pankreaskarzinomen vorfindet (Boon & van der Bruggen 1996). Diese sind in normalem Gewebe stark glykosyliert und werden daher nicht von T-Zellen erkannt (Boon & van der Bruggen 1996). Bemerkenswert ist, daß die T-Zell-Erkennung von Muzinen HLA-unabhängig erfolgen kann. (Jerome et al. 1991; Boon & van der Bruggen 1996 + Boon et al. 1997)

#### **1.4.1.2 Differenzierungs-Antigene**

Die zweite Gruppe bilden Differenzierungsantigene, die gewebespezifisch sind (Coulie et al. 1999). Hierzu zählen Ep-CAM auf Epithelien und epithelialen Tumoren und das Antigen CEA. Weitere Beispiele sind PSA beim Prostatakarzinom, sowie die Tyrosinase und andere Antigene, die für Melanozyten und Melanome spezifisch sind. (Litvinov et al. 1994 + 1997; Van den Eynde & Boon 1997; Stephan et al. 1999; Coulie et al. 1999)

#### **1.4.1.3 Überexpressions-Antigene**

Manche Antigene werden -von nicht-mutierten Genen kodiert- auch in gesundem Gewebe exprimiert und fallen im Tumorgewebe durch eine Überexpression auf. Zu dieser Gruppe der Überexpressions-Antigene zählen: Her-2/neu, das vor allem auf Adenokarzinomen wie KHK, MK, Ovarialkarzinom, Pancreaskarzinom, Bronchialkarzinom und anderen vorzufinden ist, sowie p53, Prame, Aldolase A (Lungenkarzinom) und die KOC-Gen-Familie vorzugsweise beim Melanom und Pancreaskarzinom. (Coulie et al. 1999, Gure et al. 1998 + 2000)

#### **1.4.1.4 Mutations-Antigene**

Die vierte Gruppe bilden Peptid-Antigene, welche sich von ubiquitären Proteinen ableiten und im Tumorgewebe in mutierter Form vorhanden sind. Diese Mutations-Antigene sind mit einigen Ausnahmen für jeden einzelnen Tumor spezifisch (Boon & van der Bruggen 1996) und werden daher auch "tumorspecific unique antigens" genannt (Wang et al. 1999 a+b; Renkvist 2001). Es gibt aber auch Überschneidungen derselben Mutationen bei verschiedenen Tumoren, wie z. Bsp. die Punktmutation des  $\beta$ -Catenins beim Melanom und KHK. (Rubinfeld et al. 1997; Morin et al. 1997; Rimm et al. 1999) Aufgrund ihrer Auswirkung auf die Aktivität des kodierten Proteins nehmen diese Mutationen Einfluß auf die onkogene Transformierung und sind für zahlreiche Tumorentitäten beschrieben. HLA-A2,  $\beta$ -Catenin, CASP-8, CDK4, MUM-1 und viele mehr stellen Beispiele dieser Gruppe dar. (Boon et al. 1997; Coulie et al. 1999; Renkvist 2001)

#### **1.4.1.5 Virale Antigene**

Einige Viren sind in der Lage, einemaligne Transformation von humanen Zellen zu verursachen. Sie kodieren für virale Antigene, welche die fünfte Gruppe der TAA bilden (Coulie et al. 1999). Beispiele dieser Gruppe sind HPV (insbesondere Typ 16 und 18) beim

Zervixkarzinom (Coulie et al. 1999; Bontkes et al. 2000; Youde et al. 2000; Rudolf et al. 2001), HTLV-1 bei Leukämien und Lymphomen (Bieganowska et al. 1999), EBV beim Burkitt-Lymphom und HHV-8 beim Kaposi-Sarkom. Es konnten sogar CD8-T-Zell-Anworten gegen TAA dieser Viren nachgewiesen werden (Callan et al. 1998; Bieganowska et al. 1999; Bontkes et al. 2000; Youde et al. 2000; Übersicht in Khanna & Burrows 2000; Rudolf et al. 2001; Wilkinson et al. 2002).

#### **1.4.2 Ep-CAM**

Ep-CAM (epithelial cell adhesion molecule), das auch als epithelial glycoproteine 40 (EGP40), oder epithelial-specific antigen (ESA) (Gastl 2000) und unter einer weiteren Fülle von Bezeichnungen bekannt ist (17-1A, GA733-2; EGP-2, CO17-1A; KS1-4) (Gastl 2000; Staib et al. 2001), ist ein Differenzierungsantigen epithelialer Gewebe (Litvinov et al. 1994 + 1997; Stephan et al. 1999). Als interzelluläres Adhäsionsprotein kommt ihm eine wichtige Rolle bei Epithelzell-Proliferationen zu, indem es die Kalzium-unabhängige, Cadherin-vermittelte Zell-Zell-Interaktion moduliert. (Litvinov et al. 1997; Balzar et al. 1999) Daher wird es während der Embryogenese natürlicherweise von Epithelzellen exprimiert, während adultes Epithelgewebe überwiegend Ep-CAM negativ ist, bzw. Ep-CAM nur zu einem geringeren Prozentsatz exprimiert. (Litvinov et al. 1997)

Eine erneute Expression dieses Moleküls ist aber dennoch möglich und ist mit hyperplastischen, metaplastischen oder neoplastischen Veränderungen des Epithels assoziiert (Litvinov et al. 1997; Balzar et al. 1999; De Boer et al. 2000). So ist die Expression von Ep-CAM bei einer Vielzahl von Adenokarzinomen bekannt. Ep-CAM wird von bis zu 36,5% der MK (Tandon et al. 1990; Packeisen et al. 1999; Zhong et al. 1999; Gastl 2000) und von über 90% der KRK exprimiert (Goodwin et al. 1987; Maxwell-Armstrong 1998; Packeisen et al. 1999; Balzar et al. 1999).

Beim MK ist die Überexpression von Ep-CAM mit fortgeschritteneren Stadien, höheren Rezidivraten und schlechterer Prognose korreliert (Tandon et al. 1990; Gastl 2000). Für das KRK liegen keine eindeutigen Daten vor.

#### **1.4.3 Her-2/neu**

Das her-2/neu Proto-Onkogen (c-erbB-2) kodiert für ein 185-kDa Transmembran-Protein her-2/neu (human epidermal growthfactor receptor Nr. 2) (Baselga et al. 1996; Peiper et al. 1997),

das der Familie der epidermalen Wachstumsfaktoren angehört. Die Bindung des Wachstumsfaktors an den Rezeptor führt zu erhöhter Proteintranskription und vermehrtem Zellwachstum. Ist das her-2/neu-Gen mutiert, wird der Rezeptor überexprimiert und ist ständig aktiv, was unkontrollierte Zellvermehrung und onkogene Transformierung favorisiert (Piccard et al. 2001). Her-2/neu wird von vielen Tumoren epithelialen Ursprungs überexprimiert (Peiper et al. 1997) und zwar bevorzugt von einer Vielzahl von Adenokarzinomen zwischen 15–30 % (Disis et al. 1999).

Es gibt große Unterschiede in den angegebenen Prozentzahlen der her-2/neu-Überexpression beim MK. Die Werte liegen zwischen 20% und 80% (Natali et al. 1990; Disis et al. 1994 a), wobei die meisten Autoren eine Inzidenz von 30–40% angeben (Slamon et al. 1989; Peoples et al. 1995 a; Brossart et al. 1998). Für das KRK sind ähnliche her-2/neu-Expressionsraten beschrieben, die von 30–50% (Natali et al. 1990; Shirai et al. 1995) bis hin zu über 90% (Kapitanovic et al. 1997; Ross & McKenna 2001) reichen. Eine her-2/neu-Überexpression ist sowohl beim KRK als auch beim MK mit fortgeschrittenem TNM-Stadium und schlechter Prognose assoziiert (Ioanides et al. 1993; Disis et al. 1994 a; Guy et al. 1996; Kapitanovic et al. 1997).

Obwohl her-2/neu in der unmutierten Form ein Eigen-Antigen ist, ist es nur zu einem geringen Anteil in gesundem adultem Gewebe vorzufinden und auch Immunantworten gegen dieses (Selbst-)Antigen sind beschrieben (Disis et al. 1994 a + 1997 + 2000 a; Ward 1999; Nagorsen 2000; Feuerer et al. 2001 a). Ioanides et al. gelang 1993 die erstmalige Detektion von humanen tumorantigenspezifischen CTL aus dem Aszites von Ovarialkarzinom-Patientinnen, die in vitro mit hoher Affinität das synthetische her-2/neu-Peptid: p 971–980 erkennen. Seitdem sind zahlreiche weitere her-2/neu-Peptide identifiziert worden, die von her-2/neu-spezifischen CTL erkannt werden: her-2/neu p 369–377 (KIFGSLAFL) (Fisk et al. 1995), her-2/neu p654-662 (IISAVVGIL) (Peoples et al. 1995 a; Peiper et al. 1997), her-2/neu p 689-697 (RLLQETELV) (Rongcun et al. 1999), sowie das Peptid her-2/neu 17 mer (p 883-899) mit der Sequenz KVPIKWMALESILRRRF (Kobayashi et al. 2000).

Her-2/neu ist daher eine attraktive Zielstruktur für die Immunotherapie und die Entwicklung von Tumorvakzinen. Z. Bsp. wird beim MK der monoklonale Anti-her-2/neu-Antikörper Trastuzumab (Herceptin®) seit einiger Zeit mit guten klinischen Erfolgen eingesetzt. Man vermutet, daß die Überexpression des TAA in malignen Zellen die selektive Destruktion dieses malignen Gewebes favorisiert (Disis et al. 1994 b).

#### 1.4.4 CEA

CEA, carcinoembryonales Antigen, ist ein gut charakterisiertes onkofetales Glykoprotein, das normalerweise nur von embryonalen Zellen synthetisiert und sezerniert wird.

Als TAA weist es sowohl Eigenschaften der Differenzierungs-Antigene als auch der Aktivierungs-Antigene (Muzine) auf (Coulie et al. 1999; Rye et al. 2001). CEA wird bei 50% der MK (Horowitz et al. 1989; Maxwell-Armstrong 1998) und bei bis zu 85% der KRK (Midgley et al. 1999) exprimiert. Bei diesen Patienten sind gleichzeitig auch erhöhte Serumspiegel an löslichem CEA zu messen, die mit Tumormasse, fortgeschrittenen Stadien und schlechter Prognose korrelieren (Hernandez 1978; Molina et al. 1998). CEA ist daher für eine Reihe maligner Erkrankungen (gastrointestinale Tumoren, MK, Bronchialkarzinom, muzinöses Ovarialkarzinom) ein empfindlicher, jedoch unspezifischer Tumormarker.

#### Table 1.1

Einordnung der getesteten TAA in die Hauptgruppen humaner TAA und Beispiele weiterer TAA; modifiziert und ergänzt nach: Boon 1997; Coulie 1999; Renkvist 2001

Aktivierungs-AG	Differenzierungs-AG	Überexpressions-AG	Mutations-AG	virale AG
<u>cancer/testis AG</u> MAGE BAGE GAGE SAGE HAGE  LAGE-1 (= NY-ESO-1)  OY-TES-1  SSX  SCP-1	Tyrosinase Melan-A/MART-1 gp100/Pmel 17 gp75/TRP-1 TRP-2  CEA  PSA  Ep-CAM	HER-2/neu  p53  PRAME  Aldolase A (=NY-LU-1)  KOC-Gen-Familie	HLA-A2  CDK4 (cyclin-dependent kinase 4)  MUM-1 (melanoma-ubiquitous mutated)  β-Catenin  CASP-8  AFP	HPV  EBV  HHV-8  HTLV-1
<u>Muzine:</u> MUC-1 MUC-3 MUC-4 MUC-11 MUC-12 MUC-13  CA125  (CEA)				

## 1.5 Tumorreaktive T-Zellen

Beim Menschen und auch in experimentellen Tiermodellen (Kass et al. 1999; Reilly et al. 2000; Grosenbach et al. 2001; Ercolini et al. 2003) konnten bereits für zahlreiche Tumor-Entitäten wie z. Bsp. dem Melanom (Hom et al. 1993 a; Schiltz 1997; Mortarini 2003), Bronchialkarzinom (Calhoun et al. 2000), RCC (Finke et al. 1994; Schiltz 1997) und Ovarialkarzinom (Ioanides et al. 1993; Peoples et al. 1993 a+b) tumorspezifische T-Zellen aus verschiedenen Kompartimenten nachgewiesen werden.

Diese CTL stammen überwiegend aus tumorinfiltrierenden Lymphozyten (TIL), die aus Tumor-Biopsien gewonnen wurden, sowie aus tumorassoziierten Lymphozyten (TAL), die aus Lymphknoten-Metastasen, Aszites oder Pleurasekreten isoliert und *in vitro* unter Zytokin-Stimulation (IL-2 und TNF- $\alpha$ ) expandiert wurden. Man weiß daher nicht, ob die nachgewiesenen Zellen dem *in-vivo*-Zustand der Patienten entsprechen.

Im Gegensatz zu tumorspezifischen Lymphozyten aus dem Kompartiment TIL bzw. TAL ist weniger über ihre Existenz im peripheren Blut der Patienten bekannt (Disis et al. 2000 a). Der erstmalige Nachweis zirkulierender tumorreaktiver CD8<sup>+</sup> T-Zellen aus dem unstimulierten peripheren Blut gelang Letsch et al. beim metastasierten Melanom. Diese Lymphozyten wiesen zudem zytolytische Fähigkeiten gegen autologe oder allogene Melanomzell-Linien auf (Letsch et al. 2000). Mit der Identifizierung von TAA gelang der Nachweis, daß der Erkennungsmechanismus, über den tumorspezifische CTL die Tumorzellen detektieren und schließlich auch lysieren können, auf der Erkennung eben dieser TAA beruht (Yoshino et al. 1994 a+b). TAA werden über MHC-I-Moleküle an der Zelloberfläche von Tumoren präsentiert. Eine peptidspezifische CD8<sup>+</sup> T-Zelle mit passendem T-Zell-Rezeptor kann nun über den TAA-MHC-I-Komplex die Tumorzelle erkennen und als spezifische Reaktion zytotoxische Zytokine sezernieren und damit die Tumorzelle vernichten (Hom et al. 1991 + 1993 a+b; Tsang et al. 1997; Goedegebuure et al. 1997; Trojan et al. 2001; Smyth et al. 2001a). Die quantitative und qualitative Untersuchung von TAA-spezifischen T-Zellen hat daher einen wichtigen Stellenwert für das Verständnis von spontanen Immunreaktionen gegen Tumoren und der T-Zell-Tumor-Interaktion, sowie für die Weiterentwicklung und Optimierung von Tumor-Vakzinen. Zum *in-vitro*- und *ex-vivo*-Nachweis tumorspezifischer CTL können neben ganzen Tumorzellen auch synthetisch hergestellte Peptide dieser TAA genutzt werden.

### **1.5.1 Tumorreaktive T-Zellen beim kolorektalen Karzinom**

TIL und TAL von KRK-Patienten beinhalten ebenfalls tumorspezifische CTL (Yoo et al. 1990; Hom et al. 1993 b), die nachweislich zytolytisch gegen KRK-Zellen vorgehen können (Hom et al. 1993 b). Das Vorhandensein dieser tumorspezifischen TIL ist außerdem mit einer besseren Überlebensrate der KRK-Patienten assoziiert (Naito et al. 1998). Diese nachgewiesenen CTL sind allerdings mittels IL-2-Zugabe in vitro stimuliert worden. Nagorsen et al. gelang es erstmalig, auch für das KRK TAA-spezifische CD8+ T-Zellen im unstimulierten peripheren Blut der Patienten zu detektieren (Nagorsen et al. 2000). Diese spontanen T-Effektorzellen richteten sich gegen die TAA Ep-CAM, her-2/neu und CEA und kamen ausschließlich bei Patienten mit Lymphknoten- oder Fernmetastasen vor. Bremers et al. konnten darüber hinaus nach Stimulation mit dendritischen Zellen und Tumorlysaten, sowie IL-2 und IL-7 auch CD4+ T-Zellen aus dem peripheren Blut von KRK-Patienten (Stadien II + III) isolieren. Diese konnten ebenfalls autologe KRK-Tumorzellen über ein HLA-Klasse-II-Restriktionselement erkennen (Bremers et al. 2000).

Neben T-Zell-Antworten beim KRK ist es gelungen, spezifische Antikörper im peripheren Blut der Patienten nachzuweisen, die sich gegen die TAA Ep-CAM und her-2/neu richteten (Mosolits et al. 1999; Ward et al. 1999). In beiden Studien lagen höhere Antikörper-Titer in metastasierten gegenüber frühen Stadien vor.

### **1.5.2 Tumorreaktive T-Zellen beim Mammakarzinom**

Auch bei MK-Patientinnen ist es bereits mehrfach gelungen tumorspezifische T-Lymphozyten aus TIL (Schwartzentruber et al. 1992; Baxevanis et al. 1994) und TAL (Linehan et al. 1995; Hudson et al. 1998) zu expandieren, die sowohl CD8+ (Baxevanis et al. 1994; Linehan et al. 1995) als auch die CD4+ (Schwartzentruber et al. 1992; Hudson et al. 1998) T-Zellen umfassen. Für die CD4+ Lymphozyten wurde gezeigt, daß sie als Zeichen ihrer Tumor-Reaktivität nach Antigenstimulation die Zytokine GM-CSF, TNF- $\alpha$  und IFN- $\gamma$  freisetzen (Schwartzentruber et al. 1992; Dadmarz et al. 1995). Für die spezifischen CD8+ CTL konnte sogar eine Lyse autologer und allogener MK-Zellen gezeigt werden (Linehan et al. 1995; Hudson et al. 1998). Diese CTL detektierten neben ganzen Zellen auch HLA-A\*0201-gematchte synthetische her-2/neu-Peptide (Linehan et al. 1995; Hudson et al. 1998). Die Ergebnisse dieser Studien sind allerdings vorsichtig zu beurteilen, da die dort nachgewiesenen T-Zellen alle mit IL-2 in vitro stimuliert worden sind.

Interessanterweise konnten Verdegaal et al. CTL aus dem peripheren Blut von MK-Patientinnen isolieren, die allogene MK-Zellen spezifisch erkennen und lysieren konnten. Auch diese PBMC wurden zuvor mit IL-2, IFN- $\gamma$  und allogenen MK-Zellen stimuliert, so daß es sich nicht um eine ex vivo Arbeit handelt (Verdegaal 1999).

Im Gegensatz zu anderen Tumoren ist weniger über die Rolle der T-Zell-Immunität beim MK bekannt (Verdegaal 1999) und spezifische Immunantworten im peripheren Blut sind überwiegend humoraler Natur. Sowohl bei fortgeschrittenen Stadien (Disis et al. 2000 a) als auch im Frühstadium (Disis et al. 1997) konnten hier wiederholt hohe Titer an her-2/neu-spezifischen Antikörpern gemessen werden. Diese Antikörper-Antwort kann unter Herceptin®-Therapie (anti-her-2/neu-mAb) geboostert werden (Disis et al. 2000 a).

Neben TIL und TAL scheint allerdings das Knochenmark ein weiteres Kompartiment zu sein, in dem TAA-spezifische T-Zellen beim MK generiert werden. Erstmals wurden von Feuerer et al. (2001 a) tumorreaktive T-Zell-Populationen im Knochenmark (operierter, aber ansonsten) unbehandelter MK-Patientinnen detektiert. Es wurde eine prozentuale Erhöhung der CD8<sup>+</sup> und CD4<sup>+</sup> Memory-Zellen festgestellt, sowie bei einer Patientin mithilfe von Tetrameren die her-2/neu-Spezifität der CD8<sup>+</sup> T-Zellen nachgewiesen. Diese Verschiebungen fehlten jedoch überwiegend im peripheren Blut derselben Patientinnen (Feurerer et al. 2001 a). Eine zweite Studie derselben Arbeitsgruppe konnte diese Ergebnisse bestätigen, in der tumorreaktive CTL aus dem Knochenmark, nicht aber aus dem peripheren Blut von MK-Patientinnen expandiert werden konnten (Feurerer et al. 2001 b).

Es ist wichtig zwischen therapieinduzierten und spontanen Immunantworten zu unterscheiden. Im Gegensatz zu natürlicherweise vorkommender tumorgerichteter zellulärer Immunantworten ist wesentlich mehr über therapeutisch oder experimentell induzierte T-Zell-Antworten bekannt. Hier gibt es die Möglichkeit in vitro oder direkt in vivo über ganze Tumorzellvakzine oder Peptidvakzine zelluläre Immunantworten zu generieren. Hierauf wurde bereits in Kapitel 1.2 eingegangen.

## 1.6 Nachweis antigenspezifischer T-Zellen

Für den direkten ex-vivo-Nachweis spezifischer T-Zellen stehen verschiedene Methoden zur Verfügung, die entweder auf der antikörpervermittelten Zytokindetektion (ELISPOT-Assay; Durchflußzytometrie / FACS-Analyse) (Herr et al. 1996; Scheibenbogen et al. 1997 a; Suni et al. 1998; Brosterhus et al. 1999) oder auf der Verwendung von tetramerisierten HLA / Peptid-Komplexen (tHLA; Tetramere) beruhen (Altman et al. 1996).

Für die vorliegende Studie verwendeten wir den IFN- $\gamma$ -ELISPOT-Assay, der mit hoher Sensitivität und Spezifität die antigeninduzierte Zytokin-Sekretion von T-Zellen direkt auf Einzelzell-Niveau detektiert (Herr et al. 1996; Scheibenbogen et al. 1997 a). Die Eignung des IFN- $\gamma$ -ELISPOT-Assays als spezifische und sensitive Technik zum Nachweis spezifischer T-Zell-Antworten konnte von verschiedenen Gruppen gezeigt werden (Di Fabio et al. 1994; Schmittel et al. 1997 + 2000; Scheibenbogen et al. 1997 a+b + 2000; Derby et al. 2001; Übersicht in Nagorsen 2002a).

Der klassische Zytotoxizitäts-Assay zum Nachweis antigenspezifischer T-Zellen, der Chromium-Release-Assay, erfordert zunächst eine in-vitro-Stimulation der T-Zellen mittels IL-2, sowie eine wiederholte Restimulation mit dem betreffenden Antigen, woraus Alterationen der T-Zell-Antworten resultieren (Monsurro et al. 2002). Mit Hilfe des hier verwendeten ELISPOT-Assays kann dieses Problem vermieden werden, da hier der direkte ex-vivo-Nachweis von aktivierten T-Zellen aus dem unstimulierten peripheren Blut erfolgt.

Zudem erlaubt der ELISPOT im Gegensatz zu einigen anderen Assays (z. Bsp. Tetramere) Rückschlüsse auf den funktionellen Zustand der nachgewiesenen T-Zellen "in vivo", da die Fähigkeit, nach Antigen-Kontakt IFN- $\gamma$  zu sezernieren, eine Eigenschaft der T-Memory- und T-Effektorzellen, nicht aber naiver T-Zellen ist (Hamann et al. 1997). Areaktive oder anerge T-Zellen werden demnach im ELISPOT-Assay - im Gegensatz zur Tetramertechnik - nicht erfaßt. Die enge Korrelation zwischen der im ELISPOT-Assay ermittelten Anzahl IFN- $\gamma$ -freisetzender T-Zellen und dem Grad an Zytotoxizität, der mit dem Chromium-Release-Assay gemessen werden kann (Di Fabio et al. 1994; Scheibenbogen et al. 2000; Schmittel et al. 2000; Derby et al. 2001), stützt die Gültigkeit dieser Schlußfolgerung. Eine gute Korrelation besteht ebenfalls zwischen der im ELISPOT gemessenen IFN- $\gamma$ -Sekretion und der in der Durchflußzytometrie meßbaren Anzahl intrazellulär IFN- $\gamma$ -positiver TAA-spezifischer T-Zellen (Asemisen et al. 2001). Eine nähere Phänotypisierung der T-Zellen ist im ELISPOT

allerdings sehr aufwendig und gelingt nur indirekt, z. Bsp. durch blockierende Antikörper (Hom et al. 1991 + 1993 a+b; Dadmarz 1995 et al.; Suni et al. 1998; Bremers et al. 2000). Für die hier gestellten Studienziele haben wir auf eine Phänotypisierung verzichtet.

### **1.7 Zielsetzung der Arbeit**

Für verschiedene maligne Erkrankungen ist das Vorhandensein spontaner TAA-spezifischer T-Zellen im peripheren Blut bereits beschrieben. Bei KRK-Patienten konnten wir in einer vorherigen Studie spontane TAA-gerichtete T-Zellen im peripheren Blut nachweisen (Nagorsen et al. 2000). Ziel der vorliegenden Arbeit war es, spontane periphere T-Zell-Antworten gegen TAA bei Patientinnen mit MK zu analysieren und diese mit den T-Zell-Reaktionen von KRK-Patienten zu vergleichen.

Ep-CAM, her-2/neu und CEA wurden als Zielstrukturen ausgewählt, weil sie TAA bei Adenokarzinomen sind und bei beiden Tumorentitäten ähnlich exprimiert sind. Sie stellen potentielle Zielstrukturen für zytotoxische T-Zellen *in vivo* und *in vitro* dar.

Damit sind sie gleichzeitig interessante Zielstrukturen für eine Vakzin-basierte Tumorthérapie. Die Fragestellung, ob es im peripheren Blut bereits eine spontane T-Zell-Antwort gegen diese Antigene bei Adenokarzinom-Patienten gibt, ist von elementarem Interesse für die Entwicklung T-Zell-gerichteter Vakzinierungen.

Sowohl beim KRK als auch beim MK sind vereinzelt T-Zell-Antworten in verschiedenen Kompartimenten, wie dem Tumorgewebe selbst, tumorassoziierten Flüssigkeiten oder dem Knochenmark beschrieben worden. Studien, die funktionelle *ex-vivo*-T-Zell-Antworten aus dem peripheren Blut nachweisen, gibt es bislang nur für das KRK (Nagorsen et al. 2000). In der vorliegenden Arbeit vergleichen wir mittels des IFN- $\gamma$ -ELISPOT-Assays tumorspezifische T-Zell-Reaktionen direkt in unstimulierten MNC des peripheren Bluts von KRK- und MK-Patienten.

Die meisten Studien zum Nachweis tumorreaktiver T-Zellen wurden unter Stimulation von Zytokinen wie IL-2 durchgeführt, woraus qualitative und quantitative Veränderungen beim Nachweis von T-Zell-Antworten resultieren könnten (Monsurro et al. 2002). Der hier verwendete IFN- $\gamma$ -ELISPOT-Assay erlaubt die direkte *ex-vivo*-Analyse antigenspezifischer T-Zell-Antworten auf Einzelzell-Niveau ohne vorherige Stimulation.

Mit der Fragestellung, ob die Therapie mit monoklonalen Antikörpern eine zelluläre Immunantwort boostern bzw. induzieren kann, testeten wir zusätzlich PBMC von vier MK-Patientinnen, die Herceptin® erhalten hatten, sowie von einer KRK-Patientin, die mit Panorex® therapiert wurde.

Als Kontrollpersonen wurde eine Gruppe von 12 gesunden Probanden untersucht.

Zum Beleg einer intakten T-Zell-Immunität der von uns untersuchten Patienten und Probanden diente ein Peptid des Influenza-Matrix-Proteins, das als Positivkontrolle bei allen Patienten- und Probandengruppen untersucht wurde.