

4 Diskussion

TAA können von T-Zellen erkannt werden. Es ist gezeigt worden, daß Patienten mit verschiedenen malignen Erkrankungen, darunter auch Adenokarzinomen, bereits spontan T-Zell-Antworten gegen TAA entwickeln können (Hom et al. 1991+1993a: Malignes Melanom; Ioanides et al. 1993 und Peoples et al. 1993a: Ovarialkarzinom; Finke et al. 1994: RCC; Kono et al. 1998: Magenkarzinom; Yoo et al. 1990; Hom et al. 1993b; Baxevanis et al. 1994; Linehan et al. 1995: KRK). Der Nachweis dieser T-Zellen erfolgte allerdings ausschließlich unter in-vitro-Stimulation mit IL-2, oder IL-7 bzw. unter Beteiligung von dendritischen Zellen. Solche Untersuchungen können nicht als ex-vivo-Tests gelten, da die detektierten T-Zellen nicht mehr dem ursprünglichen in-vivo-Zustand entsprechen (Monsurro et al. 2002). Ziel der vorliegenden Untersuchung war es, spontane T-Zell-Antworten gegen die TAA Ep-CAM, her-2/neu und CEA im peripheren unstimulierten Blut von KRK- und MK-Patienten zu untersuchen und zu vergleichen. Hierfür verwendeten wir den IFN- γ -ELISPOT-Assay, der eine etablierte spezifische und sensitive Technik zur direkten ex-vivo-Quantifizierung spezifischer T-Zellen darstellt.

Die erste Beschreibung einer funktionalen ex-vivo-T-Zell-Antwort gegen TAA (Ep-CAM, her-2/neu und CEA) beim KRK gelang Nagorsen et al. (2000) mit dem ELISPOT-Assay.

In der hier vorgelegten Studie analysierten wir die T-Zell-Antworten im peripheren Blut von 20 MK-Patienten und 27 KRK-Patienten. Es konnte bei fünf KRK-Patienten (18,5%) eine spontane T-Zell-Antwort demonstriert werden, während im peripheren Blut von MK-Patienten keine spezifischen T-Zellen gegen die TAA nachweisbar waren (0%).

Der statistische 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) signifikant ist ($p=0,042$).

Die Ergebnisse dieser Studie sind zusammen mit Daten einer ersten Kohorte von 22 KRK-Patienten von uns bereits publiziert worden (Nagorsen et al. 2003).

4.1 T-Zell-Antworten beim kolorektalen Karzinom

In der vorliegenden Studie zeigen 5 der 27 KRK-Patienten (18,5%) signifikante funktionelle T-Zell-Antworten gegen mindestens eins der untersuchten TAA-Peptide.

Dieses Ergebnis gliedert sich gut in die Daten der gängigen Literatur ein, da spezifische zelluläre Immunantworten - allerdings unter in-vitro-Stimulation mit Zytokinen - beim KRK bereits in verschiedenen Kompartimenten beschrieben worden sind (TIL: Yoo et al. 1990; Hom et al. 1993b; Naito et al. 1998; PB: Bremers et al. 2000 (CD4+)). Inzwischen sind außerdem in einer Studie von Ward et al. (1999) humorale TAA-gerichtete Antworten, insbesondere gegen her-2/neu bei 14% (8/57) der KRK-Patienten gefunden worden. Ähnliche Ergebnisse zeigte auch eine Studie von Mosolits et al. (1999).

Mit unserer Untersuchung können wir die Ergebnisse einer vorherigen von uns durchgeführten Studie bestätigen (Nagorsen et al. 2000), in der erstmalig gegen Ep-CAM, her-2/neu und CEA gerichtete T-Zellen aus unstimulierten MNC des peripheren Bluts von KRK-Patienten in Frequenzen von bis zu 208 spezifischen T-Zellen pro 1×10^6 PBMC nachgewiesen wurden. Hierbei waren T-Zell-Antworten bei einem Drittel der KRK-Patienten zu beobachten und herrschten ausschließlich in metastasierten Stadien (III und IV) vor. In der vorgelegten Studie haben wir darüber hinaus nicht nur beim metastasierten, sondern zusätzlich beim nicht-metastasierten KRK tumorspezifische T-Zell-Antworten gefunden. Insgesamt drei der reaktiven Patienten befanden sich im nicht-metastasierten UICC-Stadium II der KRK-Erkrankung, die zwei anderen Patienten im UICC-Stadium IV. Eine spontane TAA-spezifische T-Zell-Antwort kann folglich schon in frühen Stadien vom KRK induziert werden und ist nicht ausschließlich auf fortgeschrittene metastasierte Stadien begrenzt. Hieraus ergeben sich eventuell mögliche Vorteile zum Beispiel für den Einsatz von spezifischen Tumor-Vakzinen, mit der Option, eine schon im Frühstadium existente endogene Immunantwort bereits in diesem Stadium zu boostern.

Wir wissen nicht, ob die von uns nachgewiesenen tumorspezifischen CTL aus dem peripheren Blut der KRK-Patienten in vivo tatsächlich effektiv gegen die Tumorzellen vorgehen können. Wir können dies aber annehmen, da der Nachweis der IFN- γ -Sekretion im von uns angewendeten ELISPOT-Assay die Schlußfolgerung nahe legt, daß diese T-Zellen tatsächlich zytotoxisch aktiv sind. Darüber hinaus zeigten wir in der Studie von Nagorsen et al. (2000) mittels Vielfarben-Durchflußzytometrie, daß die von ihnen im ELISPOT-Assay nachgewiesenen TAA-reaktiven T-Zellen CD69 und CD45RA exprimierten, was darauf hinweist, daß diese Zellen nach dem Modell von Hamann et al. (1997) Effektor-Lymphozyten (CD8+CD45RA+IFN- γ +) sind und sich im aktivierten Zustand (CD69) befinden. Solche Effektor-T-Zellen sind grundsätzlich in der Lage, nach Antigen-Stimulation die zytotoxischen

Produkte Perforin und Granzym B zu sezernieren. Für melanomspezifische Effektor-T-Zellen (CD45RA+CCR7-) konnte sogar eine direkte ex vivo lytische Wirkung auf Tumorzellen nachgewiesen werden (Valmori & Scheibenbogen 2002 a).

4.2 T-Zell-Antworten beim Mammakarzinom

Keiner der von uns untersuchten 20 MK-Patienten wies eine signifikante TAA-spezifische T-Zell-Antwort gegen Ep-CAM, her-2/neu oder CEA im IFN- γ -ELISPOT-Assay auf.

Dieses Ergebnis stimmt mit Daten anderer Studien überein. Zwar konnten TAA- oder tumorgerichtete T-Zell-Antworten beim MK bereits in verschiedenen Kompartimenten nachgewiesen werden (Schwartzentruber et al. 1992; Baxevanis et al. 1994; Linehan et al. 1995; Dadmarz et al. 1995; Hudson et al. 1998; Verdegaal et al. 1999; Disis et al. 2000a; Feuerer et al. 2001 a+b), den direkten Nachweis einer spontanen T-Zell-Antwort im peripheren Blut von MK-Patientinnen gibt es jedoch bisher nicht.

Bei den bisher beschriebenen spezifischen T-Zellen handelt es sich zum einen um CD8+ zytotoxische T-Zellen (Baxevanis et al. 1994; Linehan et al. 1995) und CD4+ T-Helfer-Zellen (Schwartzentruber et al. 1992; Dadmarz et al. 1995; Hudson et al. 1998) aus TIL und TAL und zum anderen um CD4+ und CD8+ T-Zellen aus dem Knochenmark (Feuerer et al. 2001 a+b). Alle dieser Studien wurden allerdings unter Stimulation mit Zytokinen durchgeführt.

Es konnten im peripheren Blut von MK-Patientinnen verschiedener Stadien auch humorale spezifische her-2/neu-gerichtete Immunantworten detektiert werden (Disis et al. 1994 a + 1997 + 2000 a).

Her-2/neu ist ein TAA, das als Zielstruktur für CTL bei MK- und Ovarialkarzinom-Patientinnen identifiziert werden konnte (Slamon et al. 1989; Ioanides et al. 1993; Peoples et al. 1993 a+b und 1995 a+b; Fisk et al. 1995). Es dient außerdem als Rezeptor für den monoklonalen Antikörper Trastuzumab (Herceptin®), der effektiv bei MK-Patientinnen in fortgeschrittenen Stadien mit her-2/neu-exprimierenden Tumoren eingesetzt wird (Baselga et al. 1998 + 2001; Goldenberg et al. 1999; Pegram et al. 1999; Slamon et al. 2001; Piccard et al. 2001). Zusätzlich zur spontanen T-Zell-Antwort testeten wir bei 5 der 20 MK-Patienten (M4, M5, M6, M10) die T-Zell-Reaktivität vor und unter Herceptin®-Therapie. (Siehe Abschnitt 4.4)

Analog zu unserer Studie konnte in drei anderen Studien keine ex vivo CD8+ T-Zell-Antwort gegen das her-2/neu-Peptid p 369-377 im peripheren Blut von MK-Patientinnen mittels des

IFN- γ -ELISPOT-Assays bzw. der HLA-A2-her-2/neu-Tetramer-Technik detektiert werden (Disis et al. 2000a; Feuerer et al. 2001 a+b). Disis et al. konnten bei 5 von 45 weiteren Patientinnen (11%) auch erst unter IL-2-Stimulation CD4+ T-Zell-Antworten gegen ein ICD- oder ECD-Protein von her-2/neu detektieren (Disis et al. 2000a).

Interessanterweise wurde in einer nach unserer Untersuchung veröffentlichten Studie von Rentzsch et al. (2003) gezeigt, daß vier von 21 MK-Patientinnen (19%) her-2/neu-spezifische CD8+ T-Zell-Antworten im peripheren Blut aufwiesen. Diese Untersuchungen wurden allerdings an sieben Tage lang kultivierten und vorsensibilisierten PBMC durchgeführt und waren keine funktionellen Untersuchungen, wie wir sie durchführten.

Zusammenfassend ist das Fehlen einer peripheren TAA-gerichteten T-Zell-Antwort bei den von uns untersuchten MK-Patientinnen durchaus in Übereinstimmung mit der Literatur zu sehen.

4.3 Unterschiede der T-Zell-Antworten beim kolorektalen Karzinom und Mammakarzinom

4.3.1 Vergleichbarkeit der Patientengruppen

Es ist bekannt, daß die Standardtherapie-Verfahren Operation, Chemotherapie und Radiatio immunsupprimierende Effekte auf den menschlichen Organismus ausüben können. Bei der Auswahl der in diese Studie eingeschlossenen Patienten wurde deshalb darauf geachtet, daß beide Patientengruppen in Bezug auf die Vortherapien ähnlich distribuiert waren (s. Tab. 3.1, 3.2 und 3.3). In beiden Patientengruppen waren vergleichbare Anteile an operierten Patienten vorhanden (KRK: 70%; MK: 80%). Um den immunsupprimierenden Einfluß der Operation in unserer Untersuchung möglichst gering zu halten, erfolgten die Blutentnahmen jeweils unmittelbar vor der Operation oder mindestens 4 Wochen im Anschluß daran. Auch der Anteil an Chemotherapie-Administration entsprach sich in beiden Patientengruppen (Chemo: KRK: 52%; MK: 51%). Der Anteil an Bestrahlungen war ebenfalls in beiden Patientengruppen etwa gleich (Radiatio: KRK: 33%; MK: 20%). Zusätzlich erhielten 5 der 20 MK-Patienten das Medikament Tamoxifen. Daten bezüglich einer eventuellen T-Zell-Suppression durch Tamoxifen gibt es bisher nicht.

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß beide Patientengruppen in Bezug auf die durchgeführten Therapien ähnlich verteilt sind und somit dem Einfluß immunsuppressiver Therapie gleichermaßen ausgesetzt waren.

In Bezug auf das Tumorstadium war in unserer Studie ein etwas größerer Anteil an lymphknoten- oder fernmetastasierter Stadien in der Gruppe der MK-Patienten (80%) im Vergleich zur Gruppe der KRK-Patienten (59%) zu verzeichnen (s. Tab. 3.1, 3.2 und 3.3). Ein häufig zu beobachtendes Phänomen bei Patienten mit fortgeschrittenen malignen Tumoren ist die zelluläre Immunsuppression (Hakim 1988; Luo et al. 1997; Goto et al. 1999). Wie im direkten Vergleich anhand von DTH-Antworten gezeigt werden konnte, gilt dies ebenso für das KRK wie für das MK (Bolton et al. 1975). Zur Überprüfung der zellulären Immunlage der Patienten testeten wir die T-Zell-Reaktivität gegen das HLA-A*0201-bindende Epitop p58-66 (GILGFVFTL) des Influenza-Matrixproteins (Bednarek et al. 1991), da ca. 2/3 unserer Bevölkerung eine Memory-T-Zell-Antwort gegen Influenza besitzt. Bereits eine Studie von Arlen et al. (2000) belegte die Eignung des Influenza-Matrix-Proteins als Kontrollpeptid im Zusammenhang mit einer CEA-Vakzine bei Karzinom-Patienten. Die sehr ähnlichen influenzaspezifischen T-Zell-Frequenzen der von uns untersuchten Patientengruppen und gesunden Spender belegen einen vergleichbaren zellulären Immunstatus aller drei Gruppen [Gesunde 50% (6/12); KRK 56% (9/16); MK 70% (7/10); siehe auch Tab. 3.5, 3.6 und 3.7]. Eine Verfälschung der Ergebnisse zu Gunsten der KRK-Patienten auf Grund eines alterierten Immunstatus der MK-Patienten ist nicht anzunehmen.

Es ist außerdem unwahrscheinlich, daß das Fehlen einer TAA-spezifischen T-Zell-Antwort bei den von uns untersuchten MK-Patienten an deren überwiegend höheren Tumorstadien liegt, da in einer Reihe von Studien das Vorkommen von tumorreaktiven T-Zellen bei verschiedenen Tumoren in fortgeschrittenen Stadien sogar häufiger beobachtet wird, als in frühen Tumorstadien (KRK: Nagorsen 2000; malignes Melanom: Mortarini 2003; Übersicht in Anichini 2004). Eine mögliche Erklärung dieses Phänomens ist die größere Tumormasse und die erheblich ausgeprägtere Überexpression der TAA in späten Tumorstadien im Vergleich zu frühen (Ward 1999). Eine weitere Hypothese wäre, daß die Invasion neoplastischer Zellen in den Lymphknoten, wie es in fortgeschrittenen Stadien der Fall ist, die Induktion von TAA-spezifischen T-Zellen begünstigt (Mortarini 2003; Übersicht in Anichini 2004). Diese Tendenz zu stärkeren Immunantworten in fortgeschritteneren Stadien ist ebenso

für TAA-spezifische Antikörper beschrieben worden (KRK: Mosolits 1999; Ward 1999; Malignes Melanom: Fishman 1997; Jager 1999; MK: Pupa 1993).

Es ergibt sich aus der vorliegenden Studie ein signifikanter Unterschied in der peripheren T-Zell-Antwort gegen TAA zwischen MK und KRK ($p=0,042$). Die Gründe hierfür sind unklar. Es gibt jedoch verschiedene theoriegeleitete Erklärungsmöglichkeiten.

4.3.2 Existenz von spezifischen T-Zellen nur in bestimmten Kompartimenten

Eine Ursache könnte unterschiedliches Homing-Verhalten der MK- und KRK-spezifischen Lymphozyten sein. Für beide Karzinome ist zwar Homing in Tumorgewebe und Lymphknoten beschrieben worden, für das Kompartiment des Knochenmarks hingegen liegen nur Daten für das MK vor (Feurerer et al. 2001 a+b). Im Maus-Modell zeigten Feuerer et al. 2003, daß T-Zellen ins Knochenmark homen und dort von dendritischen Zellen spezifisch geprimed werden. Beim MK scheint das Knochenmark ein spezielles Kompartiment zu sein, in dem sowohl schlafende Tumor-Zellen (tumor dormancy) als auch tumorreaktive T-Memory-Zellen anzutreffen sind (Diel & Cote 2000; Feuerer et al. 2001 a). Parallel zu unserer Studie waren auch bei Feuerer et al. (2001 a+b) solche CTL-Veränderungen im peripheren Blut der MK-Patientinnen nicht wiederzufinden. Es ist also denkbar, daß MK-spezifische Lymphozyten zwar existieren, jedoch nicht im peripheren Blut zirkulieren, sondern vornehmlich in anderen Kompartimenten wiederzufinden sind. Diese Hypothese wurde bereits von Karanikas et al. (2001) für tumorspezifische T-Zellen beim adenosquamösen Bronchialkarzinom vorgeschlagen.

Wenn Homing nicht die Ursache einer fehlenden T-Zell-Antwort im peripheren Blut von MK-Patientinnen ist, so besteht die Möglichkeit, daß tumorspezifische T-Zellen nur schwach induziert werden und sich daher unterhalb der Nachweisgrenze befinden, oder daß diese defekt bzw. anerg sind.

4.3.3 Immunologische Toleranz

Die meisten tumorassoziierten Antigene sind Eigen-Antigene, die auf niedrigerem Niveau auch an gesunden Zellen exprimiert werden. Eine Immuntoleranz auf Grund der "Eigen-" ("Selbst-") Natur dieser Antigene ist daher anzunehmen (Marincola 1997; Coulie et al. 1999,

Kawakami et al. 2000; Übersicht in Anichini 2004), denn eigen-reaktive T-Zellen unterliegen im Thymus der klonalen Deletion (Ye et al. 1994). Dies kann allerdings nicht das unterschiedliche Verhalten von T-Zellen beim KRK und MK erklären, denn dieses Phänomen gilt für alle Tumore in ähnlicher Weise.

4.3.4 Existenz von spezifischen T-Zellen unterhalb der Nachweisgrenze

Kobayashi et al. (2000) postuliert die These, daß im Thymus hauptsächlich diejenigen TAA-spezifischen T-Zellen eradiziert werden, die eine hohe Antigen-Affinität aufweisen, so daß dann solche mit nur geringer Affinität in niedrigen Frequenzen im Blut nachzuweisen sind.

Es ist daher möglich, daß tumorspezifische T-Zellen im peripheren Blut von MK-Patientinnen durchaus existieren, wie von Disis et al. (1994 a+b + 2000 a) und Verdegaaal et al. (1999) postuliert, diese aber in so niedrigen Frequenzen zirkulieren, daß sie im von uns durchgeführten unstimulierten ELISPOT-Assay nicht detektierbar sind.

Oft produzieren CD8⁺ T-Zellen zudem niedrigere Zytokin-Level als CD4⁺ Zellen (Mosmann et al. 1997 b), was ein weiterer limitierender Faktor beim Nachweis von spezifischen CTL darstellen mag.

4.3.5 Tumor-Escape-Mechanismen

So genannte Tumor-Escape-Mechanismen ermöglichen es den Tumor-Zellen, einer Immunantwort zu entkommen. Hierzu zählen in erster Linie die Down-Regulation von TAA (Marincola 1997; Jojovic et al. 1998), Defekte bei der Antigenprozessierung und -präsentation (Ye et al. 1994; Guinan et al. 1994), HLA-Verlust (Natali et al. 1989; Momburg et al. 1989; Kageshita et al. 1993; Guinan et al. 1994; Cabrera et al. 1996; Coulie et al. 1999), sowie die Induktion von T-Zell-Anergie (Lanzavecchia & Sallusto 2000; Lanzavecchia & Sallusto 2001; Sallusto & Lanzavecchia 2001) durch fehlende Expression von kostimulatorischen Molekülen (insbesondere B-7) (Guinan et al. 1994; Staveley-O'Carroll et al. 1998), oder Aktivierungs-Signalen, wie IL-2 (Zea 1995; Coventry et al. 1996) (siehe auch Übersicht in Anichini 2004). Diese Mechanismen gelten aber fürs KRK (Natali et al. 1989; Momburg et al. 1989; Kaklamanis et al. 1994; Jojovic et al. 1998) und MK (Hakim 1988; Natali et al. 1989; Kaklamanis et al. 1995; Cabrera et al. 1996) gleichermaßen, so daß andere Ursachen für die unterschiedliche T-Zell-Reaktivität in Betracht kommen müssen, die direkt mit den spezifischen Besonderheiten der Tumore KRK und MK in Verbindung stehen.

4.3.6 Wir postulieren vier Hypothesen, die dem ursächlich zu Grunde liegen können:

1. Die spezifischen Eigenschaften des Kolongewebes im Gegensatz zu dem der Brustdrüse: ausgeprägte Durchblutung und eigenes lymphatisches System im Kolon.
2. Der Einfluß von darmassoziierten Bakterien, die einerseits direkt über verschiedene Mechanismen spezifische anti-tumorale Immunantworten induzieren können und andererseits eine unspezifische lokale Entzündungsreaktion hervorrufen, die ihrerseits zur Tumor-Eradikation beiträgt.
3. Die spezifische Tumor-Mikroumgebung, die im Falle des KRK die Induktion einer tumorgerichteten T-Zell-Antwort favorisiert, im Falle des MK einer solchen eher entgegen wirkt.
4. Die eventuelle Erkennung anderer, hier nicht untersuchter TAA im Falle des MK.

Zu 1. Spezifische Eigenschaften des Kolon-Gewebes im Vergleich zu dem der Brustdrüse

Die spezifischen Eigenschaften des Ursprungsgewebes nehmen womöglich maßgeblich Einfluß auf die Immunogenität des in diesem Gewebe entstehenden Tumors.

Bemerkenswert ist dabei vor allem, daß die Brustdrüse und das Kolon vom Aspekt der Immunologie völlig verschiedene Organe darstellen. Während die Mamma für das Immunsystem nur eine untergeordnete Rolle spielt, so ist das Kolon ein hoch spezialisiertes immunologisches Organ, das sogar über ein eigenes GALT-System (GALT: gut associated lymphoid tissue) verfügt. So sind Leukozyten (Immunzellen, wie Lymphozyten, Plasmazellen, neutrophile und eosinophile Granulozyten, Mastzellen und Makrophagen) schon in der Lamina Propria der normalen Darmmukosa präsent (Mantovani 1992; Perdigon et al. 2001), während sie im gesunden Mammagewebe in diesem Ausmaß fehlen.

Es ist daher denkbar, daß beim KRK eher als beim MK eine TAA-spezifische T-Zell-Antwort induziert werden kann.

Eine weitere besondere Eigenschaft des Kolons im Vergleich zur Brustdrüse ist die Gefäßstruktur und Durchblutungssituation dieses Gewebes. Der Magen-Darm-Trakt ist auf Grund seiner Resorptionsfunktion ein ausgesprochen gut durchblutetes Organ. Zudem besitzt es ein autoregulierendes Gefäßsystem, das je nach Bedarf den Blutanteil sogar noch erhöhen kann. Die Brustdrüse, die neben Drüsengewebe hauptsächlich Fettgewebe und Bindegewebe

enthält, ist wesentlich weniger durchblutet. Wenn sich hieraus ergibt, daß eine wesentlich höhere Zahl an T-Precursor-Zellen pro Zeiteinheit das Kolon passieren und Kontakt zum Tumor bekommen, wäre die Wahrscheinlichkeit einer Sensibilisierung dieser T-Zellen gegen das KRK im Vergleich zum MK erhöht. Insgesamt erscheint der Zugang der T-Zellen zum KRK einfacher als zum MK zu sein.

Zu 2. Exposition des KRK zu darmassoziierten Bakterien

Das kurative Potential von Bakterien bei der Behandlung von Malignomen wurde bereits im 19. Jahrhundert entdeckt (Übersicht in Wiemann & Starnes 1994). Heute weiß man, daß bakterielle Fragmente, wie Bestandteile der Zellwand, bakterielle DNA oder Endotoxine, starke immunologische Adjuvantien bei der tumorspezifischen CTL-Induktion darstellen (Tokunaga et al. 1984; Lise & Audibert 1989; Maric & Liu 1999; Miconnet et al. 2001; Übersicht in Nagorsen 2002b).

Das bakterielle Lipopolysaccharid (LPS) beispielsweise, ein Bestandteil der Zellmembran gram-negativer Bakterien, löst die Freisetzung von einer Reihe proinflammatorischer und chemotaktischer Zytokine (IL-1; IL-6, IL-8 und TNF- α) aus (Glauser et al. 1991; Marc & Liu 1999; Saint 2000). Unreife dendritische Zellen werden durch diese Zytokine zum Ort der Entzündung gelockt, wo bakterielle Substanzen die Reifung und Aktivierung dieser dendritischen Zellen bewirken (De Smedt et al. 1996; Sallusto & Lanzavecchia 1999; Lanzavecchia & Sallusto 2000; Lapointe et al. 2000). Hochaktivierte dendritische Zellen induzieren ihrerseits eine produktive T-Zell-Antwort (Lanzavecchia & Sallusto 2000). Auf diese Weise kann LPS als Adjuvans zur Reifung von dendritischen Zellen in vivo und in vitro verwendet werden (De Smedt et al. 1996; Lanzavecchia & Sallusto 2000; Lapointe et al. 2000). Die durch diese Entzündung ebenfalls chemotaktisch angelockten CD4⁺ T-Zellen (Th1) sezernieren nach Bakterien-Antigen-Erkennung IL-2 und IFN- γ , was wiederum zur Aktivierung und Amplifikation spezifischer CD8⁺ T-Zellen, Makrophagen und natürlichen Killerzellen führt, die schließlich die Tumor-Zellen töten (Saint 2000). Ein Wirkmechanismus des IFN- γ ist das Induzieren der Expression von MHC I und II Molekülen auf KRK-Zellen, was zu einer Amplifikation der spezifischen T-Zell-Antwort führt (Kvale et al. 1988; Blonar et al. 1988; Gupta et al. 1989).

Heute weiß man, daß die Reifung von Lymphozyten im Darm sowohl durch die normale darmassoziierte Mikroflora als auch von nicht-ortsständigen, nicht-pathogenen Keimen, die den Gastrointestinaltrakt passieren, kontrolliert wird (Perdigon et al. 2001).

Bakterien sind in der Lage, die proliferative (B- und) T-Zell-Antwort im Darm zu verstärken und das zytotoxische Potential von tumorspezifischen CD8⁺ T-Zellen zu steigern (Perdigon et al. 2001). Verschiedene bakterielle Adjuvantien stimulieren hierbei verschiedene Subpopulationen von T-Zellen (Lise & Audibert 1989). Neben LPS sind weitere bakterielle Bestandteile möglicherweise ebenfalls in der Lage, T-Zell-vermittelte Immunantworten zu verstärken (Miconnet et al. 2001). So kann auch das bakterielle Fermentationsprodukt Butyrat direkt die Expression von HLA Klasse I und II Molekülen auf Kolonzellen beeinflussen (Kvale et al. 1995).

Die Effizienz von Bakterien als Adjuvans bei der Tumorbekämpfung veranschaulicht die äußerst wirkungsvolle BCG-Therapie (Bacille Calmette Guérin) beim Blasenkarzinom. Hier ist die intravesikale Administration von BCG sogar zwei- bis dreimal effektiver als die intravesikale Chemotherapie (Amling et al. 2001). Neben BCG sind darüber hinaus immunmodulatorische Effekte für *E. coli*, Streptokokken, *Klebsiella pneumoniae* und andere Bakterien beschrieben worden (Lise & Audibert 1989; Okamoto et al. 2001; Miconnet et al. 2001).

Auch ein direkter, unspezifischer Einfluß bakterieller Substanzen ist vorstellbar.

Die Produktion von Substanzen, wie NO (Stuehr & Nathan 1989), freien Radikalen, sowie den Zytokinen IFN- γ und TNF- α (Perdigon et al. 2001) durch Entzündungszellen des Darms wirkt sich direkt toxisch auf das umgebende Tumorgewebe aus. Gleichzeitig führt die Sekretion von chemotaktischen, adhäsiven und extravasationsfördernden Produkten, wie GM-CSF, im entzündeten Gewebe zu einer verstärkten Rekrutierung von T-Zellen und professionellen antigenpräsentierenden Zellen (Maric & Liu 1999). Möglicherweise ist die Induktion einer spezifischen T-Zell-Antwort zusätzlich durch die unspezifische lokale Inflammation verbessert.

Diese Hypothese wird eventuell durch die Beobachtungen gestützt, daß einerseits fortgeschrittene Neoplasien oft mit dem Fehlen einer Inflammation vergesellschaftet sind (Mantovani 1992) und andererseits die krankheitsfreie und gesamte Überlebensrate von

Karzinompatienten erheblich verbessert ist, wenn der Tumor mit T-Zellen infiltriert ist (Zhang et al. 2003).

Insgesamt entwickeln sich möglicherweise TAA-gerichtete T-Zell-Antworten einfacher und intensiver beim KRK als beim MK auf Grund der Exposition des Darmgewebes zu ortsständigen Bakterien.

Zu 3. Einfluß der spezifischen Tumor-Mikroumgebung beim KRK und MK

Die Tumor-Mikroumgebung scheint eine entscheidende Bedeutung für die Generation oder Suppression von tumorgerichteten T-Zell-Antworten zu haben.

Während die Mikroumgebung des KRK durch ortständige Bakterien und eine lokale Inflammation eine tumorspezifische T-Zell-Antwort favorisiert, so wird für das MK eine lokale tumorinduzierte Immunsuppression durch die Tumor-Mikroumgebung diskutiert (Cefai et al. 1999).

Diese lokale Down-Regulation der Immunantwort kann generell auftreten durch:

die Präsenz von supprimierenden löslichen Faktoren, wie TGF- β (Marincola 1997), IL-4 (Mosmann & Sad 1997 a; Sad et al. 1997), IL-10 (Ding et al. 1993), PGE₂ (Mantovani 1992) und H₂O₂ (Schmielau 2001). Dies kann zu einer Hemmung der Kostimulation mit daraus resultierender Anergie (IL-10: Ding et al. 1993), sowie zu einer Blockade der IL-2-Produktion führen, so daß eine T-Zell-Proliferation ausbleibt (Sad et al. 1997).

Als Ursache für die lokale Down-Regulation der Immunantwort beim MK wird neben dem Verlust des IL-2-Rezeptors (Hakim 1988) insbesondere die Hemmung einer T-Zell-Migration durch die Tumor-Mikroumgebung vorgeschlagen (Cefai et al. 1999). Die Tumor-Mikroumgebung des KRK hingegen kann sich unter anderem durch die Produktion von Zytokinen, wie IFN- γ und TNF- α , positiv auf die Entstehung von KRK-spezifischen T-Zell-Antworten auswirken. (Kvale et al. 1988; Perdigon et al. 2001).

Während die Infiltration des MK-Gewebes durch Makrophagen mit schlechter Prognose korreliert (Steele et al. 1984), ist niedriges Grading des KRK gerade mit einer Leukozyten-Infiltration des Tumors assoziiert (Jass et al. 1986). Im direkten Vergleich der Leukozyten-Infiltration im MK-Gewebe und KRK-Gewebe fanden Toomey et al. (1999) beim MK eine hohe Anzahl an so genannten "Suppressor-Makrophagen", hohe Level des immunsupprimierenden IL-10 und einen erhöhten Anteil an niedrig aktivierten T-Zellen. Gleichzeitig wurden im KRK wenig Suppressor-Makrophagen, niedrige IL-10-Level und ein

hoher Anteil an vollständig aktivierten T-Zellen gefunden (Toomey et al. 1999). Dies veranschaulicht eindrucksvoll eine mögliche Ursache für das unterschiedliche Vorkommen von tumorspezifischen T-Zell-Antworten bei MK-Patientinnen und KRK-Patienten.

Zu 4. eventuelle Erkennung anderer TAA

Es gibt eine Vielzahl von TAA, gegen die eine T-Zell-Antwort potentiell möglich ist.

So wäre eine plausible These, daß MK-spezifische T-Zellen durchaus existieren, sich aber gegen andere, von uns nicht untersuchte TAA richten. So sind z. Bsp. TAA, wie MAGE, MUC, PRAME und p53 ebenfalls als MK-assoziiert identifiziert worden (Übersicht in Renkvist et al. 2001). Manche dieser TAA (MAGE, MUC und p53) werden auch vom KRK exprimiert (Übersicht in Titu et al. 2002).

Verdegaal et al. (1999) schlagen darüber hinaus die Möglichkeit vor, daß MK-spezifische zytotoxische T-Lymphozyten die Tumorzellen über ganz andere TAA erkennen, die bisher noch nicht identifiziert werden konnten. Diese Hypothese wird auch von Valmori et al. (2002) für das maligne Melanom unterstützt.

Insgesamt spielen möglicher Weise nicht nur Ep-CAM, her/2-neu und CEA, sondern auch andere - hier nicht untersuchte, bzw. bisher nicht identifizierte - TAA bei der Immunantwort gegen das MK eine Rolle.

4.4 T-Zell-Antwort nach Herceptin®- und Panorex®-Therapie

Herceptin® (Trastuzumab), ein monoklonaler Anti-her-2/neu-Antikörper, wird erfolgreich bei MK-Patientinnen mit her-2/neu-exprimierenden Tumoren eingesetzt (Baselga et al. 1996+1998 + 2001; Goldenberg et al. 1999; Pegram et al. 1999; Piccard et al. 2001; Slamon et al. 2001). Disis et al. (2000a) konnten nachweisen, daß eine präexistente, endogene humorale Antwort gegen her-2/neu durch Herceptin® geboostert werden kann. Mit der Fragestellung, ob auch eine zelluläre Immunantwort durch Herceptin® geboostert bzw. induziert werden kann, testeten wir in der vorliegenden Studie bei vier MK-Patientinnen (M4, M5, M6, M10), die Herceptin® erhalten hatten, die T-Zell-Reaktivität gegen drei TAA vor und unter Herceptin®. Bei einer Patientin (M10) ist es uns gelungen, nach dem vierten Zyklus der Herceptin®-Therapie (4. Blutentnahme) eine T-Zell-Reaktivität gegen zwei her-2/neu-Peptide und interessanterweise gegen ein Ep-CAM-Peptid zu detektieren (s. Tabelle 3.8 und Abb 3.2).

Dieser Befund ist vorsichtig zu interpretieren, da wir multiple Testungen durchgeführt haben. Die anderen drei Patientinnen (M4, M5, M6) zeigten unter Herceptin®-Therapie keine T-Zell-Antworten gegen TAA. Auf Grund der niedrigen Fallzahl können wir keine abschließende Bewertung vornehmen, in welchem Maße Herceptin® eine TAA-gerichtete, insbesondere her-2/neu-spezifische, T-Zell-Antwort induzieren oder boostern kann.

Panorex® (Edrecolomab), ein monoklonaler Maus-anti-Ep-CAM-Antikörper (IgG2a); der insbesondere bei Ep-CAM-exprimierenden gastrointestinalen Tumoren Anwendung findet, wird in seiner Effektivität derzeit kontrovers diskutiert. In den achtziger Jahren wurden erste Daten zu einer erfolgreichen Monotherapie des metastasierten KRK mit Edrecolomab vorgelegt (z. Bsp.: Douillard et al. 1986). Danach folgten zunächst sehr viel versprechende Ergebnisse (Überlebensvorteil in placebokontrollierter Studie) zur adjuvanten Therapie mit Edrecolomab (Riethmuller et al. 1994 + 1998). Allerdings gibt es jetzt immer mehr Hinweise darauf, daß eine adjuvante Chemotherapie dem Edrecolomab überlegen ist und daß eine kombinierte Chemo-Immuntherapie gegenüber einer alleinigen Chemotherapie keinen Vorteil hat (Müller et al. 2001; Punt et al. 2002). Fagerberg et al. erforschten, daß die Impfung mit einem gegen Ep-CAM-gerichteten monoklonalen anti-idiotyp-Antikörper, sowie mit einem Ep-CAM-Protein bei KRK-Patienten humorale und zelluläre Immunantworten gegen Ep-CAM induzieren kann (Fagerberg et al. 1995; Mosolits 2004).

Mit der Fragestellung, ob Panorex® (Edrecolomab) die Fähigkeit besitzt, TAA-spezifische T-Zellen zu induzieren, wurden in unserer Studie PBMC der Patientin K15 untersucht, die als einzige KRK-Patientin mit Panorex® therapiert wurde. Es wurden eine Blutprobe vor Therapiebeginn mit Panorex®, eine zweite einen Monat danach, sowie eine dritte nach dem vierten Therapiezyklus gewonnen. Weder vor noch unter Panorex®-Therapie konnten T-Zell-Antworten gegen TAA detektiert werden. Insbesondere auch gegen Ep-CAM wurde zu keinem Meßzeitpunkt eine T-Zell-Antwort gefunden. Dies steht im Gegensatz zu einer vorangegangenen Studie unserer Arbeitsgruppe, in der bei einem KRK-Patienten nach drei Zyklen low-dose-IL-2 und Panorex® Ep-CAM-spezifische T-Zell-Reaktionen induziert werden konnten (Nagorsen et al. 2000). Da wir hier nur eine einzige Patientin zu dieser Fragestellung untersucht haben, können wir keine allgemeine Schlussfolgerung ziehen, ob Panorex® in der Lage ist, eine spezifische Ep-CAM-gerichtete T-Zell-Antwort zu induzieren.

Die Daten aus der vorherigen Studie zu einer Panorex®-behandelten Patientin (Nagorsen et al. 2000) und die Ergebnisse der hier vorgelegten Studie zu Herceptin®-therapierten Patientinnen erlauben zusammengenommen die vorsichtige Annahme, daß die Gabe monoklonaler Antikörper grundsätzlich zur Induktion einer T-Zell-Antwort führen kann und diese T-Zell-Antwort sogar über das eigentlich Ziel-Antigen des Antikörpers hinausreichen kann.

4.5 Schlußfolgerung

Keiner der 20 Patienten mit MK wies in unserer Studie eine spontane TAA-gerichtete spezifische T-Zell-Antworten im peripheren Blut auf. Damit traten T-Zell-Antworten gegen TAA signifikant seltener bei MK-Patientinnen als bei KRK-Patienten auf ($p= 0,042$). Für KRK-Patienten wurde die Existenz spezifischer zytotoxischer T-Zell-Antworten, die sich gegen tumorassoziierte Antigene richten, im peripheren Blut bestätigt. Diese T-Zellen konnten sogar bei 3/5 Patienten bereits im UICC-Stadium II des KRK nachgewiesen werden. Das heißt, daß eine Metastasierung keine unabdingliche Voraussetzung für die Entwicklung spezifischer T-Zell-Antworten ist.

Die Gründe für das unterschiedliche Vorkommen von zirkulierenden spezifischen T-Zellen gegen gemeinsame tumorassoziierte Antigene bei dem KRK und dem MK sind nicht geklärt. Da TAA-Expression und Vorbehandlung der untersuchten KRK- und MK-Patienten vergleichbar waren, vermuten wir darüber hinausgehende Ursachen. Insbesondere die Tumor-Mikroumgebung und der Einfluß darm-assoziiierter Bakterien, sowie unterschiedliches Homing-Verhalten könnten eine wichtige Rolle für die Entwicklung einer systemischen T-Zell-Antwort spielen.

Für ein genaueres Verständnis der Bedeutung einer Immunantwort für die Tumorkontrolle ist es notwendig, diese tumorreaktiven T-Zellen weiter zu charakterisieren und mehr über ihre biologische und klinische Bedeutung zu erfahren. Es müssen weitere Untersuchungen - auch an anderen Tumorentitäten - erfolgen, um die Ursachen für das unterschiedliche Vorkommen spezifischer T-Zell-Antworten zu klären. In der Aufklärung der Ursachen liegt ein großes Potential für die Weiterentwicklung von Tumorstoffen, welche die Induktion spezifischer T-Zellen zum Ziel haben.