

Tumorinfiltrierende T-Zellen in Melanomen und Lymphomen

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades des
Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

eingereicht im Fachbereich Biologie, Chemie und Pharmazie
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Stefanie Groß

aus Berlin

2012

Die experimentellen Arbeiten der vorliegenden Dissertation wurden in der Zeit vom April 2003 bis Juni 2008 an der Klinik für Dermatologie, Venerologie und Allergologie, in der Klinischen Forschergruppe Tumorummunologie der Charité- Universitätsmedizin Berlin unter Leitung von Prof. Dr. Peter Walden durchgeführt.

1. Gutachter: Prof. Dr. Peter Walden
2. Gutachter: Prof. Dr. Burghardt Wittig

Tag der Disputation: 1. November 2012

Hiermit erkläre ich, die vorliegende Arbeit selbständig und nur unter Verwendung der angegebenen Literatur und Hilfsmittel angefertigt zu haben. Des weiteren versichere ich, dass die vorliegende Arbeit nie Gegenstand eines früheren Promotionsverfahrens war. Die dem Verfahren zugrunde liegende Promotionsordnung ist mir bekannt.

Erlangen, den

Stefanie Groß

Danksagung

Mein herzlicher Dank gilt allen, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Bedanken möchte mich an dieser Stelle bei meinem Betreuer Prof. Peter Walden, Leiter der Klinischen Forschergruppe Tumormimmunologie an der Hautklinik der Charité Berlin, für die Möglichkeit die vorliegende Arbeit in seinem Labor anzufertigen und seine ständige Diskussionsbereitschaft.

Auch möchte ich mich bei Prof. Burghardt Wittig, Direktor des Instituts für Molekularbiologie und Bioinformatik der Charité Berlin, für die Übernahme der Zweitgutachterschaft und Vertretung der Arbeit vor dem Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie der FU Berlin bedanken.

Bedanken möchte ich mich auch bei allen ehemaligen und aktuellen Mitgliedern der AG Walden für das gute Arbeitsklima, die Hilfsbereitschaft und die nicht nur fachlich gute Unterhaltung.

Des Weiteren gilt mein großer Dank PD Dr. Uwe Trefzer und seinem Team für die gute Zusammenarbeit und die Bereitstellung der klinischen Proben sowie der patientenbezogenen Daten.

Zu guter Letzt geht mein Dank an meine Eltern, die in mir den Willen gefördert haben das Leben und die Welt zu verstehen, und an Martin, der mich stets bestärkt hat, wenn ich an mir zweifelte. Er hat mir die ganze Zeit Kraft gegeben und den Rücken freigehalten und daher widme ich ihm diese Arbeit.

1. Einleitung	1
1.1. Das Immunsystem - Grundlagen	1
1.1.1. T-Zellen - Entstehung und Selektion	1
1.1.2. Antigenerkennung durch T-Zellen	2
1.1.3. CD4 T-Zellen	4
1.1.4. CD8 T-Zellen	5
1.1.5. Aktivierung von T-Zellen	5
1.2. Das Maligne Melanom	6
1.2.1. Definition, Inzidenz und klinischer Verlauf	6
1.2.2. Therapieoptionen	7
1.2.3. Immunogenität des Malignen Melanoms.....	9
1.3. Das kutane Lymphom - ein weiterer in dieser Arbeit untersuchter Tumor.....	10
1.3.1. Mycosis Fungoides.....	10
1.3.2. Sézary-Syndrom	10
1.3.3. Weitere Formen des kutanen T-Zell Lymphoms.....	10
1.4. Natürliche Anti-Tumor Immunantwort und immuntherapeutische Ansätze	11
1.5. Immunsuppressive Mechanismen im Tumor.....	12
1.5.1. Anergie der T-Zellen.....	14
1.5.2. Regulatorische T-Zellen (Treg)	14
1.5.3. Costimulation und Coinhibition	16
2. Zielsetzung	21
3. Material und Methoden	23
3.1. Zellmaterial und Zellkultur	23
3.1.1. Puffer und Medien	23
3.1.2. Zytokine.....	23
3.1.3. Blockierende Antikörper und andere Reagenzien	24
3.1.4. Präparation von Zellen aus Blut und Gewebe von Patienten und deren Kryokonservierung.....	24
3.1.5. Übersicht des in dieser Arbeit verwendeten Zellmaterials	25
3.1.6. Kultivierung von T-Zellen	28
3.1.7. Kultivierung von Tumorzellen	28
3.2. Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR).....	29
3.2.1. RNA-Extraktion und reverse Transkription von RNA in cDNA	29
3.2.2. PCR zur Expressionsanalyse	29
3.2.3. Gelelektrophorese	30
3.2.4. Gelextraktion und Sequenzierung von PCR-Produkten	30
3.2.5. Verwendeten Primer.....	31
3.3. Durchflusszytometrie	31

3.3.1.	Verwendete Antikörper und Puffer	33
3.3.2.	Färbung von antigenspezifischen Zellen mittels Peptid-HLA-Multimeren	34
3.3.3.	Färbung intrazellulärer Zytokine und der Degranulation von T-Zellen nach Stimulation	37
3.3.4.	Co-Kultur-Transwell-Assays.....	38
3.4.	Statistik.....	39
4.	Ergebnisse	41
4.1.	Infiltration von T-Zellen ins Tumorgewebe und deren Antigen-spezifität	41
4.1.1.	Ausmaß der Infiltration von T-Zellen in analysierten Melanometastasen	41
4.1.2.	Antigen-spezifität der tumorinfiltrierenden T-Zellen.....	43
4.1.3.	Aktivierungszustand der tumorinfiltrierenden T-Zellen	45
4.2.	Analyse einer möglichen Anergie der tumorinfiltrierenden T-Zellen	49
4.3.	Differenzierungsstatus der tumorinfiltrierenden T-Zellen	51
4.4.	Bedeutung von regulatorischen T-Zellen bei der lokalen Immunsuppression im Tumor.....	53
4.4.1.	Vorraussetzungen für Induktion und Migration von Tregs in den Tumor	53
4.4.2.	Tregs im analysierten Tumorgewebe.....	55
4.5.	Coinhibition bei der lokalen Immunsuppression von T-Zellen.....	60
4.5.1.	Coinhibitorische Liganden aus der B7-Familie	60
4.5.2.	PD1 und CTLA4, die Rezeptoren der coinhibitorischen Liganden.....	65
4.6.	Beeinflussung der T-Zellen durch die Tumorzellen durch lösliche Mediatoren oder direkten Kontakt.....	72
4.6.1.	Cokultur-Experimente	74
5.	Diskussion	79
5.1.	T-Zell-Infiltration.....	79
5.2.	T-Zell Anergie.....	82
5.3.	Differenzierungsstatus und Effektorfunktion tumorinfiltrierender T-Zellen	83
5.4.	Regulatorische T-Zellen (Treg).....	85
5.5.	Coinhibition	87
5.6.	Wirkung von Tumorzellen auf tumorinfiltrierende T-Zellen	92
5.7.	Schlußfolgerungen und Ausblick	93
6.	Zusammenfassung	97
7.	Summary	98
8.	Anhang	99
8.1.	Abkürzungsverzeichnis	99
9.	Literatur	101
10.	Eigene Publikationen	110
11.	Curriculum Vitae	111

1. Einleitung

1.1. Das Immunsystem - Grundlagen

Das Immunsystem des Menschen dient dazu den Körper vor mikrobiellen Pathogenen, aber auch entarteten körpereigenen Zellen zu schützen. Neben dem evolutiv gesehen sehr alten angeborenen Immunsystem gibt es das adaptive Immunsystem, auf das im folgenden näher eingegangen wird. Das adaptive Immunsystem besitzt einen humoralen, Antikörper-vermittelten Arm gegen extrazelluläre Pathogene und einen zellulären, T-Zell-basierten Arm, der intrazelluläre Pathogene und entartete Zellen erkennen und eliminieren kann. Aus diesem Grund wird die T-Zell Antwort als für die Tumorabwehr besonders wichtig angesehen. Im folgenden wird daher primär auf die T-Zell-basierte Immunantwort gegen Tumore eingegangen, obwohl auch andere Zellen des Immunsystems, wie Natürliche Killerzellen (NK) und NKT-Zellen eine Rolle bei der Tumorabwehr spielen können.

T-Zellen sind der natürliche Schutz des Körpers vor potentiell gefährlichen abnormen Zellen, die von einem Virus infiziert sind oder Mutationen in sich tragen. Die wesentliche Eigenschaft von T-Zellen besteht darin, körpereigenes ("Selbst") und körperfremdes voneinander zu unterscheiden. T-Zellen erkennen dies mit Hilfe ihres T-Zell-Rezeptors (TCR – engl.: T cell receptor) ¹.

1.1.1. T-Zellen - Entstehung und Selektion

Während ihrer Reifung durchlaufen Vorläufer-T-Zellen im Thymus eine somatische Rekombination des TCR, wodurch ein extrem großes TCR-Repertoire (10^{18} theoretisch mögliche TCRs) geschaffen wird. Von diesem theoretisch möglichen Repertoire kommen ca. $25 - 100 \times 10^6$ TCRs real im menschlichen Organismus vor. Diese große Zahl verschiedener TCRs verteilt sich auf die etwa 10^{12} T-Zellen des menschlichen Körpers ² wobei jede T-Zelle jeweils nur "ihren" spezifischen TCR trägt. Ein einzelner TCR ist zudem meist in der Lage mehrere Epitope zu erkennen ³, wodurch die Erkennung einer sehr großen Bandbreite von pathogenen Strukturen möglich wird. Diese Bandbreite beinhaltet aber auch die Gefahr, selbstreaktive TCRs zu generieren. Eine Reaktion von T-Zellen gegen gesunde körpereigene Strukturen oder nicht-pathogene Fremdstoffe, wie Nahrungsbestandteile oder Mikroorganismen der Haut- oder Darmflora kann lebensbedrohliche Konsequenzen haben. Toleranzverlust ist mit verschiedenen Krankheitsbildern wie der Multiplen Sklerose, Rheumatoider Arthritis oder auch Typ-I-Diabetes assoziiert ⁴. Die Erhaltung der Toleranz

gegen "Selbst" bei gleichzeitiger Garantie auf alle möglichen Antigene reagieren zu können, hat daher die größte Priorität und wird über vielfältige Mechanismen sichergestellt.

Der erste Kontrollmechanismus zur Identifikation selbstreaktiver T-Zellen findet bereits während der Reifung der T-Zellen im Thymus statt und ist unter dem Begriff der negativen Selektion (Teil der zentralen Toleranz) bekannt. Der Mechanismus beruht auf der Expression möglichst vieler körpereigener Antigene durch die Thymuszellen⁵. Bindet eine T-Zelle mit entsprechendem hochaffinem TCR während der Reifung an eine dieser Thymuszellen und erkennt eines der exprimierten Antigene, kommt es in der Regel zur negativen Selektion, d.h. zur Deletion dieses T-Zell-Klons^{6,7}. Die Deletion autoreaktiver T-Zell-Klone im Thymus ist allerdings nur der erste Kontrollmechanismus und entläßt noch eine große Zahl von potenziell autoreaktiven Zellen, da eine Thymuszelle nicht alle im Körper vorkommenden Selbst-Antigene gleichzeitig und in großem Umfang exprimieren und präsentieren kann. Nach der Reifung im Thymus werden die noch naiven T-Zellen in den Blutstrom entlassen und zirkulieren durch den Blutkreislauf und die peripheren lymphatischen Organe.

1.1.2. Antigenerkennung durch T-Zellen

Der initiale Schritt der Antigenerkennung wird über den TCR vermittelt. Der TCR besteht neben dem durch Disulfidbrücke verbundenen Heterodimer aus α - und β -Kette, der für die eigentliche Antigenerkennung nötig ist, noch aus den δ -, ϵ -, γ - und ζ - Ketten des CD3 Komplexes. In Abb. 1 ist der schematische Aufbau eines TCR gezeigt.

Die zwei mit dem TCR assoziierten ζ -Ketten sind für die Signalweiterleitung von entscheidender Bedeutung. Der lange intrazelluläre Teil der ζ -Ketten enthält drei Aktivierungsdomänen (ITAM - engl. Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motifs). Hier erfolgt während der Aktivierung eine Tyrosinphosphorylierung durch die wiederum andere Signaltransduktionskomponenten wie z.B. Zap70 rekrutiert werden. Die ζ -Ketten sind für die Kopplung der TCR-Antigenerkennung mit den diversen Signaltransduktionswegen, die zur Aktivierung der T-Zelle führen essentiell^{1,8}.

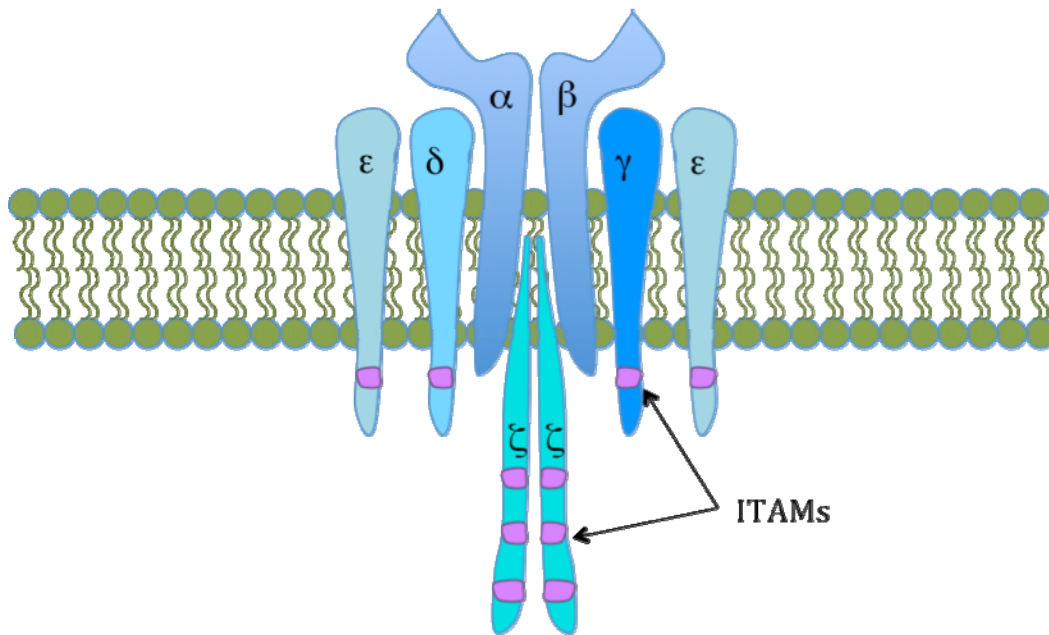


Abb. 1 Schematischer Aufbau des TCR mit α -, β -, δ -, ϵ -, γ - und ζ - Ketten. Zu beachten ist, dass die für die Darstellung willkürlich gewählte zweidimensionale Anordnung der Ketten in der Abbildung nicht unbedingt mit der realen dreidimensionalen Anordnung übereinstimmt.

Der TCR einer T-Zelle bindet nicht direkt an ein Antigen, sondern nur an ein Peptid (Teilstück eines Antigens) das im Kontext eines MHC-Moleküls (engl.: major histocompatibility complex) präsentiert wird. MHC-Moleküle sind Membranproteine die im MHC-Gen-Cluster kodiert sind und zuerst in der Maus entdeckt wurden. Beim Menschen wird diese antigene Struktur als HLA (engl. human leukocyte antigen) bezeichnet⁹⁻¹¹.

Man unterscheidet zwei Klassen von HLAs: HLA-Klasse-I finden sich auf nahezu allen kernhaltigen Körperzellen und präsentieren überwiegend zytosolische Proteine der Zelle aber auch von Viren oder intrazellulären Parasiten. Durch einen Mechanismus der als Kreuzpräsentation bezeichnet wird, können aber auch phagozytierte Antigene in HLA-Klasse-I präsentiert werden. HLA- Klasse-II werden nur auf APC (engl. antigen presenting cell, professionelle antigenpräsentierenden Zellen, dazu zählen Makrophagen und Dendritische Zellen) exprimiert. Im HLA- Klasse-II werden nur phagozytierte und lysosomal degradierte Peptide präsentiert¹².

Peptid-HLA-Klasse-I und Peptid-HLA-Klasse-II Komplexe werden von zwei verschiedenen Gruppen von T-Zellen erkannt, die CD4 positiven T-Zellen erkennen Peptid-HLA-Klasse-II Komplexe und die CD8 positiven erkennen Peptid-HLA-Klasse-I Komplexe.

1.1.3. CD4 T-Zellen

Die primäre Effektorfunktion von CD4 Helfer T-Zellen (Th) besteht in der Sekretion verschiedener Zytokine zur Steuerung der Immunantwort. Anhand verschiedener Zytokin-Expressionmuster erfolgt auch die Unterscheidung verschiedener Effektor-Subtypen. Diese können sowohl die zelluläre Immunantwort (Th1) aber auch die humorale Immunantwort (Th2) unterstützen¹³. Neben den lange bekannten Th1 und Th2 Subtypen sind mittlerweile noch einige weitere beschrieben, deren Funktion bislang nur teilweise charakterisiert ist (siehe Tab. 1). So wurden beispielsweise im inflammatorischen Kontext die Th17-Zellen beschrieben¹⁴.

Eine bedeutende Rolle spielen auch die regulatorischen T-Zellen (Treg), die in der Wahrung der peripheren Toleranz eine zentrale Stellung einnehmen (siehe dazu Kapitel 1.5.2).

CD4 Subtyp	Differenzierungssignal	Signatur-Transkriptionsfaktor	Effektormoleküle	Funktion
Th1	IFN γ , IL12	Tbet	IFN γ	Schutz Viren und intrazellulären Parasiten durch Aktivierung von Makrophagen und Hilfe bei der Induktion von CTL
Th2	IL4	GATA3	IL4, IL5, IL13	Schutz vor Bakterien und extrazellulären Parasiten durch Hilfe bei der Induktion protektiver Antikörper
Th17	IL6, IL1 β , TGF β	ROR γ t	IL17, IL22	begünstigen autoinflammatorische Prozesse, Mechanismus und ggf. weitere Rolle aber unbekannt
Th9	IL4, TGF β	?	IL9	nicht bekannt
Th22	IL6, TNF	AHR	IL22	nicht bekannt
Tfh	?	Bcl6	IL21	verstärkte Antikörper-Bildung
Treg	TGF β u.a.	FoxP3	TGF β	Limitierung der Immunantwort
Tr1	IL10	?	IL10	Limitierung der Immunantwort

Tab. 1 Übersicht über die verschiedenen bislang beschriebenen CD4 T-Zell Subtypen und ihre Funktion, soweit bekannt¹⁵

1.1.4. CD8 T-Zellen

Die wichtigste und größte Gruppe der CD8 positiven T-Zellen sind die zytotoxischen CTL (engl.: cytotoxic T lymphocyte). Sie bilden die Haupteffektorzellen bei der Immunantwort gegen Tumore und sind Kernbestandteil der zellulären Immunantwort.

Nach ihrer Aktivierung produzieren CTLs Zytokine wie Interferon gamma (IFN γ) und Tumornekrose-Faktor alpha (TNF α), wodurch zum einen die Expression von HLA- Molekülen auf anderen Zellen erhöht wird und zum anderen weitere Zellen des Immunsystems aktiviert werden ¹⁶.

Haupteffektorfunktion von CTL ist aber deren Fähigkeit, eine erkannte Zielzelle zu lysieren. Die zytotoxische Aktivität der CTLs wird durch zwei verschiedene Wege vermittelt. Zum einen kann durch die Interaktion von FAS und FAS-Ligand auf der Zielzelle Apoptose in dieser ausgelöst werden. Der andere Weg eine Zielzelle zu lysieren, erfolgt durch die Freisetzung von zytotoxischen Granula, die Perforin und Granzyme enthalten ¹⁷. Dabei werden durch Einlagerung des Perforin in der Membran der Zielzelle Poren gebildet. Darüber können dann die Granzyme in die Zielzelle eindringen und in dieser Apoptose induzieren ¹⁸.

Neben den CTL gibt es auch in der Gruppe der CD8 T-Zellen eine regulatorische Untergruppe. Diese wird als CD8+CD28-T-Suppressor-Zelle beschrieben ¹⁹⁻²¹. Anders als bei den CD4+ Tregs sind für die CD8+CD28-T-Suppressor-Zellen bislang keine weiteren phänotypischen Marker beschrieben, so dass eine phänotypische Unterscheidung von Suppressorzellen und normalen CD8+CD28- Effektor-T-Zellen nicht möglich ist. Die detaillierte Analyse von Suppressorzellen ist derzeit nur auf der klonalen Ebene und/ oder im Mausmodell möglich ²¹. Ähnlich wie bei den CD4+ Treg sind die molekularen Mechanismen der Suppression durch CD8+CD28-T-Suppressor-Zellen vielfältig und noch nicht geklärt. Bislang wurde gezeigt, dass T-Suppressor-Zellen direkt aktivierte Effektor-T-Zellen lysieren können ²². Aber auch die Sekretion negativ regulierender Zytokine, wie IL10 und TGF β , sowie kontaktabhängige Mechanismen sind beschrieben ^{23,24}.

1.1.5. Aktivierung von T-Zellen

Die erste Aktivierung einer naiven T-Zelle wird als Priming bezeichnet. Für dieses Priming einer naiven T-Zelle sind mehrere verschiedene Signale notwendig: i) eine Antigen-spezifische Stimulation über den TCR nach Erkennung eines Peptid-HLA-Komplexes, ii) ein costimulatorisches Signal (siehe Kapitel 1.4.3), sowie iii) weitere akzessorische Moleküle und Zytokine wie zum Beispiel Interleukin 2 (IL-2). Antigen-aktivierte, proliferierende Th1-Zellen

produzieren große Mengen an IL-2 und liefern somit Signal iii als „Hilfe“ für die Induktion weiterer T-Zellen. Auch die CTL produziert nach ihrer Aktivierung IL-2, dies aber in deutlich geringerem Umfang wie die Th-Zellen, um so in einem autokrinen Loop die eigene Aktivierung aufrechtzuerhalten²⁵.

Erst nach erfolgreichem Priming beginnt die T-Zelle zu proliferieren und gewinnt ihre Effektorfunktion. Bei einem weiteren Antigen-Kontakt kann die T-Zelle dann sofort ihre Effektorfunktion ausüben und erneut proliferieren. Bei diesem zweiten und allen weiteren Antigen-Kontakten ist dann das über den TCR vermittelte Signal entscheidend und costimulatorische und weitere Signale spielen nur bei schwachen TCR-Signalen eine Rolle²⁶.

Bei akuten Erkrankungen, die mit der vollständigen Entfernung des Antigens beendet werden, wird der größte Teil der T-Zellen nach der Effektorphase durch Apoptose eliminiert. Ein kleiner Anteil der antigenspezifischen T-Zellen differenziert allerdings zu Memory-Zellen. Diese können im Fall einer erneuten Infektion deutlich schneller eine protektive Immunantwort aufbauen, da ein erneutes Priming nicht nötig ist. So kann in den meisten Fällen der erneute Ausbruch der Erkrankung komplett verhindert werden. Die Induktion von Memory-Zellen ist auch die Grundlage für Vakzinierungen¹.

Im Zuge der Differenzierung von der naiven T-Zelle hin zur Effektor oder Memory T-Zelle verändern sich bestimmte Oberflächenrezeptoren und dienen so als Marker für den Differenzierungsstatus der Zelle. Naive T-Zellen sind normalerweise CD45RA+ CD45RO- CD57- und Memory-Zellen weisen CD45RA- CD45RO+ CD57+oder- auf. Terminal differenzierte Effektor-T-Zellen, die nicht mehr zur Memory-Zelle differenzieren können und nach Eliminierung des Antigens normalerweise selbst terminiert werden weisen den Phänotyp CD45RA+ CD45RO- CD57+ auf²⁷⁻²⁹.

1.2. Das Maligne Melanom

1.2.1. Definition, Inzidenz und klinischer Verlauf

Das maligne Melanom (MM) ist ein Tumor, der durch die Entartung der pigmentbildenden Zellen (Melanozyten) der Haut, aber auch in Schleimhaut und der Aderhaut des Auges entsteht. Das Risiko für das Auftreten eines MM erhöht sich bei gehäuften familiären Auftreten, bei erhöhter Anzahl und Größe von Nävi (Muttermalen) und übermäßiger UV-Licht Exposition in der Kindheit^{30,31}. Virale Komponenten und chemische Karzinogene scheinen bei der Entstehung des MM keine oder nur eine untergeordnete Rolle zu spielen³².

Die Inzidenz des MM ist weltweit ansteigend, was vor allem durch das deutlich erhöhte Risiko während seines Lebens ein MM zu entwickeln (Lebenszeit-Risiko) von aktuell 1:75 gegenüber 1:600 um 1960 verdeutlicht wird. In Deutschland treten derzeit 10-15 Neuerkrankungen pro 100.000 Einwohner jährlich auf ^{33,34}. Trotz der verstärkten Initiative in Früherkennungsprogrammen und dem allgemeinen medizinischen Fortschritt ist die Mortalität weiter konstant hoch. 1,3 Prozent aller krebserkrankten Todesfälle gehen auf das MM zurück. Jährlich sterben in Deutschland über 2000 Patienten an den Folgen des Melanoms.

Besonders hervorzuheben ist der Umstand, dass die betroffenen Patienten relativ jung sind, anders als bei den meisten anderen Krebserkrankungen, die meist erst im letzten Lebensdrittel auftreten. Ungefähr 50% der diagnostizierten MM kommen in Individuen unter 50 Jahren und 30% in Individuen unter 45 Jahren vor ³⁵. In der Altersgruppe der 25- bis 34-jährigen ist das MM bei Männern die vierthäufigste und bei Frauen sogar die zweithäufigste Krebsart (Krebsatlas, Deutsches Krebsforschungszentrum).

Die Stadieneinteilung der Erkrankung erfolgt nach Tumordicke und Metastasierung. Stadium I stellt ein dünnes MM in situ ohne weitere Metastasierung dar. In Stadium II fallen Tumore, die zwar noch keine makroskopische Metastasierung zeigen, aber deren Größe und Dicke 4mm übersteigt. Zum Stadium III gehören MM, die schon Satelliten-Metastasen (Metastasen im Umkreis von zwei Zentimetern um den Primärtumor) und/oder In-Transit-Metastasen (Metastasen zwischen dem Primärtumor und der ersten Lymphknotenstation) oder Lymphknotenmetastasen gebildet haben. Stadium IV ist durch die Bildung von Fernmetastasen (Organmetastasen) charakterisiert. Die Metastasierung erfolgt in unterschiedlichste Organe, anders als bei anderen Tumoren gibt es bei der Metastasierung des MM keine bevorzugten "Zielorgane". Neben Hautmetastasen findet man Absiedelungen besonders häufig in Herz, Leber, Lunge, Skelett und im Gehirn ³⁶.

1.2.2. Therapieoptionen

Die wichtigste Therapieform bei der Behandlung des MM ist die chirurgische Entfernung des Tumors. Im Frühstadium, wenn noch keine Absiedelung von Metastasen erfolgt ist, kann das MM in den meisten Fällen durch eine Operation geheilt werden. Etwa 20% aller diagnostizierten MM sind allerdings schon metastasiert, wodurch die klinische Prognose für den Patienten deutlich schlechter wird. So beträgt im Stadium IV (Fernmetastasierung) die mittlere Überlebenszeit der Patienten nur 8,5 Monate und die Chance die nächsten fünf Jahre zu überleben liegt bei nur 5% ^{37,38}.

Im Gegensatz zu den frühen noch nicht metastasierten Stadien gibt es in den späteren Stadien keinen kurativen Ansatz mehr, da das Melanom auf Chemotherapie und Radiotherapie nur selten langfristig anspricht. Die derzeit von der FDA empfohlene Standardtherapie mit Dacarbazine (DTIC) führt nur in 16% der Fälle zu einem (temporären) Ansprechen³⁹. In dieser Situation besteht ein dringender Bedarf an neuen Therapiekonzepten.

Einer der neuen Ansätze ist der Einsatz von Kinase-Inhibitoren, welche spezifisch die in den Tumorzellen mutierte Form einer Kinase blockieren (z. B. PLX4032/ Vemurafenib gegen das im MM mutierte Braf V600E). Vemurafenib führte zwar in ersten klinischen Studien zu beeindruckenden Tumorregressionen von bis zu 70%, das Gesamt-Überleben der Patienten wurde allerdings nicht verlängert, da sich in den meisten Fällen nach kurzer Zeit resistente Formen des Tumors entwickelten, die dann z.T. noch schneller und aggressiver wuchsen⁴⁰.

Das generelle Problem in der Therapie des MM scheint in der großen genetischen Variabilität der Tumorzellen zu liegen. Die meist als Monotherapie eingesetzten Chemotherapeutika können die Tumorlast kurzfristig verringern, aber sie üben auch einen eher punktuellen Selektionsdruck aus, der einen u.U. sogar aggressiver wachsenden Teil der Tumorzellen begünstigt.

Die einzige Möglichkeit das Überleben der Patienten langfristig zu verlängern oder das MM zu heilen ist daher eine Therapie, welche die Heterogenität der Tumorzellen berücksichtigt und sich optimalerweise mit der zeitlichen Variabilität der Tumorzellen mitentwickelt. Diese Form der therapeutischen "Coevolution" kann das Immunsystem leisten, da auch die ständig bekämpften mikrobiellen Pathogene eine hohe genetische Variabilität aufweisen.

Ein hoffnungsvoller Ansatz zur Therapie des MM sind daher unterschiedliche Formen der Immuntherapie, die zum Teil schon standardmäßig eingesetzt (z.B. Gabe von Interferon) oder in verschiedensten klinischen Studien getestet werden. Neben der unspezifischen Stimulation des Immunsystems mit Zytokinen wie Interferon und IL2 oder immunaktivierenden Substanzen aus der Gruppe der TLR-Agonisten zielen viele Studien auf eine spezifische Aktivierung der T-Zellen des Immunsystems durch Vakzinierung des Patienten gegen verschiedene Tumorantigene ab. Die Tumorantigene werden dabei in den verschiedensten Formen, vom einzelnen definierten Peptid aus einem einzigen Antigen, über ganze Proteine bis hin zu Tumorzell-Lysaten mit einer komplexen Mischung verschiedenster Antigene, verwendet. Die Antigene werden pur oder in Verbindung mit einem Adjuvants verabreicht oder auf vorher gewonnene APCs geladen und dann injiziert. Auch die Möglichkeit nicht das Antigen selbst, sondern nur die kodierende Information in Form von RNA oder DNA zu

verwendet wird genutzt. In den meisten Fällen kann nach der Vakzinierung die Induktion tumorspezifischer T-Zellen im Patienten nachgewiesen werden, aber der klinische Erfolg dieser Art von Immuntherapie war bislang kaum höher als mit den Standardtherapien ⁴¹.

Der erste Durchbruch einer für viele Patienten zugänglichen Immuntherapie gelang kürzlich mit Ipilimumab, einem therapeutischen blockierenden Antikörper gegen CTLA4, einem Rezeptor der die Aktivierung von T-Zellen des Immunsystems hemmt (siehe dazu auch Abschnitt Costimulation und Coinhibition). Im Gegensatz zu den oben erwähnten spezifischen Vakzinierungen handelt es sich bei Ipilimumab um eine unspezifische generell immunaktivierende Therapie. Es werden lediglich präexistente vorher blockierte T-Zell-Antworten wieder zugelassen. Die deutliche Verlängerung des Überlebens einiger Patienten (ca. 20%) zeigt wie wichtig die Immunsuppression für das Wachstum von Tumoren sein kann. Die Wirkung von Ipilimumab erfolgte allerdings auf Kosten zum Teil massiver Autoimmun-Nebenwirkungen in bis zu 15% der Patienten welche in 2,1% der Fälle sogar zum Tod des Patienten führten ⁴².

Das Beispiel Ipilimumab verdeutlicht jedoch, dass die Immuntherapie das Mittel der Wahl ist um das Überleben der Patienten zu verlängern oder sie vielleicht sogar zu heilen. Voraussetzung dafür ist allerdings ein tieferes Verständnis der Beziehungen zwischen Immunsystem und Tumor, um gezielter Ansätze ohne massive Nebenwirkungen zu entwickeln.

1.2.3. Immunogenität des Malignen Melanoms

Das MM zählt zu den besonders immunogenen Tumoren. Die Beobachtung von spontanen Regressionen von Primärtumoren und auch MM-Metastasen, die auf aktivierte T-Zellen des Immunsystems zurückzuführen sind und die massive Infiltration von T-Zellen in MM-Metastasen belegen dies ⁴³. Eine weitere Beobachtung, die die Immunogenität des MM eindrucksvoll verdeutlicht, ist dass tumorinfiltrierende T-Zellen, die isoliert und in vitro mit IL2 kultiviert wurden, häufig effektiv autologe Tumorzellen lysieren können. Viele der bekannten Tumor-assoziierten Antigene (TAA) und daraus abgeleitete Epitope wurden im MM identifiziert ^{44,45}.

1.3. Das kutane Lymphom - ein weiterer in dieser Arbeit untersuchter Tumor

Das kutane Lymphom beruht auf der malignen Entartung lymphatischer Zellen, wobei primär die Haut Ort des Krankheitsgeschehens ist. Je nach Ursprung der entarteten Zelle unterscheidet man T- und B-Zell-Lymphome, wobei im Folgenden nur auf die T-Zell-Lymphome eingegangen werden soll. Da es sich bei den T-Zell-Lymphomen normalerweise um einen einzelnen T-Zell-Klon handelt, ist es möglich die Tumorzellen von den restlichen gesunden T-Zellen zu unterscheiden, wenn die vom Tumorzell-Klon genutzte V-beta-Kette des TCR bekannt ist. Die Bestimmung der entsprechenden V-beta-Kette wird meist im Rahmen der Lymphom-Diagnostik durchgeführt⁴⁶. Generell kann festgestellt werden, dass das kutane T-Zell-Lymphom im Gegensatz zum Malignen Melanom vorwiegend bei älteren Menschen auftritt. Bei den kutanen T-Zell-Lymphomen (CTCL, engl. cutaneous T cell lymphoma) unterscheidet man verschiedene Entitäten.

1.3.1. Mycosis Fungoides

Mycosis Fungoides (MF) ist das häufigste kutane T-Zell-Lymphom und ist von einer eher niedrigen Malignität gekennzeichnet. Der Krankheitsverlauf gliedert sich in verschiedene als Hautmanifestation erkennbare Stadien: Ekzem -> Plaque -> Tumor, wobei im weiterentwickelten Stadium auch die Manifestationen der früheren Stadien weiter bestehen. Bei der Erkrankung kann es auch zu spontanen Rückbildungen einzelner Herde kommen. Meist schreitet die Erkrankung im Lauf vieler Jahre voran, bis zum Befall weiterer Organe⁴⁷.

1.3.2. Sézary-Syndrom

Das Sézary-Syndrom zeichnet sich durch eine besonders hohe Malignität aus. Die entarteten T-Zellen stellen sich histologisch/ phänotypisch ähnlich dar wie die Zellen der MF, allerdings beschränkt sich das Vorkommen der Sézary-Zellen nicht nur auf die Haut (Red-Man-Syndrom), sondern die Tumorzellen sind auch als leukämische Manifestation im Blut der Patienten zu finden. In späteren Stadien können die Sézary-Zellen den größten Teil der im Blut vorhandenen Lymphozyten stellen⁴⁸.

1.3.3. Weitere Formen des kutanen T-Zell Lymphoms

Neben MF und Sézary-Syndrom gibt es noch weitere eher seltene Ausprägungen des CTCL. Dazu wird zum Teil auch die Lymphomatoide Papulose gezählt, aber auch andere z.B.

großzellige Formen, bei denen zwischen CD30 positiven Tumoren mit geringer Malignität und CD30 negativen Tumoren mit hoher Malignität unterschieden wird⁴⁹.

1.4. Natürliche Anti-Tumor Immunantwort und immuntherapeutische Ansätze

Das Immunsystem spielt bei Tumorerkrankungen eine wichtige Rolle. Es gibt viele Hinweise darauf, dass ein intaktes Immunsystem der Tumorentstehung entgegenwirken kann. So ist zum Beispiel das Risiko einen Tumor zu entwickeln von immunsupprimierten organtransplantierten Patienten deutlich höher als in nicht immunsupprimierten Menschen der gleichen Altersgruppe^{50,51}. Das Risiko für nicht-melanozytären Hautkrebs, Kaposi-Sarkom und Non-Hodgkin-Lymphom ist 20-fach erhöht, das für Nierenzell-Karzinom 15-fach und auch das Risiko für Melanom, Leber- und Cervixkarzinom steigt während der Immunsuppression um das fünffache. Auch Dauer und Dosierung der Immunsuppressiva wirken sich auf das Krebsrisiko aus. So bekommen Herztransplantierte, die die höchste Dosierung bekommen, häufiger Krebs als zum Beispiel Nierentransplantierte mit meist geringerer Dosis der Immunsuppressiva⁵².

Klinische, histologische sowie zellulär- immunologische Untersuchungen lassen darauf schließen, dass zumindest zeitweise eine intensive Auseinandersetzung zwischen Immunsystem und Tumor stattfindet. Diese Auseinandersetzung scheint aber beim Melanom oft nicht erfolgreich zu sein. Seit 1866 wurden nur 76 Fälle bekannt, in denen ein manifestes MM spontan und potentiell immunologisch bedingt in Regression ging⁴³, wobei die Dunkelziffer der spontanen Regressionen sehr hoch sein dürfte, da diese auftretenden und wieder verschwindenden Tumore oft erst gar nicht diagnostiziert werden.

Viele derzeit durchgeführte klinische Ansätze haben eine unspezifische allgemeine Aktivierung des Immunsystems zum Ziel. Zum Beispiel mittels stimulierender Zytokine wie IL2 und IFN α (Interferon alpha), Immunaktivatoren wie TLR-Agonisten oder der Inhibierung negativ regulierender Faktoren durch den Anti-CTLA-4 Antikörper Ipilimumab oder Ontak welches Regulatorische T-Zellen eliminieren soll⁵³.

Daneben gibt es auch die Möglichkeit, das Immunsystem gezielt gegen den Tumor zu richten. Eine Vielzahl von Immunisierungsstrategien unter Verwendung von Peptiden, Proteinen, rekombinanten Viren, kodierenden RNA oder DNA Konstrukten oder Antigen-beladenen dendritischen Zellen wurden oder werden in klinischen Studien erprobt. Bei vielen dieser Studien konnten in den Patienten tumorreaktive T-Zell-Antworten nachgewiesen werden⁵⁴⁻⁵⁷. Vereinzelt klinische Erfolge mit Immuntherapien bei Melanompatienten lassen auf eine Effektivität der Melanom-spezifischen T-Zellen schließen. Dennoch blieben die klinischen

Ansprechraten bislang hinter den Erwartungen zurück. Grund dafür könnten die im Tumor vorhandenen immunsuppressiven Mechanismen sein.

1.5. Immunsuppressive Mechanismen im Tumor

Trotz der vielfach nachgewiesenen tumorspezifischen Immunzellen ist in den meisten Fällen ein Progress der Tumorerkrankung zu beobachten. Der Tumor entsteht und wächst in Gegenwart eines weitgehend intakten Immunsystems. Einen Hinweis für eine lokale Immunsuppression im Tumor liefert die Beobachtung, dass durch Vakzinierung induzierte CTL im Blut von Patienten funktionell sind, solche im Tumor aber nicht⁵⁸. In der Literatur werden verschiedene mögliche Ursachen diskutiert. Eine Übersicht ist in Abb. 2 gezeigt und die wichtigsten Mechanismen werden im folgenden Kapitel beschrieben.

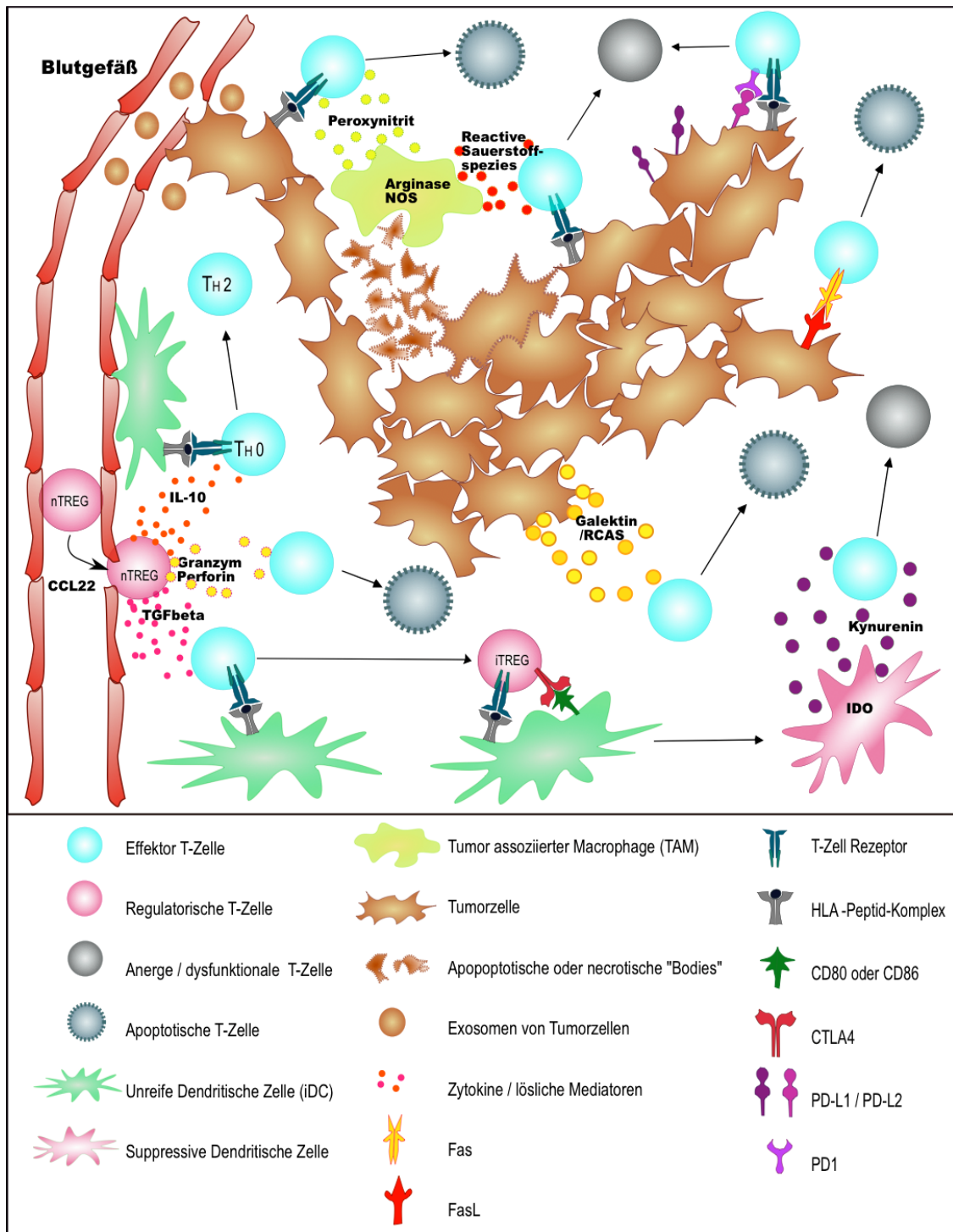


Abb. 2 Übersicht der wichtigsten bislang bekannten Mechanismen der Immunsuppression in der Tumormikroumgebung (Abb. aus Gross, 2006⁵⁹). Darunter die Einwanderung von nTregs ins Gewebe, sowie die Induktion von iTregs und deren Wirkung. Daneben ist die Wirkung verschiedener löslicher Mediatoren und membranständiger Liganden von Tumorzellen auf die im Tumor vorhandenen Effektorzellen gezeigt.

1.5.1. Anergie der T-Zellen

Anergie ist ein Zustand, in dem T-Zellen zwar vital aber nicht mehr in der Lage sind, nach TCR-Stimulation Effektorfunktionen zu entwickeln oder zu proliferieren⁶⁰. Neben dem Begriff der Anergie werden in der Literatur auch andere Begriffe wie Seneszenz oder "Exhaustion" (Erschöpfung) verwendet, die sich alle auf das gleiche Phänomen der dysfunktionalen T-Zelle beziehen.

Experimentell kann Anergie in naiven T-Zellen durch hohe Dosen eines Antigen, orale oder intravenöse Gabe ohne Adjuvantien oder durch direkte TCR- Stimulation mit einem CD3-Antikörper ohne weitere Costimulation induziert werden⁶¹.

Auch im Rahmen chronischer Infektionen wie z.B. Hepatitis B und C oder auch HIV wurde eine Dysfunktionalität der T-Zellen beschrieben, die in diesem Kontext meist als "Exhaustion" bezeichnet wird⁶²⁻⁶⁴. Ursache ist hier die ständige Stimulation der spezifischen T-Zellen durch das persistierende Antigen. Aber auch fehlende Costimulation oder das Vorhandensein von Coinhibitor (siehe dazu Kapitel 1.5.3) können für die Induktion von Anergie in T-Zellen verantwortlich sein.

Die zugrundeliegenden Mechanismen sind vielfältig und noch nicht aufgeklärt. So wird beispielsweise die Inhibition des MAP-Kinase-Weges nach TCR-Stimulation sowie eine resultierende Blockade des Zellzyklus in der G1 Phase beobachtet^{65,66}.

Daneben wird aber auch die Degradierung der ζ -Ketten des TCR, die für die Signaltransduktion essentiell sind als möglicher Mechanismus diskutiert. Diese Art der Dysfunktionalität von T-Zellen wurde schon für verschiedene Tumorentitäten gezeigt, darunter Colon-Karzinom und Kopf-Hals-Tumore^{67,68}. Die Degradierung kann durch verschiedene Metaboliten und Oxidantien induziert werden, darunter beispielsweise Stickstoffmonoxid (NO) und Wasserstoffperoxid, aber auch Prostaglandin E2 aus dem Arachidonsäure-Stoffwechsel. Diese Verbindungen können von Makrophagen und Myeloiden Suppressorzellen (MSC - engl. Myeloid suppressor cell) sezerniert werden. Der Mechanismus der Degradierung ist allerdings noch nicht bekannt^{69,70}.

1.5.2. Regulatorische T-Zellen (Treg)

Tregs können die Aktivität anderer Immunzellen unterdrücken und so Immunantworten limitieren⁷¹. Ihre Hauptaufgabe liegt in der Kontrolle von APCs und der kontrollierten Produktion von inflammatorischen Zytokinen. Andere Subtypen können TGF β sezernierenden oder kontaktabhängig inhibieren.

Untersuchungen im Mausmodell zeigten, dass die TCRs von Tregs oft eine hohe Affinität für Autoantigene besitzen⁷². Da es sich beim Großteil der Tumorantigene um Autoantigen handelt ist davon auszugehen, dass Tregs eine wichtige Rolle in der Tumorimmunologie spielen. Als erster Beleg dafür im Menschen wurden Tregs in Melanompatienten identifiziert die eine Reihe von TAA wie NY-ESO-1, gp100 und TRP1 erkennen^{73,74}. Tregs können unter dem Einfluß des Chemokin-Liganden 22 (CCL22) ins Gewebe, wie z.B. auch in Tumore migrieren⁷⁵.

Tregs werden in zwei Gruppen eingeteilt, die zentral gebildeten natürlichen Tregs (nTregs) und die in der Peripherie durch verschiedene Mechanismen induzierten Tregs (iTregs). Beiden Gruppen gemein ist die Expression des Transkriptionsfaktors FoxP3, der für diese Art von Zellen essentiell ist^{76,77}. Die Bedeutung von FoxP3 für die Funktionalität von Tregs zeigt sich vor allem bei einer beim Menschen vorkommenden Mutation im für FoxP3 codierenden Gen, die zu IPEX (immunodysregulation, polyendocrinopathy and enteropathy, X-linked syndrome), einer schweren Autoimmunerkrankung, führt⁷⁸.

nTregs machen etwa 0,5 bis 2% der peripheren CD4+ T-Zellen des Menschen aus. Sie werden im Thymus gebildet und können über lange Zeiträume im Körper persistieren ohne ihre suppressorischen Fähigkeiten einzubüßen. Phänotypisch werden sie als CD25^{high}, FoxP3⁺, CTLA4⁺ sowie CD127⁻ charakterisiert^{20,79}.

iTregs können beispielsweise durch Aktivierung in Gegenwart von TGF β (engl. Tumor growth factor beta) oder IL10 (Interleukin 10) entstehen. Der Phänotyp von iTregs ist ebenfalls durch die hohe Expression von CD25 und das Vorhandensein von FoxP3 gekennzeichnet. Weitere eindeutige Marker sind allerdings bislang nicht identifiziert, so dass eine direkte Abgrenzung zu den nTregs phänotypisch nicht möglich ist. Interessant ist, dass der iTreg-Status einer CD4-T-Zelle reversibel ist, anders als bei nTregs. Wird eine iTreg aus dem iTreg-induzierenden Milieu entfernt, so verliert sie ihre suppressorischen Fähigkeiten und auch den charakteristischen FoxP3-positiven Phänotyp⁷⁷. Die Gruppe der iTregs ist relativ heterogen und es sind Zellen mit verschiedenen Funktionsweisen beschrieben, die teilweise, wie die Tr1-Zellen, als eigener Subtyp definiert werden. Tr1-Zellen können zum Beispiel durch IL-10 induziert werden und sezernieren dieses immunsupprimierende Zytokin dann auch und inhibieren so die Proliferation von naiven T-Zellen^{80,81}. Inwiefern es sich allerdings tatsächlich um definierte Subtypen oder nur um temporäre funktionelle Differenzierungen handelt ist noch nicht geklärt.

Auch die Rolle der antigen-spezifität bei der Treg-vermittelte Suppression von Effektor-T-Zellen sowie die jeweils zu Grunde liegenden Mechanismen sind noch Gegenstand intensiver

Forschung. Die Suppression kann beispielsweise durch die Sekretion löslicher Mediatoren wie IL10 , IL35 (Interleukin 35) oder TGF β erfolgen ⁸². Durch diese Zytokine können zusätzlich noch weitere iTregs induziert werden.

Der ursprünglich angenommene Mechanismus der Suppression beruht auf der starken Expression der hochaffinen IL-2 Rezeptoruntereinheit CD25. Es wurde angenommen, dass dadurch die lokale Konzentration des für T-Zellen wichtigen Zytokins IL-2 abgesenkt wird ⁸³. Die Bedeutung dieses Mechanismus ist aber mittlerweile aufgrund der vielen neu entdeckten Mechanismen in den Hintergrund getreten.

So konnte gezeigt werden, dass Tregs auch durch direkte Granzym- und Perforin-vermittelte Zytolyse von Effektor-T-Zellen wirken können ^{84,85}. Daneben sind aber auch noch andere Mechanismen, die direkten Zell-Zell-Kontakt benötigen, aber nur die Suppression aber nicht Deletion der Zielzelle bewirken, bekannt ^{86,87}.

Auch die Beeinflussung Antigenpräsentierender Zellen mittels CTLA4 kann zur Suppression von Effektor-T-Zellen beitragen (siehe dazu Kapitel 1.5.3.2).

1.5.3. Costimulation und Coinhibition

Da der Prozeß der klonalen Deletion im Thymus nicht vollständig ist, so dass auch potentiell autoreaktive T-Zellen in die Peripherie gelangen können, müssen diese Zellen durch verschiedene Mechanismen der peripheren Toleranz kontrolliert werden. Es liegt nahe, dass die Kontrolle dieser Mechanismen eine zentrale Rolle bei der Aufrechterhaltung der Toleranz gegen "Selbst" bei gleichzeitiger Ermöglichung effizienter Immunantworten hat.

Nach dem Priming reagieren T-Zellen primär auf das spezifische Signal durch die TCR - Peptid/HLA - Interaktion. Die Intensität des TCR-vermittelten Signals hängt dabei stark von der monovalenten Affinität sowie der multivalenten avidität des TCR zum entsprechenden Peptid/ HLA-Komplex sowie der Antigen-Dichte auf der Zielzelle ab. Weitere Signale der Zielzelle oder lösliche Mediatoren aus der Umgebung können lediglich den Schwellenwert für das Auslösen einer Effektor-Aktion beeinflussen, was vor allem bei schwächeren TCR-Signalen eine entscheidende Rolle spielen kann. Die Balance zwischen costimulatorischen oder coinhibitorischen Signalen kann also die Antwort von T-Zellen die nur ein schwaches TCR-Signal bekommen (z.B. aufgrund niedriger Affinität oder geringer Expression des Antigens) entscheidend beeinflussen.

Da es sich beim Großteil der Tumorantigene um Selbstantigene handelt, ist davon auszugehen, dass die hochaffinen T-Zellen durch die klonale Deletion im Thymus eliminiert werden und tumorspezifische T-Zellen überwiegend niederaffine TCRs besitzen.

Eine verstärkte Präsenz coinhibitorischer Signale in der Mikroumgebung von Tumoren wird daher als eine der Ursachen für unzureichende Anti-Tumor-Immunantworten trotz vorhandener T-Zellen angesehen⁸⁸. In der vorliegenden Arbeit wird auf zwei wichtige coinhibitorische Rezeptoren im besonderen eingegangen: PD1 (Programmed Death 1) und CTLA4 (Cytotoxic T cell Antigen 4). In Abb. 3 sind die wichtigsten coinhibitorischen Rezeptoren und ihre Liganden aus der B7-Familie, soweit bekannt, dargestellt. Zu beachten ist, dass bislang nur CTLA4 und PD1 als coinhibitorische Rezeptoren auf der T-Zell-Seite identifiziert wurden. Die entsprechenden Rezeptoren zu B7-H3 und B7-H4 sind weiterhin noch nicht identifiziert.

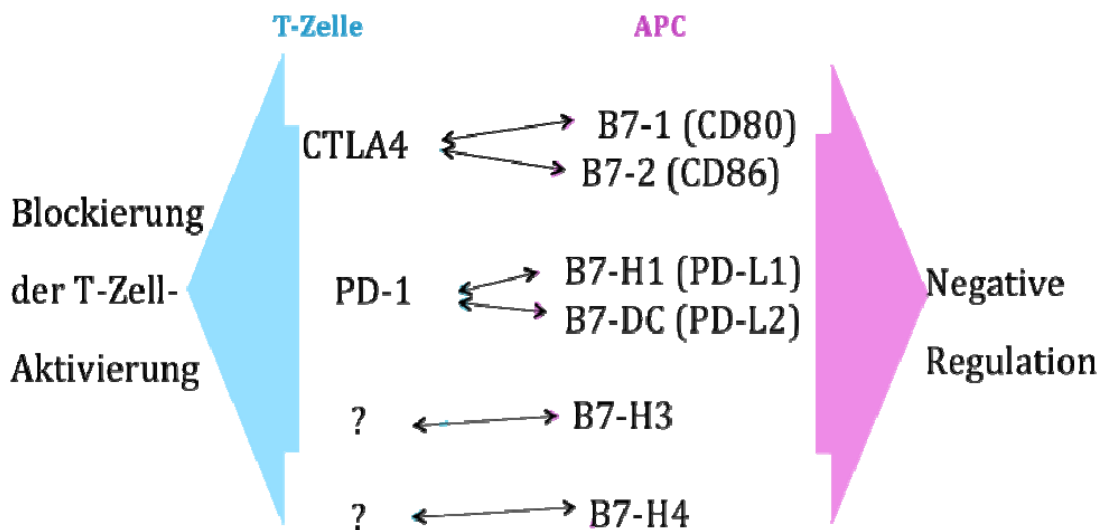


Abb. 3 Übersicht der wichtigsten in dieser Arbeit untersuchten coinhibitorischen Rezeptor-Ligand-Interaktionen zwischen T-Zellen und Antigenpräsentierenden Zellen (APC).

1.5.3.1. PD1

Der coinhibitorische Rezeptor PD1 gehört zur Immunglobulin Superfamilie. Die Expression von PD1 auf T-Zellen ist nicht konstitutiv, sondern kann durch verschiedene bisher noch nicht genau bekannte Faktoren induziert werden. Bisher ist bekannt, dass PD1 vor allem auf dysfunktionellen und/ oder tolerierten T-Zellen exprimiert ist. Diese Daten stammen aus der Untersuchung von virus-spezifischen T-Zellen im Umfeld chronischer viraler Infektionen wie

HIV und Hepatitis B und C⁸⁹⁻⁹¹. In einzelnen Arbeiten wurde die Expression von PD1 auch auf tumorinfiltrierenden T-Zellen nachgewiesen und mit einer schlechten klinischen Prognose assoziiert. Aufgrund dieser Beobachtungen wurde ein therapeutischer Antikörper, der PD1 blockiert, und auch blockierende Antikörper gegen die Liganden von PD1 entwickelt; erste klinische Studien laufen.

Als Liganden für PD1 wurden bislang PD-L1 (auch B7-H1) und PD-L2 (auch B7-DC) aus der B7-Rezeptor-Familie identifiziert. B7-H1 wird auf verschiedenen Typen von APC, auf Keratinozyten und besonders stark auch in immunprivilegierten Regionen des Körpers (z.B. Auge und Plazenta) exprimiert. Die Expression kann durch Interferone noch gesteigert werden. B7-DC wird konstitutiv nur in der immunprivilegierten Plazenta exprimiert. Zusätzlich wurde eine induzierte Expression in Makrophagen und bestimmten Dendritischen Zellen (DC) beschrieben^{92,93}. Die Expression der beiden PD1 Liganden wurde auch schon in verschiedenen Tumoren beschrieben und korrelierte in vielen Fällen mit einer schlechten Prognose für den Patienten⁹⁴⁻⁹⁷.

1.5.3.2. CTLA4

CTLA4 ist ein coinhibitorischer Rezeptor, der seine beiden Liganden B7-1 (auch CD80) und B7-2 (auch CD86) mit dem costimulatorischen Rezeptor CD28 teilt. CTLA4 hat allerdings eine deutlich höhere Affinität für die beiden Liganden als CD28⁹⁸⁻¹⁰⁰. Wenn CTLA4 exprimiert wird, dann verdrängt also sein inhibitorisches Signal das stimulierende Signal von CD28. Im Gegensatz zu CD28, was auf 90% der CD4+ und 50-80 % der CD8 T-Zellen exprimiert ist¹⁰¹, wird die Oberflächenexpression von CTLA4 strikt reguliert. In den meisten T-Zellen liegt CTLA4 intrazellulär vor, kann aber bei Bedarf schnell mobilisiert und kurzfristig an die Oberfläche gebracht werden, um überschießende Immunantworten zu blockieren. Lediglich eine kleine Subpopulation von regulatorischen T-Zellen exprimiert CTLA4 konstitutiv an der Oberfläche¹⁰²⁻¹⁰⁴.

Die Interaktion von CTLA4 mit seinen Liganden bewirkt bidirektionale Signale, das heißt auch die Zelle die die Liganden exprimiert (z.B. eine dendritische Zelle) reagiert. Es konnte gezeigt werden, dass die Interaktion von CTLA4 und B7-1 oder B7-2 auf einer dendritischen Zelle (DC) diese zu einer tolerogenen Dendritischen Zellen machen kann. So tolerogenisierte DCs exprimieren verstärkt das Enzym IDO, welches Tryptophan in immunsuppressives Kynurenin umwandelt, und können so ihrerseits weitere T-Zellen beeinflussen¹⁰⁵.

Aufgrund seiner zentralen Rolle in der Aufrechterhaltung der Toleranz gegen "Selbst" und der Suppression von Anti-Tumor-Immunantworten wurde ein therapeutischer blockierender

Antikörper gegen CTLA4 unter dem Handelsnamen Ipilimumab entwickelt. Aufgrund erster beeindruckender Erfolge in klinischen Studien wurde Ipilimumab zur Behandlung des MM kürzlich von der FDA wie auch in Europa zugelassen. Neben der guten Wirkung in etwa 20% der Patienten kam es aber auch verstärkt zu starken, mitunter unkontrollierbaren Autoimmun-Nebenwirkungen, die bei einigen Patienten sogar zum Tod führten^{42,106}.

1.5.3.3. Weitere coinhibitorische Rezeptoren und deren Liganden

Neben PD1 gibt es noch einen weiteren Rezeptor aus der Immunglobulin Superfamilie, der coinhibitorisch auf T-Zellen wirkt; BTLA (B and T lymphocyte attenuator). Anders als PD1 hat BTLA aber keinen Liganden aus der B7-Familie. Ein möglicher Ligand ist HVEM (Herpes Virus entry mediator). Ob HVEM allerdings wirklich der physiologische Ligand ist oder es noch einen weiteren bislang unbekanntem Liganden gibt, ist bislang unklar. Ob BTLA auch in der tumorvermittelten Immunsuppression eine Rolle spielt wird zurzeit noch kontrovers diskutiert. Eine Expression von BTLA auf T-Zellen von Patienten mit Lungenkrebs konnte allerdings gezeigt werden¹⁰⁷⁻¹⁰⁹.

Neben B7-H1 und B7-DC, den Liganden von PD1 und B7-1 und B7-2, den Liganden von CTLA4, sind noch zwei weitere Vertreter der B7-Familie beschrieben, B7-H3 und B7-H4, die ebenfalls coinhibitorische Signale an T-Zellen übermitteln¹¹⁰⁻¹¹². Die zugehörigen Rezeptoren auf T-Zellen sind allerdings bisher noch nicht identifiziert worden.

2. Zielsetzung

Verschiedene immunsuppressive Mechanismen, die eine effektive Anti-Tumor Immunantwort verhindern können sind bekannt, aber wurden meist isoliert und an verschiedenen (Maus-) Modellen bzw. in verschiedenen Tumoren untersucht. Die meisten Untersuchungen von tumorspezifischen Zellen wurden bislang an Zellen aus dem Blut von Patienten durchgeführt. Phänotyp und Verhalten von T-Zellen, die Tumore infiltrieren, wurden kaum untersucht.

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, die aus diesen einzelnen Arbeiten ableitbaren Hypothesen der Immunsuppression auf ihre Gültigkeit im Malignen Melanom des Menschen zu testen. Dazu wurden Phänotyp und Eigenschaften von tumorinfiltrierenden T-Zellen in Melanometastasen von Patienten analysiert und mit denen aus dem peripheren Blut von Patienten und Gesunden verglichen.

Vorraussetzung für Hypothesen zur unzureichenden Effizienz der Immunabwehr bei manifesten Tumoren ist die Annahme, dass T-Zellen des Immunsystems prinzipiell in der Lage sind, Tumorzellen als "fremd" zu erkennen und zu eliminieren.

Folgende Hypothesen zur Immunsuppression im Malignen Melanom wurden getestet:

1. Die tumorspezifischen T-Zellen wandern nicht oder nur unzureichend in den Tumor ein.
2. Die tumorspezifischen T-Zellen im Tumor sind anerg.
3. Bei den tumorspezifischen T-Zellen handelt es sich um terminal differenzierte T-Zellen mit reduzierter Effektorfunktion.
4. Neben Effektor-T-Zellen werden auch regulatorischen T-Zellen induziert, welche dann die Immunantwort im Tumor limitieren.
5. Die T-Zellen werden durch coinhibitorische Liganden in der Tumormikroumgebung dysfunktionell.
6. Die Tumorzellen selbst inhibieren die tumorspezifischen T-Zellen durch Sekretion löslicher Faktoren oder direkten Kontakt.

Die gewonnenen Erkenntnisse können dazu beitragen, die Immuntherapie des MM in Zukunft verstärkt tumorspezifisch auszurichten und so Autoimmun-Nebenwirkungen zu umgehen und die klinische Effektivität zu erhöhen.

3. Material und Methoden

3.1. Zellmaterial und Zellkultur

Alle Zellkulturarbeiten wurden unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Die Zellen wurden im Brutschrank bei 37°C, 8% CO₂ unter wasserdampfgesättigter Atmosphäre kultiviert.

3.1.1. Puffer und Medien

Zellkultur-Medium: RPMI (Gibco), 10% hitzeinaktiviertes FCS (Biochrom), Penicillin-Streptomycin-Lösung (Invitrogen)

Einfriermedium: 90 % FCS, 10 % DMSO (Roth)

PBS fertige Lösung (ohne Kalzium und Magnesium von Gibco)

Ficoll (Amersham)

PBS/ EDTA/ Trypsin fertige Lösung, (Biochrom)

Verdau-Medium: RPMI (Gibco), CollagenaseVIII (Sigma), DNase (Sigma) Penicillin-Streptomycin-Amphotericin Lösung (Invitrogen)

3.1.2. Zytokine

Name	Abkürzung	Anbieter	verwendete Endkonzentration
Interleukin 2	IL2	Roche	50 U / ml
Interleukin 10	IL10	Peprotech	10 U / ml
Tumor-Nekrose-Faktor alpha	TNF α	PBL	800 U / ml
Interferon alpha	IFN α	Peprotech	50 U / ml
Interferon gamma	IFN γ	Peprotech	125 U / ml
Tumor growth factor beta1	TGF β	Peprotech	10 ng / ml

Tab. 2 Übersicht aller in dieser Arbeit verwendeten Zytokine

Wenn nicht anders angegeben, wurden die Zytokine zu Beginn des Zellkultur-Ansatzes zugegeben. Bei längeren Kulturzeiten wurden die Zytokine zusammen mit frischem Medium alle 3-4 Tage erneut zur Kultur gegeben.

3.1.3. Blockierende Antikörper und andere Reagenzien

Antigen	Anbieter	verwendete Endkonzentration
CTLA4	eBioscience	5 µg/ ml
PD1	eBioscience	5 µg/ ml
PD-L1	eBioscience	5 µg/ ml
PD-L2	eBioscience	5 µg/ ml

Tab. 3 Übersicht aller in dieser Arbeit verwendeten blockierenden Antikörper.

Alle für die Zellkultur verwendeten Antikörper waren nach Angabe des Herstellers steril und frei von Azid und Endotoxin.

Substanz		Ziel/ Verwendungszweck
1-Methyl-Tryptophan	Sigma	Inhibitor des Enzyms IDO (Indolamin 2,3 Dioxygenase)
PMA	Sigma	Phorbolster der die PKC (Proteinkinase C) aktiviert
Ionomycin	Sigma	Mykotoxin, dass durch Einlagerung in die Zellmembran Calciumspezifische Poren bildet und so zum Calciumeinstrom in die Zelle führt

Tab. 4 Sonstige Reagenzien zur Stimulation oder Inhibition von T-Zellen

3.1.4. Präparation von Zellen aus Blut und Gewebe von Patienten und deren Kryokonservierung

Die Isolierung von PBMC aus Patientenblut, als auch aus Blut von gesunden Probanden, erfolgte aus heparinisiertem Blut über Dichtegradientenzentrifugation auf Ficoll. Hierzu wurde in ein 50 ml Röhrchen 1/3 des Gesamtvolumens an Ficoll vorgelegt und mit 2/3 Gesamtvolumen Blut überschichtet. Anschließend wurde für 20 min und 350 x g ohne Bremse bei Raumtemperatur zentrifugiert. Die die Leukozyten enthaltende Grenzschicht wurde mit einer Transferpipette vorsichtig abgenommen und zweimal mit PBS gewaschen (Zentrifugationen 10 min bei 300 x g). Nach dem Waschen wurden die Zellen entweder in Einfriermedium eingefroren oder direkt für den jeweiligen Ansatz verwendet.

Alle verwendeten Zellen wurden in gleicher Weise kryokonserviert. Die jeweiligen Zellen wurden abzentrifugiert, der Überstand abgesaugt und das Pellet anschließend in Einfriermedium resuspendiert. Danach wurden die Zellen in Kryoröhrchen aliquotiert und diese Röhrchen über Nacht bei -80°C in speziellen Einfrierboxen gelagert, die für ein

gleichmäßiges langsames Abkühlen der Röhrchen sorgen. Für eine längere Lagerung wurden die Röhrchen in -140°C -Truhen überführt.

Nach schnellem Auftauen wurde der Inhalt eines Kryoröhrchens möglichst zügig in ein 10 ml PBS enthaltendes 15 ml Falcon-Röhrchen überführt und vermischt. Danach wurde für 10 min bei 300 g zentrifugiert, der Überstand abgesaugt und das Pellet nochmals gewaschen. Anschließend wurden die Zellen in Kultur genommen oder sofort für die entsprechenden Versuche eingesetzt.

Die Einzelzellsuspensionen des Tumorgewebes wurden aus Metastasen von Patienten mit malignem Melanom (meist Stadium III und IV) gleich nach der chirurgischen Entfernung isoliert. Nach dem Entfernen von Fett- und Bindegewebe wurden die Tumorknoten mit sterilem Skalpell und Pinzette in etwa 1mm^3 kleine Stücke geschnitten und in das Verdau-Medium überführt. Je nach ursprünglicher Konsistenz des Ausgangsmaterials wurde das Gewebe im Verdau-Medium für 45 bis 120 Minuten bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die Suspension durch einen Filter ($40\ \mu\text{M}$, BD Falcon) passagiert, um die Einzelzellsuspension von verbliebenen größeren Gewebestücken zu befreien. Danach wurden die Zellen mit PBS gewaschen. Ein Teil der erhaltenen Zellen wurde sofort in Kultur genommen um Melanomzell-Linien anzuzüchten, der Rest wurde in Aliquoten eingefroren.

3.1.5. Übersicht des in dieser Arbeit verwendeten Zellmaterials

Patienten ID	Alter (Jahre)	MM-Sub-typ	Stadium	HLA	Art der Probe	Überleben (Tage nach OP)	Multimer Analyse	sonstige durchfluss-zytometrischen Färbungen	erfolgreiche in vitro Co-kultur
ChaMel 001	67	ALM	4	A2, A28, B14, B51	T	1667 +	x	x	
ChaMel 002	68	nd	4	A2, A3, B7, B61	T	137	x	x	
ChaMel 003	58	SSM	nd	nd	T	102 +		x	
ChaMel 004	63	nd	3	nd	T	269		x	
ChaMel 006	58	nd	4	A2, B62	T	nd	x		
ChaMel 007	53	nd	3	A1, A2, B8, B57	B	46 +	x		
ChaMel 008	69	nd	3	A2, A3, B7, B62	T	1440 +	x	x	
ChaMel 009	60	nd	3	A2, A26, B55, B60	T	310		x	
ChaMel 010	54	nd	4	A2, B39, B62	T	nd	x		
ChaMel 011	64	NM	3	nd	T	512 +		x	
ChaMel 012	61	NM	4	nd	T	76 +		x	x
ChaMel 013	39	nd	4	A1, A28, B16, B44	T	nd	x		
ChaMel 014	51	LMM	4	A1, A2, B18, B39	T	nd	x	x	
ChaMel 014	51	LMM	4	A1, A2, B18, B39	B	nd	x		
ChaMel 016	54	ALM	3	A1, A29, B44, B60	T	519 +	x	x	
ChaMel 016	52	ALM	3	A1, A29, B44, B60	B	968 +	x		
ChaMel 016	53	ALM	3	A1, A29, B44, B60	T	749 +		x	
ChaMel 016	54	ALM	3	A1, A29, B44, B60	T	365 +		x	
ChaMel 017	40	NM	4	nd	T	330		x	
ChaMel 017	40	NM	4	nd	T	176		x	
ChaMel 017	41	NM	4	nd	T	34		x	
ChaMel 018	76	SSM	3	A2, A26, B7, B51	T	34 +	x	x	
ChaMel 018	76	SSM	3	A2, A26, B7, B51	B	427 +	x		
ChaMel 019	33	NM	4	A25, A32, B18	T	324 +		x	
ChaMel 019	34	NM	4	A25, A32, B18	T	43 +		x	
ChaMel 021	65	SSM	3	A2, A24, B7, B13	T	1730 +	x	x	
ChaMel 021	65	SSM	3	A2, A24, B7, B13	T	1560 +		x	
ChaMel 021	66	SSM	4	A2, A24, B7, B13	T	1395 +		x	
ChaMel 021	66	SSM	4	A2, A24, B7, B13	T	1373 +		x	
ChaMel 022	54	NM	3	A2, A28, B14, B44	T	nd	x		

Patienten ID	Alter (Jahre)	MM-Sub-typ	Stadium	HLA	Art der Probe	Überleben (Tage nach OP)	Multimer Analyse	sonstige durchfluss-zytometrischen Färbungen	erfolgreiche in vitro Co-kultur
ChaMel 022	52	NM	3	A2, A28, B14, B44	B	519 +	x		
ChaMel 023	64	SSM	3	nd	T	953 +		x	
ChaMel 023	64	SSM	3	nd	T	810 +		x	
ChaMel 025	40	nd	3	A28,A29,B44, B60	T	344 +		x	
ChaMel 026	43	UM	4	nd	T	236 +		x	
ChaMel 029	75	UM	4	A2, A3, B7, B35	T	772 +	x	x	
ChaMel 029	75	UM	4	A2, A3, B7, B35	B	760 +	x		
ChaMel 030	67	SSM	3	A2, A3, B7, B8	T	552	x	x	
ChaMel 030	68	SSM	3	A2, A3, B7, B8	T	180	x		
ChaMel 030	86	SSM	3	A2, A3, B7, B8	T	nd	x		
ChaMel 031	77	NM	4	A1, A2, B8, B38	T	263		x	
ChaMel 035	61	nd	nd	nd	T	1677 +		x	
ChaMel 038	66	SSM	3	A1, A3, B35, B62	T	128 +		x	
ChaMel 039	49	SSM	3	A1, B8	T	774		x	
ChaMel 039	50	SSM	3	A1, B8	T	461		x	
ChaMel 041	43	SSM	4	A1, A11, B35, B57	T	257		x	x
ChaMel 042	56	nd	4	A3, A28, B7, B51	T	897 +		x	
ChaMel 042	56	nd	4	A3, A28, B7, B51	T	807 +		x	
ChaMel 042	56	nd	4	A3, A28, B7, B51	T	780 +		x	
ChaMel 043	65	NM	4	A1, A24, B7, B8	T	1904 +		x	
ChaMel 044	42	NM	4	nd	T	354		x	
ChaMel 045	73	SSM	3	A1, A26, B37, B41	T	1185 +		x	
ChaMel 045	75	SSM	3	A1, A26, B37, B41	T	781 +		x	
ChaMel 045	75	SSM	4	A1, A26, B37, B41	T	540 +		x	
ChaMel 047	61	SSM	3	nd	T	624 +		x	
ChaMel 049	64	nd	nd	A1, A25, B44	T	454		x	
ChaMel 049	64	nd	nd	A1, A25, B44	T	225		x	
ChaMel 050	41	SSM	4	A2, A24, B7, B60	T	89 +	x	x	
ChaMel 050	41	SSM	4	A2, A24, B7, B60	T	129 +		x	
ChaMel 052	43	ALM	3	A2, B7, B15	T	749	x		
ChaMel 052	43	ALM	3	A2, B7, B15	B	749	x		
ChaMel 053	70	NM	4	A24,A30,B13, B35	T	516 +		x	
ChaMel 055	50	nd	4	A1, A2, B37, B44	T	150	x	x	
ChaMel 055	50	nd	4	A1, A2, B37, B44	T	53		x	
ChaMel 057	71	SSM	3	nd	T	1177 +		x	
ChaMel 057	74	SSM	3	nd	T	186 +		x	
ChaMel 058	37	LMM	3	A11,A29,B44, B51	T	694		x	
ChaMel 059	30	nd	4	nd	T	69		x	
ChaMel 059	30	nd	4	nd	T	39		x	
ChaMel 060	75	SSM	3	A11, B27, B51	T	517		x	
ChaMel 060	76	SSM	3	A11, B27, B51	T	137		x	
ChaMel 061	70	NM	3	A2, A24, B39, B62	T	2010 +	x	x	
ChaMel 062	37	nd	3	nd	T	185 +		x	
ChaMel 065	69	NM	4	nd	T	362 +		x	
ChaMel 067	49	SSM	3	nd	T	1410 +		x	
ChaMel 067	49	SSM	4	nd	T	1347 +		x	
ChaMel 071	46	nd	4	A1, A3, B7, B8	T	nd	x		
ChaMel 072	61	SSM	3	A3, A26, B7, B51	T	1510 +	x		
ChaMel 073	84	SSM	4	nd	T	96 +		x	
ChaMel 074	65	NM	3	A2	T	543 +	x	x	
ChaMel 077	46	nd	4	A3, B5, B8,	T	503 +		x	
ChaMel 080	32	SSM	4	A24, A32, B14	T	419		x	
ChaMel 080	33	SSM	4	A24, A32, B14	T	292		x	
ChaMel 080	33	SSM	4	A24, A32, B14	T	169		x	
ChaMel 080	34	SSM	4	A24, A32, B14	T	12		x	
ChaMel 081	62	SSM	4	A23,A28,B44, B49	T	107		x	
ChaMel 081	62	SSM	4	A23,A28,B44, B49	T	51		x	
ChaMel 082	68	SSM	4	nd	T	187 +		x	
ChaMel 083	46	NM	3	nd	T	145 +		x	
ChaMel 084	70	NM	3	A11, A24, B8, B51	T	246		x	x
ChaMel 084	70	NM	3	A11, A24, B8, B51	T	246		x	
ChaMel 085	77	NM	nd	nd	T	858 +		x	
ChaMel 085	77	NM	nd	nd	T	808 +		x	
ChaMel 086	34	nd	4	nd	T	169 +		x	
ChaMel 087	25	NM	3	A3, B7, B35	T	494 +		x	
ChaMel 087	26	NM	3	A3, B7, B35	T	108 +		x	
ChaMel 091	39	SSM	3	nd	T	284		x	x
ChaMel 091	40	SSM	3	nd	T	185		x	
ChaMel 094	62	NM	3	nd	T	213 +		x	
ChaMel 096	76	NM	3	A3, A11, B51, B61	T	1393 +		x	
ChaMel 096	77	NM	3	A3, A11, B51, B61	T	1018 +		x	
ChaMel 096	78	NM	4	A3, A11, B51, B61	T	862 +		x	
ChaMel 098	93	SSM	4	A1, A2, B8, B51	T	423 +		x	
ChaMel 099	61	SSM	4	A1, A2, B27, B38	T	36		x	
ChaMel 100	61	nd	nd	A11,A32,B35, B51	T	343 +		x	

Patienten ID	Alter (Jahre)	MM-Sub-typ	Stadium	HLA	Art der Probe	Überleben (Tage nach OP)	Multimer Analyse	sonstige durchfluss-zytometrischen Färbungen	erfolgreiche in vitro Co-kultur
ChaMel 100	62	nd	nd	A11,A32,B35, B51	T	223 +		x	x
ChaMel 101	64	nd	4	A24, A29, B7	T	nd	x		
ChaMel 101	nd	nd	4	A24, A29, B7	B	nd	x		
ChaMel 104	49	nd	nd	A2, A3, B7, B57	B	nd	x		
ChaMel 106	45	nd	4	A2, A3, B7, B35	T	780 +	x	x	
ChaMel 107	68	nd	4	nd	T	187 +		x	
ChaMel 108	74	NM	3	nd	T	986 +		x	
ChaMel 109	66	SSM	3	A24,A28,B56,B61	T	951		x	
ChaMel 109	67	SSM	3	A24,A28,B56, B61	T	624		x	
ChaMel 109	67	SSM	3	A24,A28,B56, B61	T	602		x	
ChaMel 110	32	SSM	3	A1, A2, B8, B50	T	353		x	
ChaMel 110	33	SSM	3	A1, A2, B8, B50	T	329		x	
ChaMel 110	33	SSM	4	A1, A2, B8, B50	T	224		x	
ChaMel 111	53	ALM	3	nd	T	246 +		x	
ChaMel 112	71	NM	3	A3, A28, B7,	T	702 +		x	
ChaMel 113	49	SSM	4	A2, A3, B13, B35	T	593 +	x		
ChaMel 114	61	nd	3	A3, B7,	T	952 +	x		x
ChaMel 115	76	nd	3	nd	T	386		x	
ChaMel 117	77	nd	nd	A2, A3, B51	T	nd	x		
ChaMel 117	77	nd	nd	A2, A3, B51	B	nd	x		
ChaMel 118	67	NM	3	A3, A11, B8, B35	T	1727 +		x	
ChaMel 119	67	nd	3	A2, B44, B57	T	339 +	x	x	
ChaMel 121	58	NM	nd	nd	T	545 +		x	
ChaMel 121	58	NM	nd	nd	T	526 +		x	
ChaMel 121	59	NM	nd	nd	T	324 +		x	
ChaMel 121	70	SSM	4	nd	T	12 +		x	
ChaMel 122	41	NM	3	nd	T	1291 +		x	
ChaMel 123	38	nd	nd	nd	T	88 +		x	
ChaMel 124	43	ALM	3	nd	T	723		x	
ChaMel 126	61	ALM	3	nd	T	284		x	
ChaMel 126	61	ALM	3	nd	T	188		x	
ChaMel 127	65	SSM	nd	A2, A3	B	1474 +	x		
ChaMel 128	73	NM	3	nd	T	415 +		x	
ChaMel 129	67	NM	3	nd	T	1295 +		x	
ChaMel 130	36	nd	nd	A2	B	nd	x		
ChaMel 131	59	nd	4	nd	T	351 +		x	
ChaMel 133	62	nd	nd	A3,A33, B7, B58	B	nd	x		
ChaMel 134	78	SSM	4	nd	T	511		x	
ChaMel 134	78	SSM	4	nd	T	460		x	
ChaMel 136	53	nd	nd	A1, A2, B7, B60	B	nd	x		
ChaMel 138	68	SSM	4	nd	T	1529 +		x	
ChaMel 139	80	nd	nd	nd	T	463 +		x	
ChaMel 142	41	SSM	3	A2, B5, B7	B	1845 +	x		
ChaMel 143	62	nd	4	nd	T	607		x	
ChaMel 146	62	SSM	nd	A3, A11, B7, B55	B	nd	x		
ChaMel 147	73	nd	nd	A2, A25, B35, B37	B	nd	x		
ChaMel 148	63	SSM	nd	A2, A3, B7, B51	B	nd	x		

Tab. 5 Übersicht des in der vorliegenden Arbeit verwendeten Materials von Melanompatienten. B = Blut, T = Tumor, nd = nicht definiert/ nicht bekannt, ALM = Akral Lentigomalignes Melanom, NM = Noduläres Melanom, SSM = Superfiziell spreitendes Melanom, UM = Uveales Melanom / Aderhaut-Melanom

Patienten ID	Kürzel	Lymphom-Subtyp	Art der Probe	Tumor-Vbeta
ChaLym 001	RoB	CTCL	B+T	2
ChaLym 002	DeL	CTCL	B	?
ChaLym 003	GeR	MF	B+T	5.2
ChaLym 004	LoCh	MF	B+T	13
ChaLym 005	OIV	MF	T	17
ChaLym 006	WeW	MF	B+T	2
ChaLym 007	ViD	MF	B+T	5.1
ChaLym 008	HaH	MF	B	2
ChaLym 009	CL	MF	B+T	13
ChaLym 010	GeL	MF	B	13
ChaLym 011	HN	MF	T	2
ChaLym 012	EdL	MF	B	2
ChaLym 013	HaH	MF	B	2
ChaLym 014	GuH	MF	B	2
ChaLym 015	RoM	SS	B	17
ChaLym 016	FN	SS	B	17
ChaLym 017	MaS	SS	B	17
ChaLym 018	IrK	SS	B	18
ChaLym 019	SeO	SS	B	5.1

Tab. 6 Übersicht des in der vorliegenden Arbeit verwendeten Lymphompatientenmaterials. B = Blut, T = Tumor, MF = Mycosis Fungoides, SS = Sezary-Syndrom, CTCL = nicht näher definiertes kutanes T-Zell-Lymphom

ID	Art der Probe	passender HLA für Färbung
GO	B	A2
SJ	B	A2, A3, B7
VH	B	A3, B7
AG	B	A2
GR	B	A2
AO	B	- (= negativ Kontrolle)
AB	B	A3, B7
NH	B	A3, B7
MS	B	A2, B7

Tab. 7 Übersicht des in der vorliegenden Arbeit verwendeten Materials gesunder Spender. B = Blut

3.1.6. Kultivierung von T-Zellen

T-Zellen aus PBMC oder Tumoren wurden in Zellkultur-Medium kultiviert. Einmal pro Woche, bei stärkerer Stoffwechselaktivität der Zellen (erkennbar an der schnellen Gelbverfärbung des Mediums) auch häufiger, erfolgte ein partieller Austausch des Mediums durch frisches Medium. Zusätzlich wurde die Kultur alle 2-3 Tage mit IL2 (50 U / ml) versetzt.

3.1.7. Kultivierung von Tumorzellen

Tumorzellen wurden ebenfalls in Zellkultur-Medium kultiviert und in der Regel einmal pro Woche, bzw. nach Bedarf, geteilt um die Zellen in der optimalen Wachstumsphase zu halten. Gering-adhärenente Zellen wurden mittels Zell-Schaber abgelöst, stark adhärenente dagegen mit PBS/ EDTA/ Trypsin-Lösung.

3.2. Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

3.2.1. RNA-Extraktion und reverse Transkription von RNA in cDNA

RNA-Extraktion und reverse Transkription der RNA in cDNA wurden von Frau Ulrike Fritz für die gesamte Arbeitsgruppe durchgeführt.

Die RNA-Extraktion aus Zellen oder Gewebe erfolgte mit Hilfe des RNeasy Mini Kit (Qiagen) nach Anweisung des Herstellers. Die Konzentration der RNA wurde mit einem UV/Vis-Spektrometer Lambda2 (Perkin Elmer) bestimmt und die RNA bis zur Verwendung bei -80°C gelagert.

Vor der reversen Transkription der RNA in cDNA wurde ein DNase-Verdau durchgeführt. Hierzu wurde pro μg RNA 1IU RQ1 DNase (Promega) eingesetzt und 30 min bei 37°C inkubiert. Für die cDNA Synthese wurden je 500 ng RNA in 13 μl Gesamtvolumen angesetzt:

RNA (500ng) oligo(dT)-Primer (20pmol/ μl) 10mM dNTPs (Pharmacia) in DEPC H₂O

Nach 5 min Inkubation bei 65°C wurde der Ansatz auf Eis gestellt und mit 4 μl 5xFirst-Strand Puffer und 2 μl DTT (0,1M, Invitrogen) versetzt. Anschließend wurde 2 min bei 42°C inkubiert und dann 1 μl SuperScript II RT (Invitrogen) zugegeben. Als Kontrolle wurde ein Parallelansatz ohne SuperScript mitgeführt. Nach 1h bei 42°C wurden 30 μl DEPC-H₂O zugegeben und für 15 min bei 70°C inkubiert. Die cDNA wurde anschließend in einer β -Actin PCR überprüft.

3.2.2. PCR zur Expressionsanalyse

Die Expressionsanalyse wurde mit cDNA verschiedener Zellen und Gewebe per RT-PCR im 96-Well Maßstab durchgeführt. Dazu wurde folgender Reaktionsansatz in 25 μl Gesamtvolumen angefertigt:

GoTaq Polymerase (Promega), 1 μl cDNA, 5x GoTaq Puffer (Promega), 2,5 μM dNTP (Pharmacia), 10 μM sense Primer, 10 μM antisense Primer in H₂O

Die PCR-Reaktion wurde in der Regel unter folgenden Bedingungen durchgeführt.

2 min 95°C (Denaturierung)

30 sec 95°C (Denaturierung)

40 sec $X^{\circ}\text{C}$ (Annealing)

1 min 72°C (Elongation, dann Wiederbeginn bei Schritt2)

10 min 72°C (Elongation)

Es wurden 35 Zyklen durchlaufen, anschließend wurden die Proben auf ein Agarosegel aufgetragen oder bis zur weiteren Verwendung im Kühlschrank aufbewahrt.

3.2.3. Gelelektrophorese

Die PCR-Produkte wurden in horizontalen TBE-Agarosegelen (10 x TBE-Elektrophoresepuffer: 0,5M Tris (ICN, OH, USA) 0,01M EDTA, 0,5M Borsäure), die Ethidiumbromid zum Anfärben der DNA enthielten, analysiert.

Je 15-20 µl der Proben wurden auf das Gel aufgetragen. Als Größenstandard diente entweder ein 100 bp DNA-Marker (Invitrogen) oder ein 1 kb DNA-Marker (Invitrogen). An die Gele wurden je nach Größe und Prozentigkeit eine Spannung zwischen 80 V und 200 V angelegt. Anschließend wurden sie im UV-Durchlicht fotografiert. Die Bewertung der Expressionsstärke erfolgte durch visuelle Begutachtung der Banden ("- " = keine Bande, "+" schwache Bande, "++" = normale Bande, "+++" = starke Bande).

3.2.4. Gelextraktion und Sequenzierung von PCR-Produkten

Die Spezifität der Primer wurde durch Sequenzierung der entsprechenden Amplifikate sichergestellt. Hierzu wurden die gewünschten Fragmente mit einem Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten, in ein 2 ml Eppendorfgefäß überführt und die Gelextraktion anschließend mit dem Qiagen Gelextraction-Kit (Qiagen) nach Anweisungen des Herstellers durchgeführt. Die Sequenzierung von PCR-Produkten erfolgte mit den jeweiligen Amplifikationsprimern durch die Firma agowa, Berlin.

3.2.5. Verwendeten Primer

Die verwendeten Oligonukleotid-Primer wurden von der Firma BioTez (Berlin) hergestellt.

Bezeichnung	Sequenz	Annealing-Temp. (°C)	Amplifikatgröße (für cDNA, genomisch deutlich größer)
B7-DC 5'87-22	cagcaatgtgaccctggaatgc	57	315 bp
B7-DC 3'378-24	tctacctcatctgtttctggaacc		
B7-H1 5' 229-24	cagcatagtagctacagacagagg	57	212 bp
B7-H1 5' 414-27	actggatccacaacaaaattctttgg		
B7-H3 5' 577-23	tttgatgtgcacagcatcctgcg	57	272 bp
B7-H3 3' 827-22	tgtttggtgtctgtcagctgcc		
B7-H4 5' 278-23	aggatgaaatgttcagaggccgg	57	311 bp
B7-H4 3' 565-24	attggagactccgagaagttggc		
CCL22 5' 34-23	tacagactgcactcctggttgc	57	241 bp
CCL22 3' 248-27	ctcagcttattgagaatcatcttcacc		
IDO 5'	ggatgttcattgctaacaatctgc	57	185 bp
IDO 3'	acggacatctcatgacctttgc		
COX-2 5' 841-23	gtgcctggtctgatgatgatgc	58	310 bp
COX-2 3' 1125-26	gaatttgaaaggtgtcaggcagaagg		

Tab. 8 Übersicht aller verwendeter Primer, der zugehörigen Annealing-Temperatur und der erwarteten Amplifikatgröße.

3.3. Durchflusszytometrie

Aufgrund der relativ geringen Zellausbeute und dem gleichzeitigen Wunsch, möglichst viele Oberflächenmarker zu untersuchen, war es nicht möglich, auf ein durchflusszytometrisches Routineverfahren zurückzugreifen, da die heutzutage standardmäßig eingesetzten Geräte (meist FACS-Calibur oder FACSCanto von Beckton Dickinson) nur für die Messung von maximal vier bzw. acht Fluoreszenzen pro Färbung ausgestattet sind. Aus diesem Grund wurden alle durchflusszytometrischen Untersuchungen an einem eigens dafür optimierten LSR II (Becton Dickinson) durchgeführt. Dieses Gerät verfügt über vier Laser von unterschiedlicher Wellenlänge. Sie werden im Folgenden als blau (488 nm Wellenlänge), rot (633 nm Wellenlänge), violett (405 nm Wellenlänge) und UV (350 nm Wellenlänge) bezeichnet. Jeder Laser regt je nach Wellenlänge nur bestimmte Farbstoffe an. Die Zellen passieren die Laser nacheinander, so dass die Detektoren Tandem-Konjugate mit dem gleichen zweiten Farbstoff wie z.B. PE-CY7 und APC-CY7 voneinander unterscheiden können. Aufgrund dieser Ausstattung ist das Gerät in der Lage, zwölf Farben gleichzeitig zusammen mit der Zellgröße und der Granularität, also insgesamt 14 Parameter pro Zelle, zu messen.

Trotz der Verwendung optimierter optischer Filter und Spiegel kommt es bei der Verwendung mehrerer Fluochrome zu einer partiellen Überlagerung der Emissionsspektren. Durch diese Überschneidung, z.B. der FITC- und der PE-Emission, werden die Fluoreszenzen von den benachbarten Detektoren relativ zu hoch gemessen. Diesem Problem wird mit einer elektronischen Kompensation begegnet, bei der man mit Hilfe von einfach gefärbten Proben jede Fluoreszenz gegen die anderen abgleicht. Je mehr Fluoreszenzfarbstoffe zusammen in einer Färbung gemessen werden, desto schwieriger wird die Kompensation, da die Fluoreszenzmaxima abhängig von den kommerziell zur Verfügung stehenden Farbstoffen nicht beliebig weit auseinander zu legen sind. Durch die Kompensation, das "Herausrechnen" der verschiedenen Fluoreszenzsignale, addieren sich allerdings die Messungenauigkeiten.

Das Zusammenstellen von bis zu zwölf verschieden markierten Antikörpern für die Detektion relevanter Marker ist daher ein langwieriger Prozess. Viele verschiedene Kombinationen von Antikörpern und Fluorochromen müssen getestet werden, wobei stets die Signalintensität des verwendeten Konjugates in seinem zugehörigen Detektor mit der durch es verursachten kompensationsbedingten Störung in den anderen Detektor abgewogen werden muss.

3.3.1. Verwendete Antikörper und Puffer

Spezifität	Antikörper/ Klon	Fluorochrom	Hersteller
B7DC	MIH18	APC	BD
B7H1	MIH1	PE-Cy7	eBioscience
B7H3	M3.2D7	PE	BD
B7H4	188	Biotin	eBioscience
Biotin	Streptavidin	Qdot525	QuantumDot Corp.
BTLA	MIH26	Biotin	eBioscience
CD107a	LAMP1	FITC	BD
CD11c	3.9	Alexa Fluor 700	eBioscience
CD127	hIL-7R-M21	PE	BD
CD127	eBioRDR5	APC-Cy7	eBioscience
CD137	4B4-1	PE	BD
CD14	RMO52	PE-TexasRed	Beckman Coulter
CD16	3G8	APC-Cy7	BD
CD19	4G7	PerCP	BD
CD25	M-A251	PE-Cy7	BD
CD25	B1.49.9	PE-TexasRed	Beckman Coulter
CD27	O323	APC-Cy7	eBioscience
CD28	CD28.2	PerCP	BD
CD3	UCHT1	Pacific Orange	Caltag
CD3	SK7	Alexa Fluor 700	BD
CD3	SK7	APC-Cy7	BD
CD3	UCHT1	Alexa Fluor 405	DRFZ
CD4	SFC12T4D11	PE-TexasRed	Beckman Coulter
CD4	S3.5	Pacific Orange	Caltag
CD45RA	MeM-56	Pacific Blue	Caltag
CD45RO	UCL1	Pacific Blue	eBioscience
CD45RO	UCL1	PE-TexasRed	Beckman Coulter
CD57	HNK-1	Biotin	BD
CD69	FN50	APC-Cy7	BD
CD69	FN50	PerCP	BD
CD71	M-A712	APC	BD
CD8	RPA-T8	Alexa Fluor 405	BD
CD8	SFC121Thy2D3	PE-TexasRed	Beckman Coulter
CD8	3B.5	Pacific Orange	Caltag
CD80	B7-1	FITC	BD
CTLA4	BNI3	PE-Cy5	BD
CTLA4	BNI3	APC	BD
FoxP3	PCH101	Alexa Fluor 700	eBioscience
GranzymB	CB9	Alexa Fluor 700	BD
IFN γ	B27	Alexa Fluor 700	BD
IL-10	JES5-16E3	APC	BD
IL-1b	AS-10	PE	BD
IL-3	7G3	Biotin	BD
PD1	MIH4	FITC	eBioscience
Perforin	δ G9	FITC	BD
TCRzeta	H146-968	PE	Santa Cruz
TNF α	Mab11	PE-Cy7	BD
Vb13.1	TCRBV13S1	PE	Beckman Coulter
Vb17	TCRBV17S1	PE	Beckman Coulter
Vb18	TCRBV18S1	PE	Beckman Coulter
Vb2	TCRBV2S1	PE	Beckman Coulter
Vb5.1	TCRBV5S1	PE	Beckman Coulter

Tab. 9 Liste der in dieser Arbeit verwendeten fluoreszenzmarkierten Antikörper

Puffer	Zusammensetzung	Hersteller
Färbepuffer	PBS	Gibco
Fix-Perm	Herstellergeheimnis	eBioscience
Perm-Wash	Herstellergeheimnis	eBioscience

Tab. 10 Liste der für die durchflusszytometrischen Färbungen verwendeten Puffer

Pro Färbung wurden jeweils 100 µl Zellsuspension in einem 5 ml FACS-Röhrchen mit der entsprechenden Menge an monoklonalen Antikörpern für die Oberflächenantigene versetzt. Zusätzlich wurden zu jeder Probe 2 µl Beriglobin gegeben. Hierbei handelt es sich um humane Immunglobuline zur Absättigung unspezifischer und Fc-Bindungsstellen. Die Inkubationszeit betrug 15-20 Minuten bei 4°C. Danach wurde 1ml PBS zugegeben und die Zellen für 10 Minuten bei 300g und 4°C zentrifugiert. Bei ausschließlichen Oberflächenfärbungen wurden die Zellen ein zweites Mal mit PBS gewaschen und dann für die Messung in 200 µl PBS resuspendiert.

Für eine anschließende intrazelluläre Färbung wurden die Zellen zunächst mit je 500 µl Fix-Perm-Lösung für 40 Minuten bei 4°C fixiert. Dann wurde 1ml Perm-Wash-Lösung zugegeben und für 10 Minuten bei 300g und 4°C zentrifugiert. Die Färbung mit den Antikörpern gegen die intrazellulären Antigene erfolgte dann in 100 µl Perm-Wash-Lösung für 30 Minuten. Anschließend wurde mit 1ml Perm-Wash-Lösung gewaschen und nochmals zentrifugiert. Für die Messung wurde das Zellpellet dann in 200 µl PBS resuspendiert und auf Eis transportiert. Während der gesamten Dauer von Färbung und Transport wurde darauf geachtet, die Zellen vor Licht zu schützen, um einem möglichen Ausbleichen der Farbstoffe vorzubeugen.

3.3.2. Färbung von antigenspezifischen Zellen mittels Peptid-HLA-Multimeren

Die Bindung zwischen einem einzelnen TCR und seinem korrespondierenden Peptid-HLA-Komplex (pHLA) ist zu schwach, um darüber einen spezifischen TCR anfärben zu können. Eine Möglichkeit zur Färbung von Antigen-spezifischen T-Zellen sind pHLA-Tetramere. Zu ihrer Herstellung werden humane pHLA-Komplexe ohne Transmembransequenzen hergestellt, biotinyliert und danach mittels Streptavidin tetramerisiert¹¹³. Verwendet man mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiertes Streptavidin, so können die pHLA-Tetramere dann für die Färbung spezifischer T-Zellen am Durchflusszytometer eingesetzt werden. Neben den über Streptavidin-Biotin komplexierten Tetrameren gibt es auch andere pHLA-Multimere, die von verschiedenen Herstellern angeboten werden. Neben Tetrameren der Firma Beckman Coulter wurden in dieser Arbeit auch so genannte Dextramere (HLA-Peptidkomplexe die an

ein Dextran-Rückgrat gekoppelt sind) der Firma Dako verwendet. Eine Übersicht aller in dieser Arbeit verwendeten pHLA-Multimere ist in Tab. 11 dargestellt.

Die pHLA-Multimer-Färbung erfolgte stets vor der Färbung der Zellen mit Antikörpern. pHLA-Multimere wurden in der vom Hersteller empfohlenen Konzentration zur Zellsuspension (Färbevolumen meist 100 µl) gegeben und 30 Minuten im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert. Nach den 30 Minuten wurden ohne weiteres Waschen die Antikörper für die Oberflächenfärbung der Zellen zugegeben und für weitere 15 Minuten inkubiert.

Antigen	HLA	Epitopsequenz	Farbe	Hersteller
EBV	A*0201	GLCTLVAML	APC	Beckman Coulter
CMV	A*0201	NLVPMVATV	APC	Beckman Coulter
Tyrosinase	A*0201	YMDGTMSQV	PE	Beckman Coulter
Telomerase	A*0201	ILAKFLHWL	PE	Dako
EBV	A*0301	RLRAEAQVK	APC	Dako
CMV	A*0301	KLGGALQAK	APC	Dako
Tyrosinase	A*0301	YMVPFIPLYR	PE	Dako
Gp100	A*0301	ALLAVGATK	PE	Dako
EBV	B*0702	RPPIFIRRL	APC	Dako
CMV	B*0702	TPRVTGGGAM	APC	Dako
Gp100	B*0702	SSPGCQPPA	PE	Dako
Tyrosinase	B*0702	LPWHRLFLL	PE	Dako

Tab. 11 Liste der in dieser Arbeit verwendeten Peptid-HLA-Multimere

Die Färbung der T-Zellen mit den Peptid-HLA-Multimeren wurde mit der Färbung verschiedener Oberflächenantigene kombiniert und die tumor- bzw. virusspezifischen Zellen dann auf verschiedene Markerkombinationen gated. Für den Aktivierungszustand der Zellen wurde die Kombination CD69/ CD25 verwendet, für den Differenzierungsstatus der Zellen CD45RA / CD57 und für eine mögliche Coinhibition PD1 / CTLA4.

Beispiele dieser Färbungen mit dem entsprechenden Gating der tumor- bzw. virusspezifischen Zellen sind in Abb. 4 gezeigt.

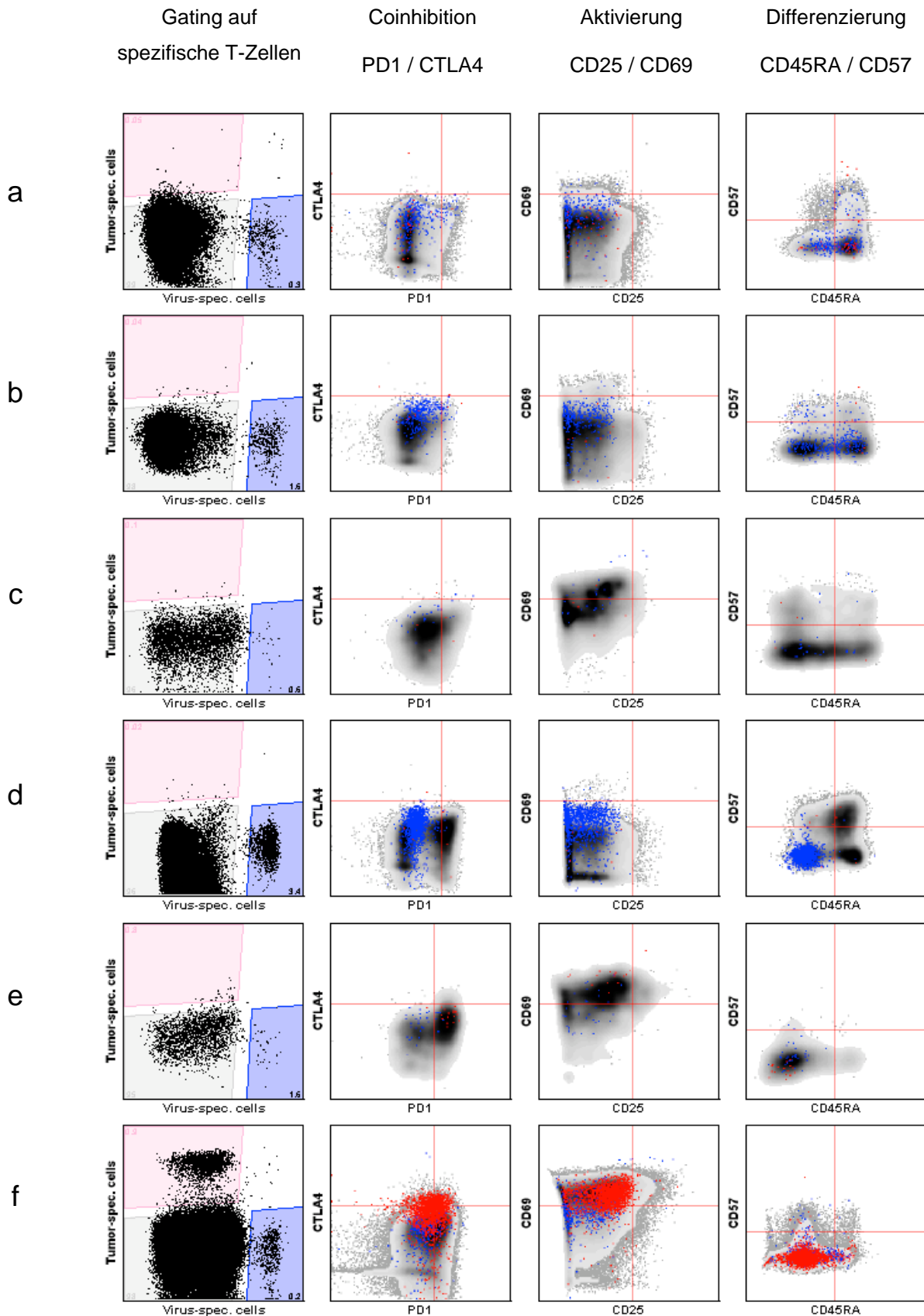


Abb. 4 Repräsentative Beispiele der Peptid-HLA-Multimer Färbungen als Dotplot und als Dotplot-Overlay der tumorspezifischen (rot) und der virusspezifischen (blau) auf den Peptid-HLA-Multimer-negativen T-Zellen (grau) in verschiedenen Proben: (a) PBMC eines gesunden Spenders, (b) PBMC von Patient ChaMel14, (c) TILs von Patient ChaMel14, (d) PBMC von Patient ChaMel22, (e) TILs von Patient ChaMel22 and (f) TILs von Patient ChaMel61.

3.3.3. Färbung intrazellulärer Zytokine und der Degranulation von T-Zellen nach Stimulation

T-Zellen, die spezifisch aktiviert werden, produzieren nach Erkennung ihres Antigens Zytokine wie IFN γ , TNF α u.a. und im Falle von CTLs exportieren die Zellen zusätzlich Granzyme und Perforin gefüllte Granula. Diese Reaktionen stellen erste Schritte in der zellulär vermittelten Immunantwort dar. Anhand der Zytokinexpressionsmuster können sowohl unterschiedliche Lymphozyten-Subpopulation identifiziert als auch Störungen der normalen T-Zellfunktion festgestellt werden¹¹⁴. Mittels Durchflusszytometrie können neben dem spezifischen TCR und verschiedenen Oberflächenmarkern auch diese Zellfunktionen gemessen werden. Dazu ist die Zugabe eines Sekretionsinhibitors (BrefeldinA und/oder Monensin) nötig. Die Zytokine werden dann nicht mehr sezerniert, sondern akkumulieren im Innern der Zelle. Die Degranulation einer Zelle kann gemessen werden, wenn während der Degranulation ein Antikörper gegen CD107a präsent ist. CD107a wird auf der Innenseite der Granula exprimiert. Fusionieren diese Granula mit der Zellmembran, so erscheint CD107a kurzzeitig an der Zelloberfläche wo der fluoreszenzmarkierte Antikörper binden kann bevor CD107a mit dem Antikörper wieder internalisiert werden¹¹⁵. Ein Schema der Funktionsweise des in dieser Arbeit verwendeten Assays ist in Abb. 5 dargestellt.

Um eine Reaktion der T-Zellen auszulösen wurden diese mit entsprechenden Ziel-Zellen (den autologen Tumorzellen) über Nacht in der Gegenwart von BrefeldinA, Monensin und einem FITC-Markierten CD107a Antikörper coinkubiert.

Am nächsten Morgen wurden die Zellen in FACS-Röhrchen geerntet, eine Oberflächenfärbung durchgeführt, dann 30 Minuten fixiert (Fix-Perm-Puffer), 10 Minuten permeabilisiert (Perm-Wash) und intrazellulär mit spezifischen fluoreszierenden Antikörpern gegen die produzierten Zytokine angefärbt (siehe dazu auch Abschnitt über Färbung von intrazellulären Antigenen).

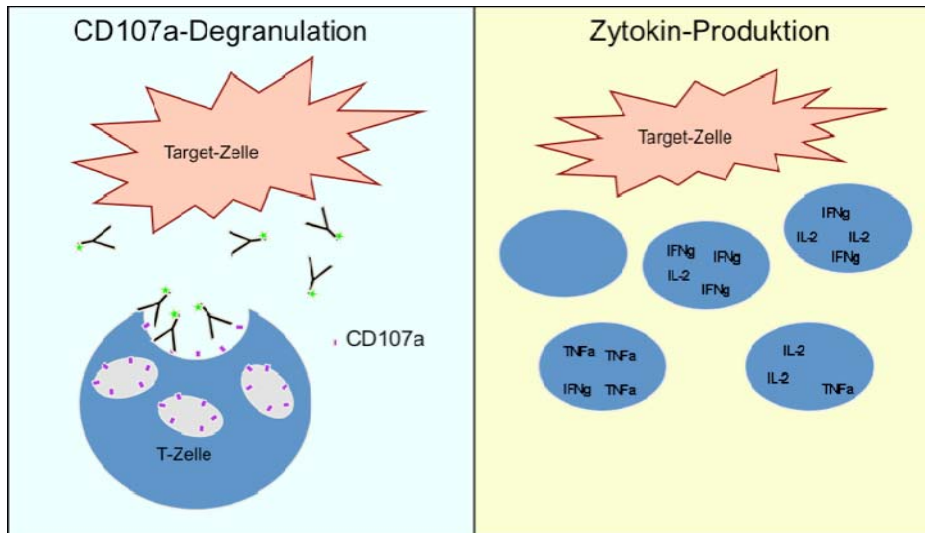


Abb. 5 Schematische Darstellung der intrazellulären Zytokinfärbung mit Analyse der Degranulation. T-Zellen und Target-Zellen wurden zusammen mit Sekretionsinhibitoren und einem fluoreszenzmarkierten CD107a-Antikörper über Nacht inkubiert. Danach wurden die Zellen mit verschiedenen Oberflächenmarkern und intrazellulär gefärbt mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern gegen IFN γ , TNF α und IL2.

3.3.4. Co-Kultur-Transwell-Assays

Um zu überprüfen, inwiefern die beobachteten Effekte von Tumorzellen auf T-Zellen Zell-Zell-Kontaktabhängig sind oder über lösliche Mediatoren vermittelt werden, wurden so genannte Transwell-Assays durchgeführt. Der schematische Aufbau einer Transwell-Kammer ist in Abb. 6 dargestellt.

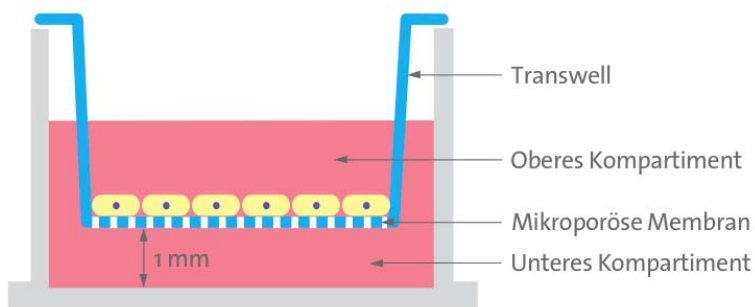


Abb. 6 Schematische Darstellung eines Transwell-Assays (entnommen aus "Corning Handbuch der Zellkulturartikel")

Ein Transwell-Aufbau besteht aus einer normalen Zellkultur-Platte (24 Well), in die Träger-Einsätze mit einem Boden aus einer durchlässigen Membran (0,4 μ m Porengröße) eingehängt werden. Die Porengröße ist so gewählt, dass Zellen aus dem oberen Kompartiment nicht hindurchpassen, aber ein Austausch von löslichen Faktoren auf jeden Fall gewährleistet ist. Die Zellen im oberen Kompartiment haben somit keinen direkten Zell-Zell-Kontakt mit den Zellen im unteren Kompartiment und eine Beeinflussung ist lediglich über lösliche Mediatoren möglich.

Vor Beginn der Assays wurde sichergestellt, dass die bloße Kultivierung von T-Zellen im oberen Kompartiment keinen Einfluss auf die untersuchten Eigenschaften hatte. In den durchgeführten Assays wurden dann im oberen Kompartiment die zu analysierenden T-Zellen kultiviert, während das untere Kompartiment die "beeinflussenden Zellen" enthielt.

In Abb. 7 sind die jeweils untersuchten Bedingungen der Cokultur-Transwell-Assays dargestellt. Es wurden jeweils die T-Zellen alleine (a) mit den T-Zellen die im Medien austausch mit autologen Tumorzellen standen (b) verglichen. Zusätzlich wurde auch untersucht, ob T-Zell-beeinflussende Faktoren ggf. erst durch den Kontakt von T-Zellen und Tumorzellen induziert werden (c und d).

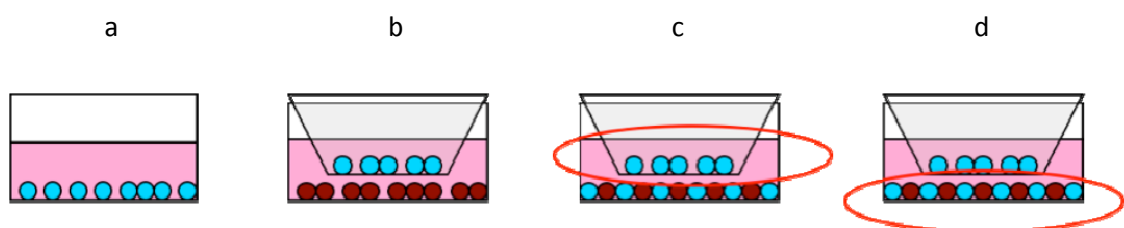


Abb. 7 Typischer Aufbau eines Cokultur-Transwell-Assays. Die T-Zellen sind dabei in Türkis und die Melanomzellen in Braun dargestellt. Die vier verschiedenen Ansätze waren: Vergleich von T-Zellen alleine (a) mit den T-Zellen die im Medien austausch mit autologen Tumorzellen standen (b) mit T-Zellen die im Medien austausch mit autologen Tumorzellen in Cokultur mit T-Zellen standen (c) und T-Zellen die im direkten Kontakt mit autologen Tumorzellen standen (d).

3.4. Statistik

Zur Darstellung von Verteilungen (Abb. 9 und Abb. 19) wurden Box-Plots verwendet. Dabei gibt der Querstrich in der Mitte der Box jeweils den Median der Population an. Die Box gibt den Bereich an, in der die mittleren 50% der Daten liegen (oberes und unteres Quartil). Die "Antennen" schließen 95% der Daten ein.

Daten zum Überleben der Patienten wurden mittels Kaplan-Meyer Diagrammen dargestellt und Kurven untereinander mittels Log-Rang-Test verglichen (Abb. 20 und Abb. 21).

Als statistischer Test zum Vergleich von Populationen (z.B. gesunde Spender vs. Patienten oder virusspezifische vs. tumorspezifische Zellen) wurde ein unverbundener t-Test gewählt (Abb. 10, Abb. 22 und Abb. 23).

In allen Tests wurde der Signifikanzwert $P < 0,05$ als signifikant (*), P von 0,01 bis 0,001 als sehr signifikant (**) und $P < 0,001$ als höchst signifikant (***) definiert.

Für die statistischen Analysen wurde das Programm Prism 4.0 (Graph Pad) verwendet.

4. Ergebnisse

4.1. Infiltration von T-Zellen ins Tumorgewebe und deren Antigenpezifität

4.1.1. Ausmaß der Infiltration von T-Zellen in analysierten Melanommetastasen

Der Umstand, dass T-Zellen solide Tumore wie das Maligne Melanom infiltrieren können, ist die Voraussetzung für eine mögliche Anti-Tumor Immunantwort. In vielen Publikationen konnte eine positive Korrelation der Menge an tumor-infiltrierenden Lymphozyten (TIL) mit einem längeren Überleben der Patienten gezeigt werden, allerdings gibt es auch Publikationen die dies nicht bestätigen können^{116,117}. Im überwiegenden Teil dieser frühen Arbeiten wurden Gewebeschnitte immunhistologisch mit T-Zell-Markern (CD3, CD4, CD8) gefärbt und dann die Zahl der T-Zellen pro Gesichtsfeld ermittelt. Diese Methodik ist relativ ungenau, da nur wenige Zellen aus einem kleinen Teil des Tumors gezählt werden können. Auch sind so pro Zelle nur wenige Informationen (Größe, Morphologie, Umgebung und ein bis max. zwei Oberflächenmarker) zugänglich. Über die Spezifität der T-Zellen kann ebenfalls keine Aussage getroffen werden.

Mit Hilfe der Durchflusszytometrie ist es möglich, große Mengen an Zellen auf Einzelzellebene zu charakterisieren. Dazu müssen die Zellen zunächst vereinzelt werden, wodurch die Information über die Umgebung der Zelle verloren geht. Dafür sind pro Zelle neben Größe und Granularität bis zu 12 weitere Parameter (intrazelluläre und Oberflächen-Antigene oder die Membranintegrität) abrufbar.

Um einen Überblick über die Qualität und Zusammensetzung der zu analysierenden Tumorgewebe zu bekommen, wurden zunächst 50 der zuvor als Einzelzell-Suspension aufgearbeiteten und kryokonservierten Tumorproben mit einem Zellvitalitätsmarker (LiveDead) und Oberflächenantikörpern für verschiedene Zelltypen (u.a. CD3 für T-Zellen, CD14 für Monozyten, CD19 für B-Zellen) gefärbt. Zur Identifikation der Melanomzellen war leider kein geeigneter Antikörper für ein allgemein auf Melanomzellen exprimiertes Oberflächenantigen vorhanden, daher konnten die Tumorzellen nur anhand ihrer Größe und Granularität sowie aufgrund der Abwesenheit der gefärbten Lymphozyten-Oberflächenmarker identifiziert werden. In Abb. 8 ist ein repräsentatives Beispiel einer Färbung mit entsprechendem Gating gezeigt.

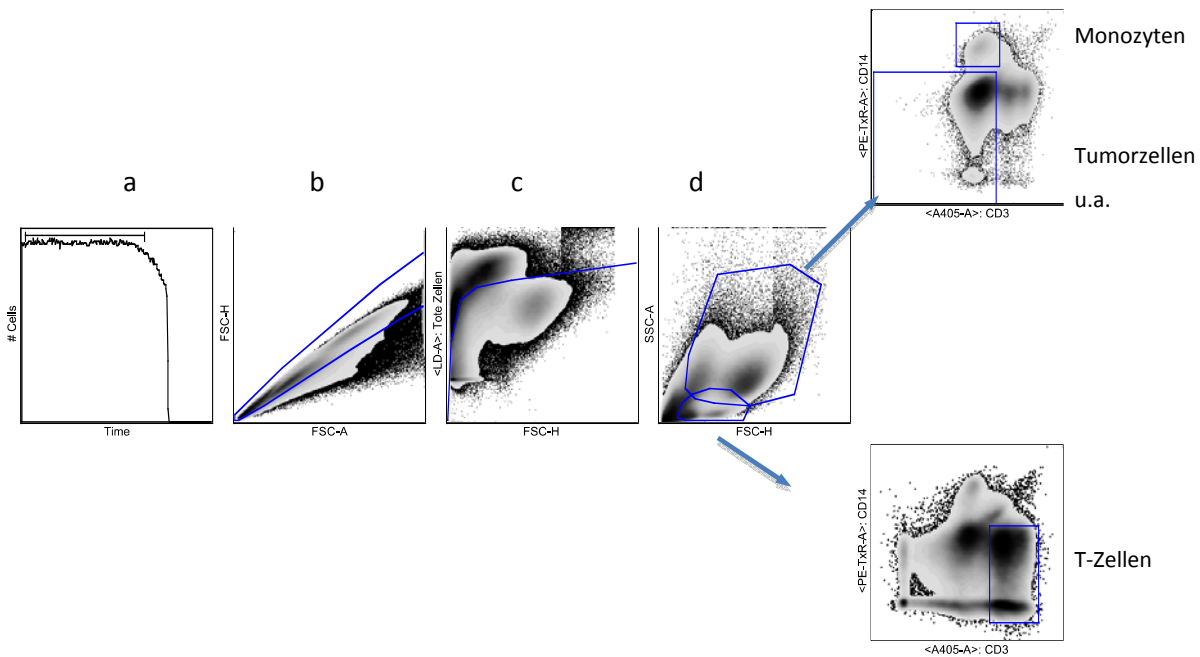


Abb. 8 Gating-Beispiel: Zunächst wurde der Teil der Messung ausgewählt in dem ein gleichmäßiger Zellfluss herrschte (a). Im nächsten Plot wurden durch die Darstellung der Signalhöhe gegen die Signalfäche auftretende Zellaggregate (sog. Doubletten) sichtbar gemacht (größere Signalfäche bei gleicher Signalhöhe durch längere Durchtrittszeit durch den Laserstrahl) und ausgegated (b). Dann wurden tote Zellen ausgeschlossen (c). Danach erfolgte das Gating auf die kleine wenig granuläre Population der Lymphozyten in denen auch die T-Zellen enthalten sind und auf die größeren stärker granulären Zellen wie Monozyten und Tumorzellen (d). In den folgenden zwei Plots wurde die Färbung von CD14 gegen CD3 dargestellt und auf die gewünschten Populationen gegated.

In den meisten, aber nicht allen, Tumoren konnten lymphozytäre Zellen nachgewiesen werden. Anders als vielleicht zu erwarten war, machten die Tumorzellen nicht in allen untersuchten Tumorproben den größten Teil der Zellen aus. Neben den analysierten Tumorzellen und Zellen des Immunsystems bestehen Tumore auch aus Tumor-Stromazellen. Dieser Sammelbegriff beinhaltet unter anderem Zellen zur Formung von Kapsel- und Bindegewebe sowie Endothelzellen und Perizyten zur Bildung von Blutgefäßen und andere, teilweise auch lymphozytäre, bislang nicht näher klassifizierte Zellen. Aufgrund der vielen unterschiedlichen beschriebenen Subtypen der Tumor-Stromazellen, die keinen einheitlichen Marker besitzen war es leider nicht möglich näher auf diese Zellgruppe einzugehen.

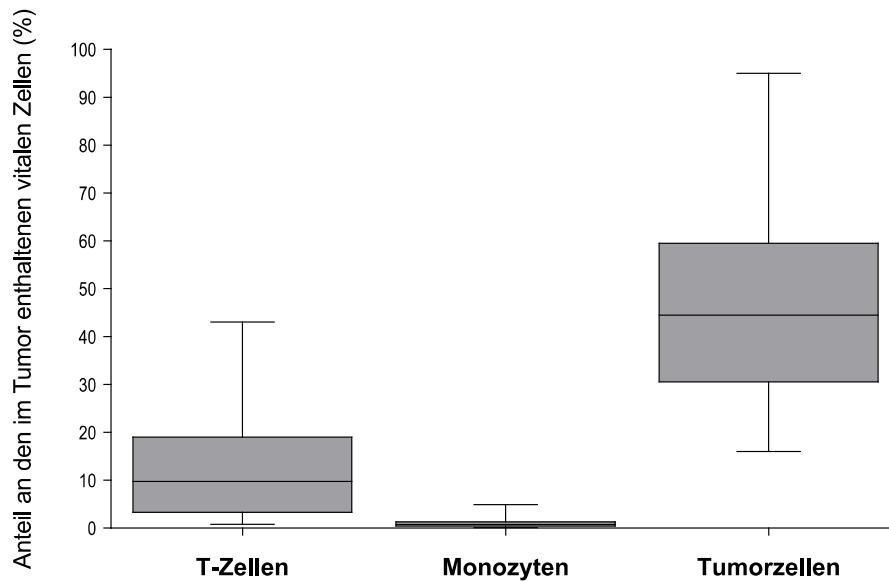


Abb. 9 Prozentualer Anteil von T-Zellen, Monozyten und Tumorzellen an den im Tumor enthaltenen vitalen Zellen. n=50
 Erklärung der Box-Plot Statistik: Der Querstrich in der Mitte der Box gibt jeweils den Median an. Die Box gibt den Bereich, in der die mittleren 50% der Daten liegen (oberes und unteres Quartil). Die "Antennen" schließen 95% der Daten ein.

Die Analyse der Zusammensetzung der Tumorproben spiegelt die enorme Heterogenität des Malignen Melanoms wieder. Der Anteil der Tumorzellen schwankte zwischen 16% und 95% der vitalen Zellen und lag im Mittel bei 45%. Der Anteil der infiltrierenden T-Zellen lag im Mittel bei 10%. Allerdings gab es auch Tumore, die kaum von T-Zellen (unter 1%) infiltriert waren und solche in denen die T-Zellen bis zu 43% der vitalen Zellen ausmachten. Der Anteil anderer lymphozytärer Zellen wie B-Zellen, NK-Zellen und Monozyten, wie sie zum Beispiel im peripheren Blut zu finden sind, war nur sehr gering. Den größten Teil der lymphozytären Nicht-T-Zellen machten dabei die Monozyten aus, deren Anteil im Mittel aber nur bei 0,7% lag.

4.1.2. Antigen-spezifität der tumorinfiltrierenden T-Zellen

Der zum Teil enorme Anteil von tumorinfiltrierenden T-Zellen wirft die Frage nach dem Mechanismus und der Bedeutung der Infiltration auf. Sind alle infiltrierenden T-Zellen tumorspezifisch?

Bislang sind nur wenige T-Zell-Epitope aus verschiedenen tumorassoziierten Antigenen (TAA) bekannt. Daher kann nur ein Bruchteil der möglichen im Tumor vorkommenden tumorspezifischen T-Zellen mittels fluoreszenzmarkierter Peptid-HLA-Multimere (pHLA Multimere) gefärbt werden. Um dennoch eine Aussage über den Anteil der tumorspezifischen T-Zellen im Tumor machen zu können, wurde eine zweite Gruppe von T-

Zellen gefärbt, die nicht tumorspezifisch sind, sondern immundominante Epitope des humanen Epstein-Barr-Virus (EBV) oder des humanen Cytomegalie-Virus (CMV) erkennen. Diese Zellen, im weiteren kurz "virusspezifische Zellen" genannt, eignen sich besonders gut als Vergleichs-T-Zell-Gruppe. Die meisten Menschen werden im Verlauf ihres Lebens (meist schon in jungen Jahren) von einem oder beiden Viren infiziert, daher findet man bei den meisten Personen eine gut messbare Frequenz virusspezifischer T-Zellen im Blut. Beide Viren sind nach der primären Infektion latent und persistieren im Körper. Eine Reaktivierung kommt allerdings nur unter besonderen Umständen, z.B. nach Organtransplantationen oder im Rahmen schwerer Erkrankungen, aber nicht bei Gesunden vor. Das Reservoir des EBV ist eine bestimmte Gruppe von B-Zellen. Zum Reservoir von CMV ist noch nicht viel bekannt, da es verschiedene epitheliale Zelltypen infizieren kann. Während der Latenz der Viren ist allerdings keine Expression der viralen Proteine messbar. Somit kann eine spezifische Antigenerkennung im Tumor nur durch die TAA-Epitop-spezifischen T-Zellen erfolgen und eine Antigenerkennung der virusspezifischen Zellen im Tumor ausgeschlossen werden.

Um zu analysieren, ob die Infiltration von T-Zellen in den Tumor allein durch einen antigenspezifischen Mechanismus bedingt ist oder zufällig bzw. nur aufgrund inflammatorischer Zytokine, unabhängig von der Spezifität der T-Zelle, erfolgt, wurde der Anteil von tumorspezifischen und virusspezifischen T-Zellen im peripheren Blut und im Tumorgewebe von Melanompatienten gemessen und miteinander verglichen. Blut von gesunden Spendern wurde nicht in diesen Vergleich mit einbezogen.

Die Analyse konnte nur bei Patienten vorgenommen werden, deren HLA bekannt war und mit dem HLA der zur Verfügung stehenden pHLA-Multimere (A*0201, A*0301 oder B*0702) übereinstimmte.

Im Blut der Patienten war der Anteil virusspezifischer T-Zellen im Mittel zehnfach höher, als der Teil der tumorspezifischen Zellen. In den analysierten Tumorproben betrug der Anteil der virusspezifischen T-Zellen 0,5 bis 9,3% der insgesamt enthaltenen vitalen Zellen. Der Anteil der tumorspezifischen CD8+ T-Zellen an den gesamten CD8+ T-Zellen schwankte zwischen 0,02 und 3 %. Es zeigte sich, dass die Tumore nicht nur von den tumorspezifischen T-Zellen infiltriert werden, sondern auch von virusspezifischen Zellen, die gegen die viralen EBV- und CMV- Antigene gerichtet sind. Gegenüber der Zusammensetzung im Blut von Melanompatienten waren die tumorspezifischen T-Zellen im Tumor deutlich, im Mittel um den Faktor 10 aber auch bis zu 40-fach, angereichert.

Schaut man sich das Verhältnis von tumorspezifischen zu virusspezifischen T-Zellen in Blut und Tumor an, so beträgt es im Blut im Mittel 0,1 während es im Tumor bei einem Verhältnis

Verschiedene beschriebene Oberflächenmarker erlauben Rückschlüsse auf den Aktivierungszustand einer T-Zelle und werden daher auch als Aktivierungsmarker bezeichnet. Für die hier gezeigten Analysen wurden zwei verschiedene Aktivierungsmarker verwendet: CD69 und CD25. Von CD69 ist bekannt, dass es sehr schnell, schon etwa 2 Stunden nach der T-Zell-Aktivierung, auf der Zelloberfläche erscheint, während CD25 frühestens 12 Stunden nach T-Zell-Aktivierung messbar ist.

Für die Verwendung als Marker für die Aktivierung von T-Zellen im Tumor war es jedoch wichtig vorher zu klären, ob (i) die Marker ausschließlich durch TCR-Interaktion induziert werden und (ii) wie lange die Expression nach der Stimulation anhält.

Im folgenden (Abb. 11) ist daher zunächst die Kinetik der Expression von CD69 und CD25, sowie mögliche Faktoren die deren Expression induzieren, gezeigt. Dafür wurden PBMCs von gesunden Spendern *in vitro* entweder "TCR-unabhängig" mit verschiedenen Zytokinen wie IL2, IFN γ , IFN α , TGF β und TNF α oder "TCR-abhängig" mittels anti-CD3-Antikörper gekoppelter Beads über den T-Zell-Rezeptor stimuliert.

Es zeigte sich, dass die CD69-Expression nicht nur durch Stimulation über den TCR, sondern auch durch inflammatorische Zytokine wie IL2 (stark) und IFN α (leicht) induziert wird. Eine direkte antigenspezifische Aktivierung der T-Zelle selbst ist zur Induktion von CD69 anscheinend nicht unbedingt nötig. Da T-Zellen nach ihrer Aktivierung allerdings normalerweise sowohl IL2, als auch IFN α sezernieren, ist die Expression von CD69 natürlich auch auf antigenspezifisch aktivierten T-Zellen zu beobachten.

CD25 dagegen wird nur nach Stimulation via TCR aber nicht durch die verschiedenen getesteten Zytokine induziert und ist in seiner Expressionskinetik deutlich langsamer als CD69 und erst nach mehreren Tagen verstärkt exprimiert.

Beide Marker waren auch 120h nach der Induktion noch messbar.

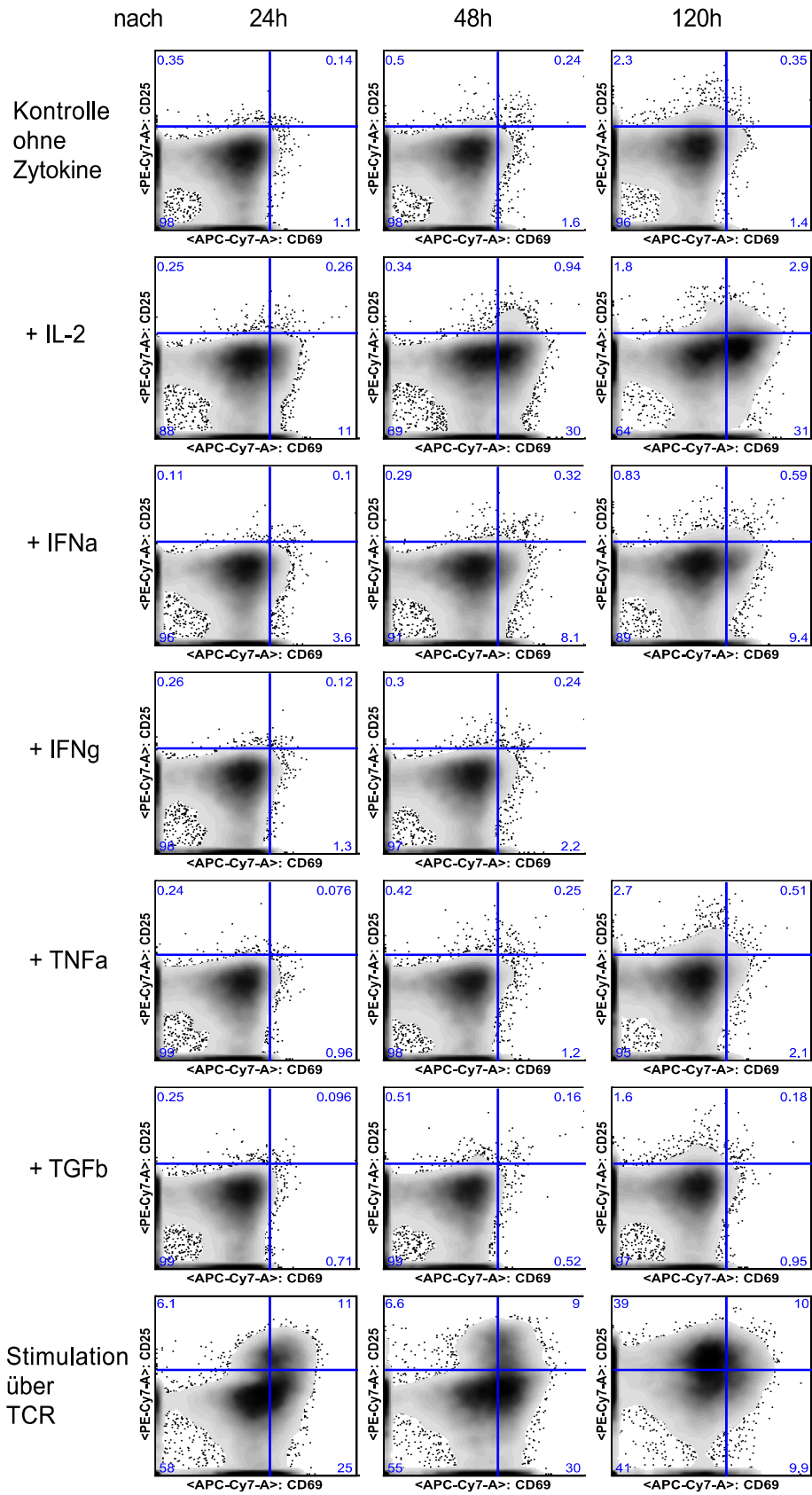


Abb. 11 Kinetik der Expression von CD69 (Abszisse) und CD25 (Ordinate) nach in vitro Stimulation von PBMC mit verschiedenen Zytokinen wie IL2, IFN γ , IFN α , TNF α , TGF β oder CD3-Antikörperbeads, nach je 24, 48 und 120 Stunden.

Die Analyse der Expression von CD69 und CD25 im peripheren Blut von gesunden Spendern und Melanompatienten (Abb. 12) ergab eine nur geringe Expression der Aktivierungsmarker. Der Großteil der T-Zellen im peripheren Blut befindet sich also im ruhenden Zustand. Im Tumorgewebe exprimiert allerdings über die Hälfte der T-Zellen CD69, was auf eine generelle inflammatorische Situation im Tumor hindeutet.

Vergleicht man nun die Aktivierungsmarkereexpression von tumorspezifischen und virusspezifischen T-Zellen, so fällt auf, dass ein Großteil der T-Zellen im Tumor CD69 unabhängig von ihrer Spezifität exprimieren. Dies ist möglich, denn im vorangegangenen Experiment konnte ja gezeigt werden, dass für die Expression von CD69 keine antigenspezifische Stimulation, sondern lediglich ein bestimmtes Zytokinmilieu nötig ist.

Die virusspezifischen Zellen im Tumor sind nahezu komplett CD25 negativ. CD25 wird auch nur von einem kleinen Teil der tumorspezifischen T-Zellen im Tumor exprimiert. Dies ist insofern interessant, da es zeigt, dass nicht alle tumorspezifischen T-Zellen im Tumor sich auch gerade in einem aktivierten Zustand befinden.

Die Analysen zeigen also, dass nur ein kleiner Teil tumorspezifischer Zellen im Tumor antigenspezifisch aktiviert ist und möglicherweise ein allgemein inflammatorisches Milieu, das CD69-Expression induziert, vorherrscht, von dem auch nicht tumorspezifische Zellen beeinflusst werden.

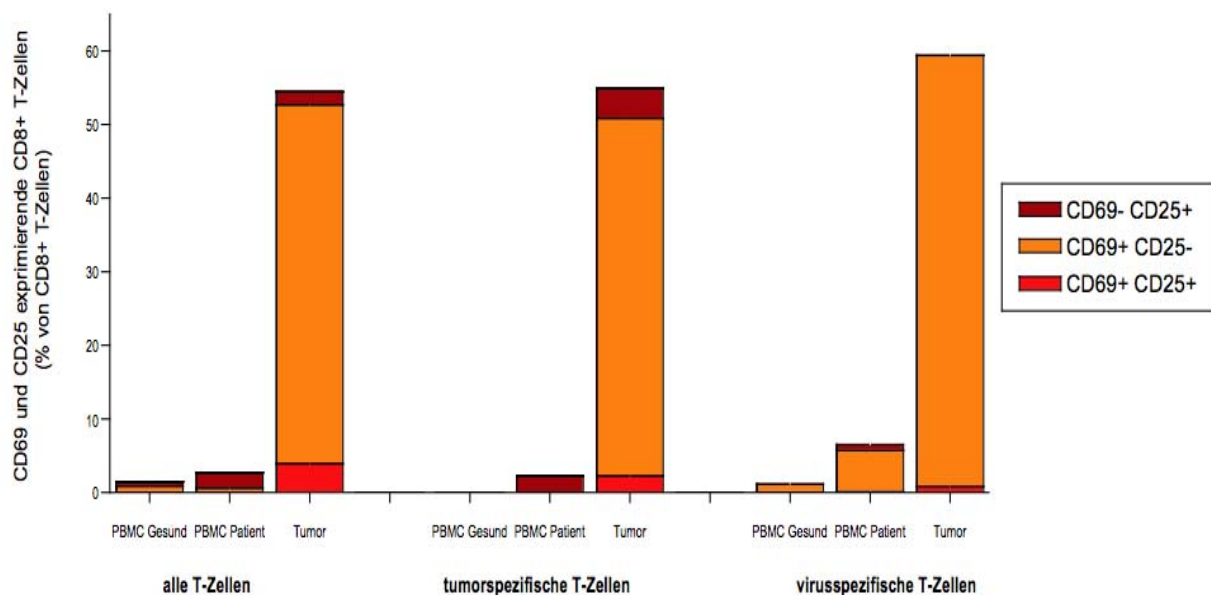


Abb. 12 Expression von CD69 und CD25 in tumorspezifischen und virusspezifischen T-Zellen im peripheren Blut von gesunden Spendern (n = 5) und Melanompatienten (n = 13) und in tumorinfiltrierenden T-Zellen in Metastasen von Melanompatienten (n = 29).

4.2. Analyse einer möglichen Anergie der tumorinfiltrierenden T-Zellen

Wenn also, wie gezeigt, tumorspezifische T-Zellen gegenüber dem Blut verstärkt im Tumor vorhanden sind und ein Teil von ihnen sogar antigenabhängig aktiviert wird, warum ist dann keine produktive Immunantwort zu erkennen, die zu einer kompletten Eliminierung aller Tumorzellen führt?

Ein möglicher Mechanismus, um die Aktivierung von T-Zellen zu verhindern, ist die Degradierung der TCR ζ -Kette. Dies verhindert eine Weiterleitung des vom TCR eingehenden Signals, da die TCR ζ -Kette die Bindungsdomänen für die zur weiteren Aktivierung nötigen Tyrosinkinasen enthält. In anderen Tumoren konnte eine erfolgte Degradierung der ζ -Kette bei tumorinfiltrierenden T-Zellen schon gezeigt werden⁸. Dem alleinigen Wirken dieses Mechanismus steht allerdings entgegen, dass bei voller Degradierung der ζ -Kette die Zelle gar nicht mehr auf TCR-Stimuli reagieren könnte und komplett anerg wäre, also auch nicht mehr mit Expression von CD25 auf einen TCR-Stimulus reagieren könnte. Inwiefern die tumorinfiltrierenden T-Zellen im Melanom von einer Degradierung der ζ -Kette betroffen sind wurde im folgenden getrennt für CD4+ und für CD8+ T-Zellen untersucht (Abb. 13 und 14).

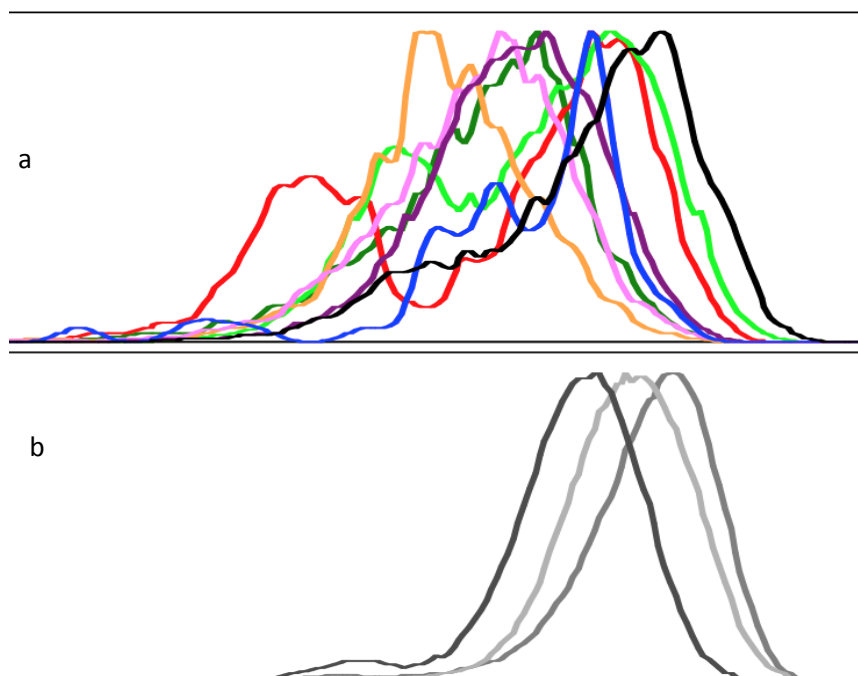


Abb. 13 Expression der TCR ζ -Kette in CD4 T-Zellen, dargestellt als Histogramm-Overlays (normiert auf % des jeweiligen Maximums) der Fluoreszenzintensität in (a) verschiedenen Melanom-Metastasen (n=8) und (b) im peripheren Blut von gesunden Spendern (n=3).

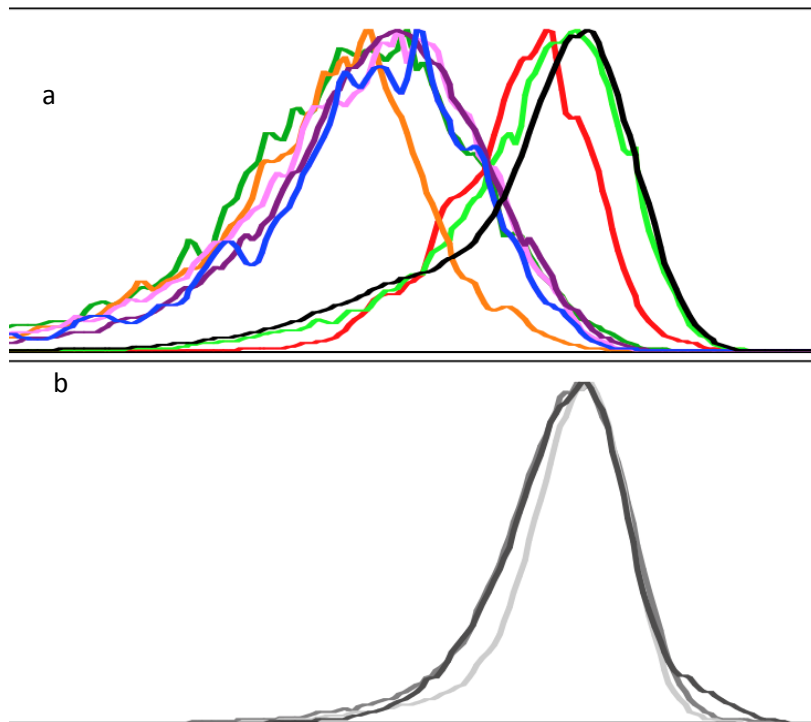


Abb. 14 Expression der TCR ζ -Kette in CD8 T-Zellen, dargestellt als Histogram-Overlays (normiert auf % des jeweiligen Maximums) der Fluoreszenzintensität in (a) verschiedenen Melanom-Metastasen (n=8) und (b) im peripheren Blut von gesunden Spendern (n=3).

In über der Hälfte der analysierten Melanomproben weisen die T-Zellen ganz oder in Teilen keine oder eine deutlich reduzierte ζ -Kette auf. In den restlichen ca. 40% der Proben ist die ζ -Kette aber in vergleichbarer Stärke wie in PBMCs gesunder Spender exprimiert.

Interessanterweise unterscheidet sich Art und Ausmaß des Verlustes der ζ -Kette bei CD4+ und CD8+ T-Zellen. Bei den CD4+ Zellen gibt es "Mischformen" bei denen nur in einem Teil der Zellen die ζ -Kette degradiert ist und der Rest der Zellen weist die volle normale Expression auf oder aber die Intensität der Expression ist insgesamt bei allen Zellen etwas geringer, aber noch vorhanden. Bei den CD8+ T-Zellen hingegen ist das Bild deutlich homogener. Hier wird die ζ -Kette entweder komplett auf allen infiltrierenden Zellen degradiert oder sie ist in voller Stärke vorhanden. Leider standen zu den hier untersuchten Proben nicht genügend Informationen (z.B. aus anderen Analysen) zur Verfügung, die eine Korrelation des "Shifts" mit z.B. dem Aktivierungszustand oder der Spezifität der Zellen ermöglichen würden.

4.3. Differenzierungsstatus der tumorinfiltrierenden T-Zellen

Ein weiterer möglicher Grund für die Anreicherung dysfunktionaler oder unproduktiver T-Zellen im Tumor könnte auch die spezifische Migration von Zellen eines terminalen Differenzierungsstatus in den Tumor, oder die rasche Differenzierung der vorhandenen Zellen in diesen terminalen und dysfunktionalen Zustand, sein.

Wie T-Zellen auf einen möglichen Antigen-Stimulus reagieren, hängt neben der Expression aller nötigen Signaltransduktionsmoleküle wie der TCR ζ -Kette auch von ihrem aktuellen Differenzierungsstatus ab. Naive T-Zellen, die noch keinen Kontakt mit ihrem Antigen hatten, benötigen einen deutlich stärkeren und komplexeren Stimulus als weiter differenzierte Effektorzellen. Nach der Stimulation reagieren naive T-Zellen im Gegensatz zu differenzierten T-Zellen außerdem mit zeitlicher Verzögerung und geringerer Produktion von Zytokinen. Nach ersten erfolgten Kontakten mit dem entsprechenden Antigen kann die T-Zelle in eine Memory- oder eine Effektor-Zelle mit voller Funktionalität differenzieren. Nach häufigem wiederholtem Antigenkontakt kommen die meisten Zellen dann in einen terminal differenzierten Status in dem sie nur noch bestimmte Effektorfunktionen ausüben können, aber ihre Proliferationskapazität fast vollständig eingebüßt haben. Hält der Zustand der ständigen Antigenstimulation länger an, so reagieren die terminal differenzierten Effektor-T-Zellen mit immer weniger effektiven Funktionen, bis sie ihre Effektivität schließlich vollständig einbüßen. Dieser Zustand wird auch als "Exhausted" (engl. erschöpft) beschrieben.

Die wichtigsten Marker zur Unterscheidung des Differenzierungsstatus sind zwei verschiedene Isoformen von CD45; CD45RA, auf naiven und terminal differenzierten Zellen, und CD45RO auf Memory T-Zellen¹¹⁸. Soweit beschrieben wird zu jeder Zeit nur einer der beiden Marker exprimiert, daher wurde in den beschriebenen Experimenten nur CD45RA gemessen und auf die Bestimmung von CD45RO verzichtet. Daneben wurde noch CD57 als Marker für späte Effektor- und terminal differenzierte T-Zellen herangezogen.

Der Differenzierungsstatus der T-Zellen wurde in den analysierten Proben anhand der Kombination der Expression der zwei Marker CD45RA und CD57 klassifiziert. Die naiven Zellen exprimieren viel CD45RA aber kein CD57 (CD45RA+ CD57-), während die weiter differenzierten T-Zellen, die auch als Memory (engl. Gedächtnis) Zellen beschrieben werden, CD45RA herunterregulieren und im Verlauf der weiteren Differenzierung langsam CD57-positiv werden. Die terminal differenzierten Zellen schließlich behalten die CD57-Expression bei und regulieren CD45RA wieder herauf (CD45RA+ CD57+).

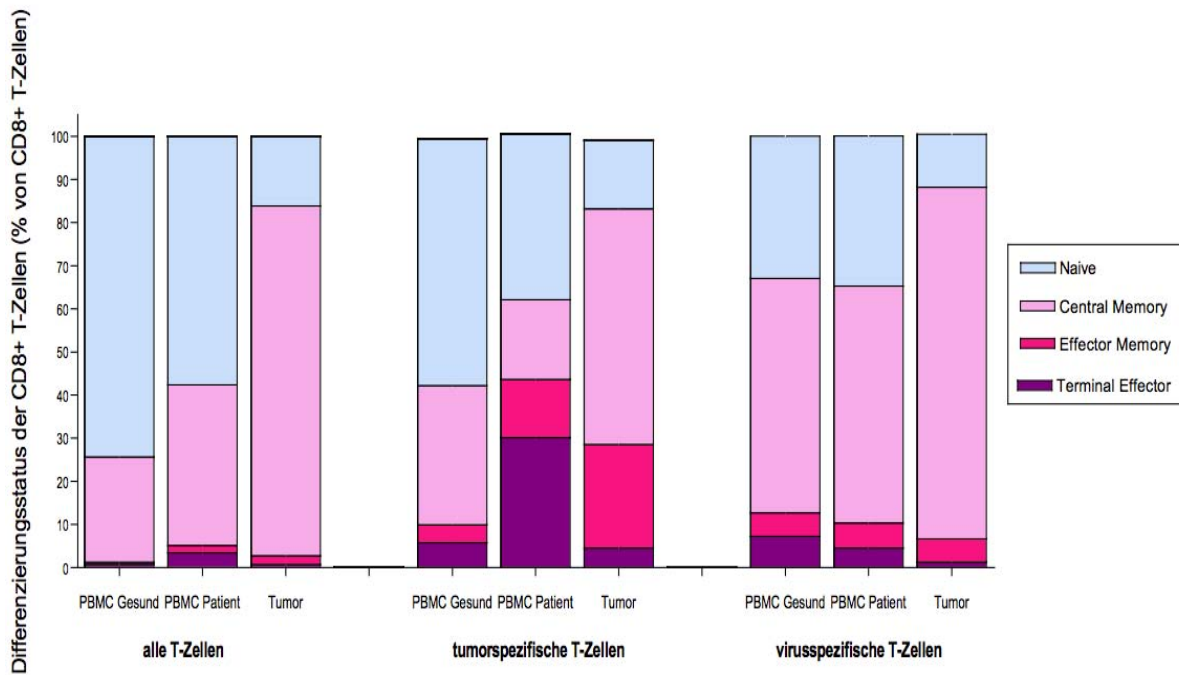


Abb. 15 Differenzierungsstatus von tumorspezifischen und virusspezifischen T-Zellen im peripheren Blut von gesunden Spendern (n = 5) und Melanopatienten (n = 13) und in tumorinfiltrierenden T-Zellen in Metastasen von Melanopatienten (n = 29). Die Klassifizierung erfolgte mittels der Marker CD45RA und CD57 in folgender Weise: CD45RA+ CD57- = naive Zellen, CD45RA- CD57- = Central Memory Zellen, CD45RA- CD57+ = Effektor Memory Zellen, CD45RA+ CD57+ Terminal Effektor (terminal differenzierte Zellen).

Die Verteilung der peripheren T-Zellen aus dem Blut von gesunden Spendern und Patienten ist relativ ähnlich, wobei der Großteil der Zellen einen naiven Phänotyp aufweist und der Rest überwiegend aus Memory-T-Zellen besteht. Allerdings zeigt sich im Blut der Patienten ein höherer Anteil von terminal differenzierten Effektor und Effektor-Memory T-Zellen und der Anteil der naiven T-Zellen ist geringer. Dies könnte am höheren Alter der Melanopatienten gegenüber den jüngeren gesunden Spendern und der damit zusammenhängenden häufigeren antigenen Stimulation liegen.

Bei der Analyse des Differenzierungsstatus der virusspezifischen T-Zellen in Blut und Tumorproben zeigte sich, dass diese im Blut von Gesunden und Melanopatienten die gleiche Verteilung der Zellen auf die verschiedenen Differenzierungsstadien haben. Im Tumor findet man allerdings einen erhöhten Anteil von Memory T-Zellen.

Die tumorspezifischen T-Zellen im Blut von Gesunden unterscheiden sich nur unwesentlich von den anderen Zellen im Blut; der überwiegende Anteil ist naiven Phänotyps der Rest Memory. Allerdings ist der Anteil der terminal differenzierten Zellen deutlich höher und entspricht in etwa dem der virusspezifischen T-Zellen im Blut. Daraus könnte man schließen, dass es in Gesunden Reaktionen gegen Selbstantigene (= untersuchte TAA) gibt die im Körper "persistieren" ähnlich wie die untersuchten Viren. Die tumorspezifischen T-Zellen im Blut von

Melanompatienten weisen einen deutlich höheren Anteil von terminal differenzierten und effektor memory T-Zellen auf. Die terminalen Effektorzellen finden sich aber hauptsächlich im Blut der Patienten, aber kaum im Tumor, was darauf zurückzuführen sein könnte, dass diese Zellen stärker rezirkulieren als die Memory T-Zellen. Die tumorspezifischen T-Zellen im Tumor zeichnen sich hauptsächlich durch einen Memory-Phänotyp aus, wobei etwa zwei Drittel der Gruppe der Central Memory Zellen und ein Drittel den Effektor Memory Zellen zuzurechnen ist. Bei den tumorspezifischen T-Zellen im Tumor wurde insgesamt der höchste Anteil von Zellen mit Effektor-Memory Phänotyp gefunden.

Der Anteil der Zellen mit naivem Phänotyp ist bei den tumor- und den virusspezifischen T-Zellen in etwa gleich, aber in den unterschiedlichen Kompartimenten unterschiedlich.

4.4. Bedeutung von regulatorischen T-Zellen bei der lokalen Immunsuppression im Tumor

4.4.1. Voraussetzungen für Induktion und Migration von Tregs in den Tumor

4.4.1.1. Analyse der Expression von CCL22 und IDO im Tumor mittels PCR

Regulatorische T-Zellen (Tregs) spielen bei der Kontrolle von Immunantworten eine wichtige Rolle. Verschiedene Unterarten von Tregs können T-Zell-basierte Immunantworten indirekt (durch Sekretion inhibitorischer Zytokine) oder direkt (durch Ligand-Rezeptor-Interaktionen und direkte Lyse von Effektor-Zellen) inhibieren. Natürliche (schon im Thymus gebildete) nTregs und weitere Subtypen wie die induzierbaren Tregs (iTregs), die aus "normalen" CD4+ T-Zellen unter bestimmten Bedingungen wie z.B. im Umfeld von IDO-exprimierenden Zellen entstehen, sind bekannt.

T-Zellen migrieren entlang der Gradienten bestimmter Chemokine ins Gewebe. Für nTregs konnte gezeigt werden, dass sie vor allem aufgrund von CCL22 in verschiedene Tumore migrieren^{75,119}.

Die Möglichkeit der Migration von nTregs via CCL22 in die untersuchten Tumorproben und die Möglichkeiten der Induktion von iTregs via IDO wurden mittels qualitativer RT-PCR mit CCL22- bzw. IDO-spezifischen Primern in Proben von gesunder Haut, PBMCs von gesunden Spendern und Melanompatienten, Melanom-Biopsien und Melanomzelllinien sowie einer kutanen Lymphomzelllinie und verschiedener primär kutaner Lymphom-Tumorproben untersucht (Tab. 12).

Art der Probe	CCL22	IDO
Kontrolle Haut (Brust)	+++	+++
	+++	++
	+++	+++
	+	+++
	+	++
Kontrolle Haut (Vorhaut)	- +	+
	+++	+++
	+	+
Kontrolle PBMCs gesund	++	+++
	-	+
	-	+
	-	- +
Kontrolle PBMCs Melanompat.	-	+
	-	+
	-	++
Lymphom (Linie, MF)	+	+
Lymphom(Tumorzellen, SS)	-	-
	-	-
	-	-
Melanom (Linie)	-	+++
	-	++
	-	++
	-	- +
	-	-
	-	-
	-	+
	-	-
	-	+
	-	+
	-	+
	-	-
	-	- +
	-	- +
	-	-
	-	+
	-	+
	-	-
	-	-
	-	-
	-	+++
	-	-
	-	- +
-	+	
Melanom (Biopsie)	-	-
	-	+
	-	+
	- +	++
	-	+
	+	++
	-	- +
	-	-
	- +	++
	-	+
	+	++
+	++	
+	+	

Tab. 12 Ergebnisse der qualitativen RT-PCR mit CCL22- bzw. IDO-spezifischen Primern in Proben von gesunder Haut, PBMCs von gesunden Spendern und Melanompatienten, Melanom-Biopsien und Melanomzelllinien sowie einer kutaner Lymphomzelllinie und verschiedener primär kutaner Lymphom-Tumorproben. Die Bewertung der Expressionsstärke erfolgte durch visuelle Begutachtung der Banden ("- = keine Bande, "+" schwache Bande, "++" = normale Bande, "+++ = starke Bande).

CCL22 wird in gesunder Haut und in etwa der Hälfte der Melanom-Biopsien exprimiert, aber, abgesehen von einer Ausnahme, nicht von Melanomzelllinien oder PBMCs. Welche Zellen in Tumoren CCL22 sekretieren und aufgrund welcher Stimuli dies geschieht ist bislang noch nicht bekannt.

IDO wird von vielen Zellen (inkl. solchen in gesunder Haut und PBMCs) und auch in den meisten Melanom-Biopsien und vielen Melanomlinien exprimiert. Das vorhandene Transkript allein ist allerdings kein Beweis für die funktionelle Aktivität von IDO, da die enzymatische Aktivität primär über posttranslationale Modifikation reguliert wird.

Prinzipiell besteht also die Möglichkeit, dass nTregs via CCL22 in Tumore infiltrieren oder iTregs durch die Aktivität von IDO direkt im Tumor induziert werden. Dies trifft allerdings nicht auf alle untersuchten Tumorproben zu.

4.4.2. Tregs im analysierten Tumorgewebe

4.4.2.1. Malignes Melanom

Ein direkter Nachweis von Tregs ist nur mit Hilfe von Suppressions-Assays bei denen die potentiellen Tregs aufgereinigt zu T-Zell-Stimulationsansätzen zugesetzt werden und dann die Inhibierung der T-Zell-Antwort gemessen wird, möglich. Dieser Ansatz war aufgrund des limitierten Materials der Melanom-Tumorproben nicht möglich. Mit Hilfe einer Kombination von Markern können Zellen die möglicherweise Tregs sind allerdings relativ gut identifiziert werden. Der Anteil von Zellen die tatsächlich die Funktion von Tregs haben ist normalerweise am höchsten bei Zellen die CD4+ CD25+ FoxP3+ CD127^{low} und CTLA4+ sind.

Der Anteil der Tregs unter den T-Zellen lag in den meisten untersuchten Tumorproben zwischen 0,1 und 4%, in einigen aber auch bis zu 9% der T-Zellen. Im Blut von gesunden Spendern war der Anteil der Tregs etwas geringer und lag zwischen 0,5 und 2%. Dies könnte auf eine leichte Akkumulation von Tregs in einigen der Tumoren hindeuten.

Als nächstes wurde analysiert, ob eine Akkumulation von Tregs im Tumor mit einem veränderten Anteil von infiltrierenden aktivierten CTL oder den gesamt vorhandenen CD4 oder CD8 T-Zellen korreliert (siehe Abb. 16). Ebenso wurde ein möglicher Zusammenhang zwischen dem Anteil der Tregs im Tumor und dem Überleben der Patienten (siehe Abb. 17) untersucht.

Für die Analyse möglicher Korrelationen wurde das Bestimmtheitsmaß R^2 verwendet. Ist R^2 nahe +1 bzw. -1, so besteht ein positiver bzw. negativer Zusammenhang (der aber nicht zwingend statistisch signifikant sein muss). Ist R^2 hingegen nahe Null (wie in den hier

untersuchten Fällen), so besteht kein linearer Zusammenhang zwischen den untersuchten Faktoren.

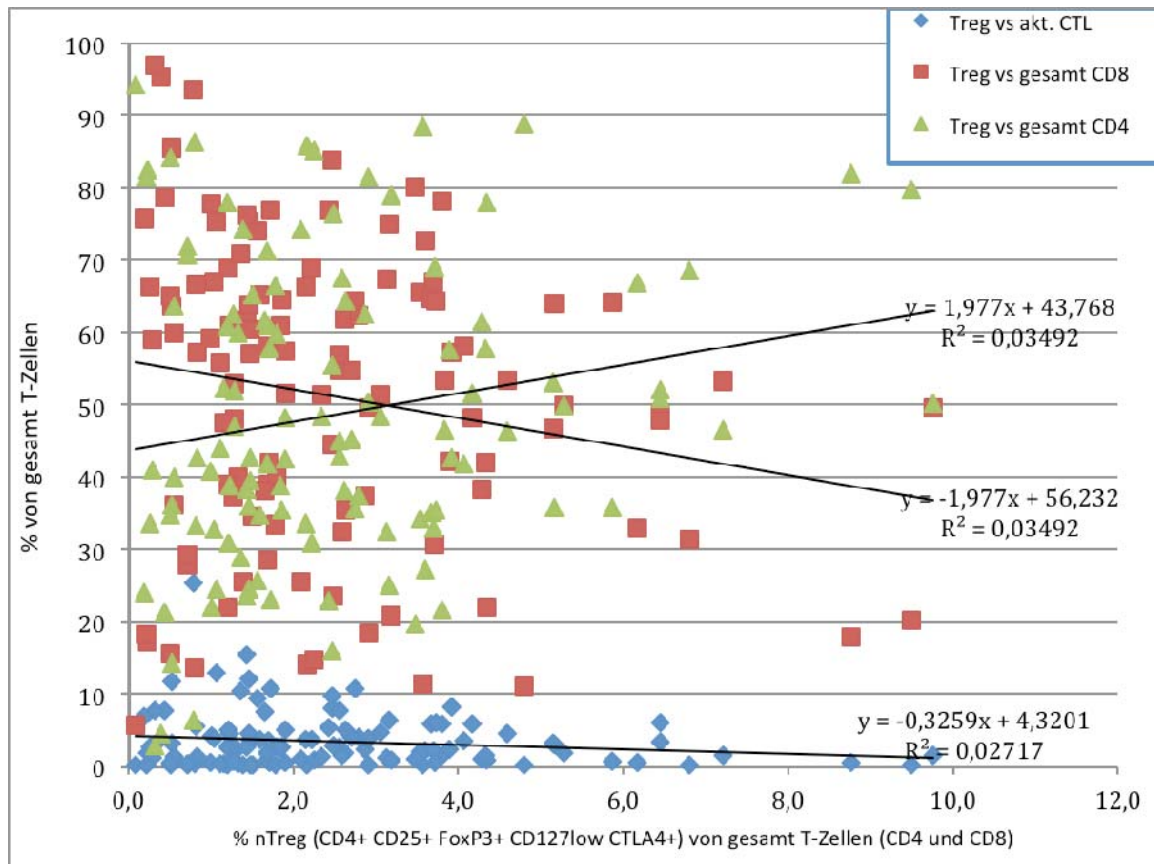


Abb. 16 Korrelation des Anteils der Tregs (CD4+ CD25+ FoxP3+ CD127low CTLA4+) mit dem Anteil anderer T-Zell-Populationen: nicht-Treg-CD4+ T-Zellen (grün), gesamt CD8+ T-Zellen (rot) und aktivierte CD8+ CTL (CD8+ und CD137+) (blau). Zusätzlich angegeben ist jeweils das Bestimmtheitsmaß R^2 , ist dieses nahe +1 oder -1, so besteht ein positive bzw. negative Korrelation.

Eine Korrelation von vorhandenen Tregs mit dem Anteil von infiltrierenden CD4+ oder CD8+ T-Zellen oder auch dem Anteil von aktivierten (CD137 positiven) CD8+ T-Zellen, wie in Abb. 16 dargestellt, besteht nicht (Bestimmtheitsmaß R^2 ist nahe Null in allen gezeigten Analysen).

Anders als von einigen Arbeitsgruppen publiziert, konnte bei den analysierten Proben auch keine Korrelation zwischen dem Anteil der infiltrierenden Tregs und dem Überleben der Patienten, wie dargestellt in Abb. 17, festgestellt werden, da auch hier das Bestimmtheitsmaß R^2 nahe Null war..

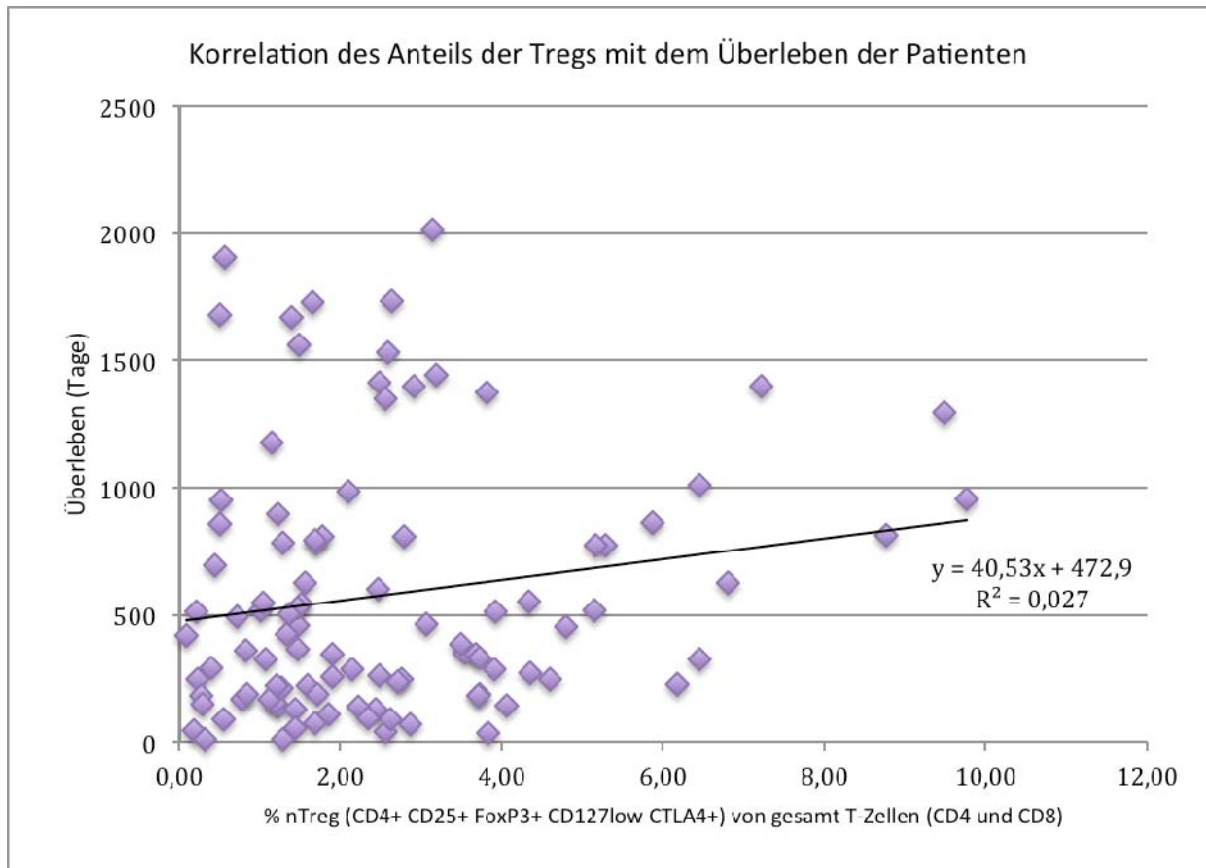


Abb. 17 Korrelation des Anteils der Tregs mit dem Überleben der Patienten mit Angabe des Bestimmtheitsmaßes R^2 , ist dieses nahe +1 oder -1, so besteht eine positive bzw. negative Korrelation.

Es zeigt sich, dass der Anteil von Tregs in Melanommetastasen sehr heterogen ist. Die Inhibition von Effektorzellen durch Tregs ist zwar ein möglicher Mechanismus der Immunsuppression im Melanom, aber anscheinend nicht zwingend erforderlich für das Fortbestehen des Tumors, da in einigen der Tumorproben nur extrem geringe Frequenzen von Zellen mit Treg-Phänotyp gefunden wurden. Auch besteht keine Korrelation zwischen dem Anteil der Tregs im Tumor und dem Überleben der Patienten, was die Annahme der Entbehrlichkeit von Tregs für den Tumor weiter unterstützt.

4.4.2.2. Kutanes Lymphom

Um ein breiteres Bild der Bedeutung von Tregs in Tumoren zu erhalten wurde eine weitere Tumorentität, das Lymphom des Menschen, auf erhöhte Frequenzen von Tregs untersucht. Das Lymphom wird in verschiedene Klassen unterteilt. Neben dem Blut und Tumorproben von Patienten mit Mycosis Fungoides wurde auch Material von Patienten mit nicht näher klassifizierbarem CTCL (im folgenden nur als CTCL bezeichnet) untersucht. Bei Patienten mit

Sezary Syndrom wurden nur Zellen aus dem Blut analysiert, da sich diese Form des Lymphoms primär Leukämie-artig im Blut manifestiert.

Bei der Analyse von T-Zellen in den Proben von Lymphom-Patienten ist zu beachten, dass es sich bei den Tumorzellen ebenfalls um T-Zellen handelt. Eine Unterscheidung von Tumorzellen und T-Zellen ist dann möglich, wenn der Vbeta-Typ der Tumorzellen bekannt ist. Dann können T-Zellen, die die entsprechende Vbeta Kette nutzen, spezifisch mit einem Antikörper angefärbt werden, wobei es sich dann um die Tumorzellen sowie einen kleinen Teil "normaler" T-Zellen mit gleichem Vbeta handelt. Wie hoch der Anteil der Tumorzellen ist, kann leider aus den Analysen nicht geschlossen werden, eine weitere Abgrenzung zum Beispiel via Größe und Granularität (FSC/SSC) ist nicht sicher möglich.

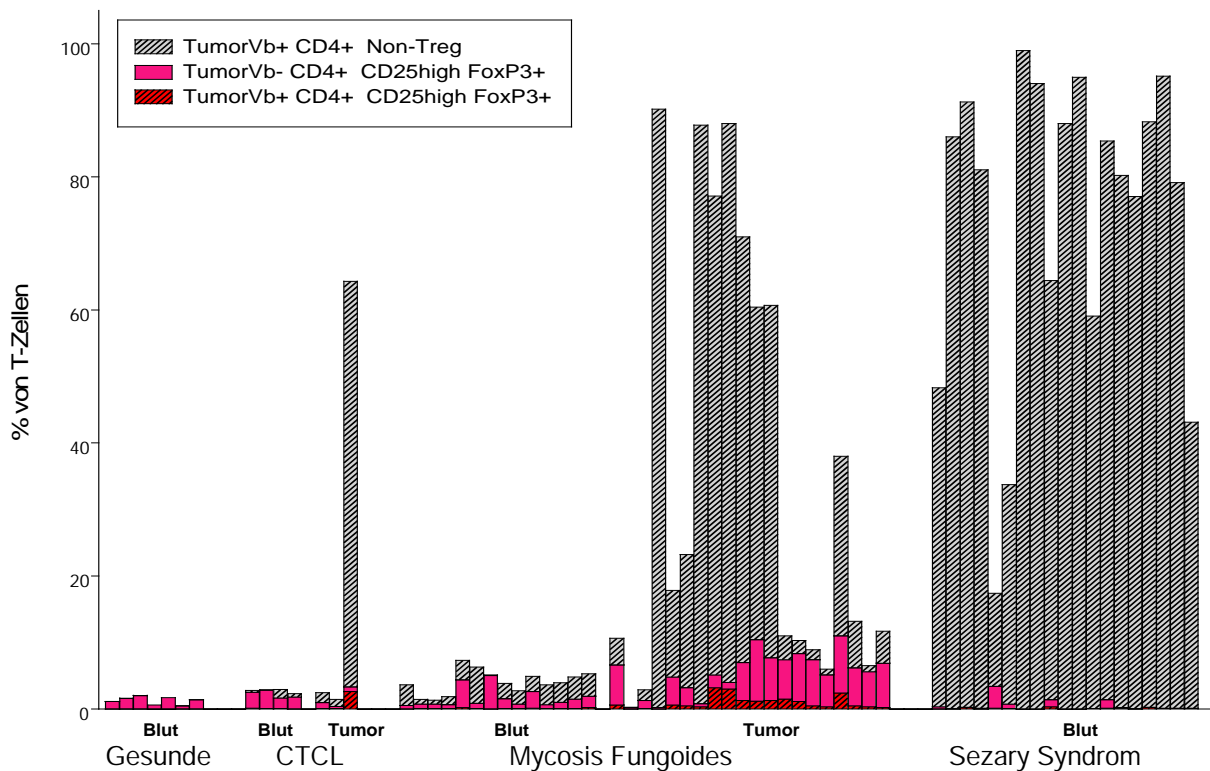


Abb. 18 Analyse des Anteils von Zellen mit Treg-Phänotyp in Proben von Patienten mit verschiedenen Lymphomen (CTCL = nicht näher klassifiziertes CTCL, im Gegensatz zu Mycosis Fungoides und Sezary Syndrom) und gesunden Probanden. Hierbei wurde zwischen den mutmaßlichen Tumorzellen und den restlichen Zellen des Patienten unterschieden mittels der Färbung der TCR-Vbeta-Kette der Tumorzellen.

Weiterhin zu beachten ist, dass bei Proben von Patienten mit nicht näher klassifiziertem CTCL oder Mycosis Fungoides Blut und Tumor unterschieden werden kann, wohingegen die Proben von Patienten mit Sezary-Syndrom aus Leukapheresen, also dem peripheren Blut stammen, da der Tumor eine leukämische Ausbreitung zeigt.

Die Analysen in Abb. 18 zeigen, dass der Anteil der Tregs im Blut von Lymphompatienten ähnlich dem im Blut von Gesunden ist. Bei Patienten mit Sezary-Syndrom ist der Anteil von Tregs sogar geringer als bei Gesunden, da ein großer Teil der Zellen im Blut Tumorzellen sind und anscheinend auch die Tregs "verdrängt". Lediglich im Tumorgewebe bei Mycosis Fungoides läßt sich ein leicht erhöhter Anteil von Tregs, allerdings auch nicht bei allen Patienten, feststellen. In einigen, aber nicht allen Tumoren ist also der Anteil von Tregs gegenüber dem Blut erhöht.

Im Gegensatz zu den Beobachtungen anderer Gruppen^{120,121} weisen die in dieser Arbeit analysierten Lymphom-Tumorzellen in der Regel keinen klassischen Treg-Phänotyp auf. Die Differenz zu den bislang publizierten Ergebnissen läßt sich allerdings damit erklären, dass in dieser Arbeit Tregs nur als solche definiert wurden, wenn die Expression von CD25 hoch bei gleichzeitiger Expression von FoxP3 war. In den anderen Arbeiten wurden die Tumorzellen mit regulatorischem Phänotyp als zwar FoxP3 positiv, aber beim Sezary-Syndrom generell als CD25 negativ und bei MF als "meist CD25 positiv" beschrieben.

Auch beim Lymphom wirken Tregs (entsprechend der klassischen Definition) also nicht als notwendiger Mechanismus der Immunsuppression im Tumor.

4.5. Coinhibition bei der lokalen Immunsuppression von T-Zellen

4.5.1. Coinhibitorische Liganden aus der B7-Familie

Neben dem Einfluß von regulatorischen T-Zellen können auch andere Zellen über die Expression von costimulatorischen oder coinhibitorischen Liganden Einfluß auf die Immunantwort nehmen. Das Prinzip der Costimulation/Coinhibition kann vor allem bei T-Zell-Antworten eine Rolle spielen, die auf einer nur schwachen Bindung des TCR an sein zugehöriges Antigen beruhen. Man geht davon aus, dass ein Großteil der tumorspezifischen T-Zellen einen solch niederaffinen TCR besitzen, da die Zellen mit hochaffinen TCRs gegen "quasi-selbst" Tumorantigene zum größten Teil im Rahmen der negativen Selektion im Thymus deletiert sein sollten.

Damit eine Coinhibition erfolgen kann, müssen ein entsprechender Rezeptor auf den T-Zellen und der jeweils passende Ligand auf der via TCR erkannten Zielzelle exprimiert sein. Die zurzeit am besten charakterisierten coinhibitorischen Rezeptoren auf T-Zellen sind PD1 und CTLA4. Diese können an je zwei verschiedene Liganden binden; im Fall von PD1 an B7-H1 und B7-DC und im Fall von CTLA4 an B7-1 und B7-2. Während B7-1 und B7-2 über die Interaktion mit CD28 auf der T-Zell auch costimulatorisch wirken können, sind für B7-H1 und B7-DC nur coinhibitorische Wirkungen beschrieben. Bei der Analyse der Expression der möglichen coinhibitorischen Liganden wurde daher nur auf B7-H1, B7-DC und zwei weitere coinhibitorische Vertreter der B7-Familie (B7-H3 und B7-H4) geschaut und nicht auf B7-1 und B7-2, da diese auch costimulatorisch sein können.

Um die Rolle der Coinhibition bei der lokalen Immunsuppression von T-Zellen im Tumor zu untersuchen, wurde zunächst das Vorhandensein der wichtigsten bekannten rein coinhibitorischen Liganden der B7-Familie analysiert. Die Detektion von B7-H1, B7-DC, B7-H3 und B7-H4 erfolgte sowohl auf mRNA-Ebene mittels PCR, als auch auf Protein-Ebene durch fluoreszenzmarkierter Antikörper auf Einzelzellebene mittels Durchflusszytometrie.

Bei der PCR-Analyse wurden cDNAs, die aus verschiedenen Gewebeproben und Zell-Linien gewonnen wurden, analysiert. Neben den Kontrollen aus gesunder Haut von Brustreduktionen und Beschneidungen (Vorhaut), isolierten Melanozyten und PBMCs von gesunden Spendern wurden Melanom-Tumorbiopsien und verschiedene Melanom-Zell-Linien analysiert. Die durchflusszytometrischen Analysen wurden nur an Zellen aus Melanombiopsien durchgeführt.

Art der Probe	B7-H1	B7-DC	B7-H3	B7-H4	
Gesunde Haut (Brustreduktion)	++	++	++	-	
	+	+	+	-	
	-	-	-	-	
	+	+	++	-	
	++	++	nd	nd	
Gesunde Haut (Vorhaut)	+	++	nd	nd	
	++	++	++	-	
	+	++	++	+	
	++	-+	+	-	
	++	-+	+	+	
Kontrolle Melanozyten	-	-	nd	nd	
	-	-	nd	nd	
Kontrolle PBMCs gesund	-+	-	nd	nd	
	+	+	-	-	
	+	-+	-	-	
	-	-	nd	nd	
	-+	-	nd	nd	
	+	-+	-	-	
Melanom (Linie)	++	++	++	-+	
	+	+	nd	nd	
	++	-+	++	++	
	++	-+	++	++	
	++	++	++	-	
	-	+	-+	-	
	-+	+	nd	nd	
	-+	++	++	-	
	+	++	+	-	
	-+	++	++	-	
	+	++	++	-	
	++	-+	++	-+	
	+	+	++	+	
	+	-+	nd	nd	
	+	+	++	-+	
	-	+	+	-	
	-+	+	+	-	
	++	++	++	-	
	+	+	++	-	
	-+	-+	-	-	
	+	++	++	-+	
	-+	+	++	-	
	+	+	++	-	
	++	++	++	++	
	+	-+	++	+	
	+	++	++	+	
	-+	+	++	-	
	+	+	++	-	
	++	-+	nd	nd	
	++	+	++	-+	
	++	++	++	+	
	Melanom (Biopsie)	+	+	++	-
		+	+	++	-
		+	+	+	-
		+	+	++	+
		-+	-+	++	+
		-	-+	nd	nd
		++	+	++	++
		-+	+	++	-
		+	+	+	-
-		-+	nd	nd	
+		+	++	+	
-		-	nd	nd	
++		+	++	-+	
-+		-+	nd	nd	
+		+	++	-	
-+		-+	nd	nd	
+		+	++	+	
++	-	nd	nd		
++	+	++	-+		

Tab. 13 Ergebnisübersicht der Expressionsanalyse mittels PCR von B7-H1, B7-DC, B7-H3 und B7-H4 in verschiedenen Zellen und Geweben. . Die Bewertung der Expressionsstärke erfolgte durch visuelle Begutachtung der Banden ("-" = keine Bande, "+" schwache Bande, "++" = normale Bande, "+++ = starke Bande).

Die PCR-Analyse (Tab. 13) zeigt die Expression von B7-H1, B7-DC und B7-H3 in gesunder Haut, im Tumorgewebe und auch in Melanomlinien, vereinzelt und schwächer auch in PBMC, aber nicht in Melanozyten. Interessant ist, dass B7-H3 besonders stark sowohl in den Melanomlinien als auch in den Tumorbiopsien exprimiert ist. B7-H1 und B7-DC sind oft etwas schwächer exprimiert und in einigen Melanomlinien und Biopsien auch gar nicht. B7-H4 wird nur sehr selten in gesundem Gewebe (Vorhaut) und stärker in Tumorlinien und im Tumorgewebe exprimiert, allerdings auch nur in etwa der Hälfte der untersuchten Proben.

Generell ist aber davon auszugehen, dass die Möglichkeit der Coinhibitor im Gewebe, unabhängig davon ob es gesundes oder Tumorgewebe ist, gegeben ist.

Um zu analysieren, auf welchen Zellen der Tumormikroumgebung die einzelnen coinhibitorischen Liganden exprimiert sind, wurden die vier Liganden zusammen mit verschiedenen Markern zur Charakterisierung unterschiedlicher Zell-Subgruppen mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern gefärbt und per Multiparameter-Durchflusszytometrie auf Einzelzellebene untersucht.

Die Klassifizierung der verschiedenen Zell-Subgruppen im Tumor gestaltete sich z.T. schwierig, da über gewebeinfiltrierende APCs beim Menschen nur sehr wenig bekannt ist. Viele der Zell-Charakterisierungen wurden in Mausmodellen gemacht. Bei ersten Versuchen diese auf den Menschen zu übertragen zeigte sich jedoch, dass viele der in der Maus gültigen Markerkombinationen zur Definition der Subgruppen im Menschen keine Gültigkeit haben. Die Abgrenzung von Monozyten, B-Zellen und DC-Subsets untereinander war daher in den hier gezeigten Analysen nur eingeschränkt möglich, da lediglich auf die aus dem Blut bekannte Marker zurückgegriffen werden konnte. Im Gewebe haben diese Kombinationen aber nur eine begrenzte Gültigkeit (z.B. wurden schon CD19+ DCs und CD14+ DC-Subsets beschrieben¹²²). In Tab. 14 sind die hier verwendeten Kombinationen zusammengefaßt. Bei den CD11c- CD16+ Zellen könnte es sich sowohl um ein NK als auch ein Makrophagen-Subset handeln. Lediglich die Verwendung weiterer Marker wie z.B. CD56 hätte hier eine Unterscheidung ermöglicht. Die Verwendung weiterer Marker war allerdings nicht möglich, da keine ins Färbepanel integrierbaren fluoreszenzmarkierten Antikörper für die entsprechenden weiteren Marker zur Verfügung standen.

Subset-Bezeichnung	Abkürzung	Beschreibung
Monozyten	Mono	CD11c+ CD4+ CD14+
Zytotoxische T-Zellen	CD8+ TZ	CD3+ CD4-
Helfer T-Zellen	CD4+ TZ	CD3+ CD4+
NK-Zellen und/oder Makrophagen	NK+M	CD11c- CD16+
B-Zellen und DC-Subset	BZ	CD19+
Melanomzellen	Tumor	FSC/SSC high und CD16-, CD14-, CD3-, CD19-
Dendritische Zellen	DC	CD11c+ CD16-, CD14-, CD3-, CD19-

Tab. 14 Übersicht der angewendeten Klassifizierung nach Marker-Expression der verschiedenen Zell-Subgruppen.

Bis auf CD19-positive B-Zellen fanden sich alle zu untersuchenden Zell-Subgruppen in den analysierten Tumorproben, allerdings in sehr unterschiedlichen Mengen. Neben den Tumorzellen selbst waren vor allem T-Zellen und Monozyten in den analysierten Proben präsent. Der Anteil der NK-Zellen bzw. Makrophagen und der DCs schwankte stark, lag aber meist deutlich unter 1%.

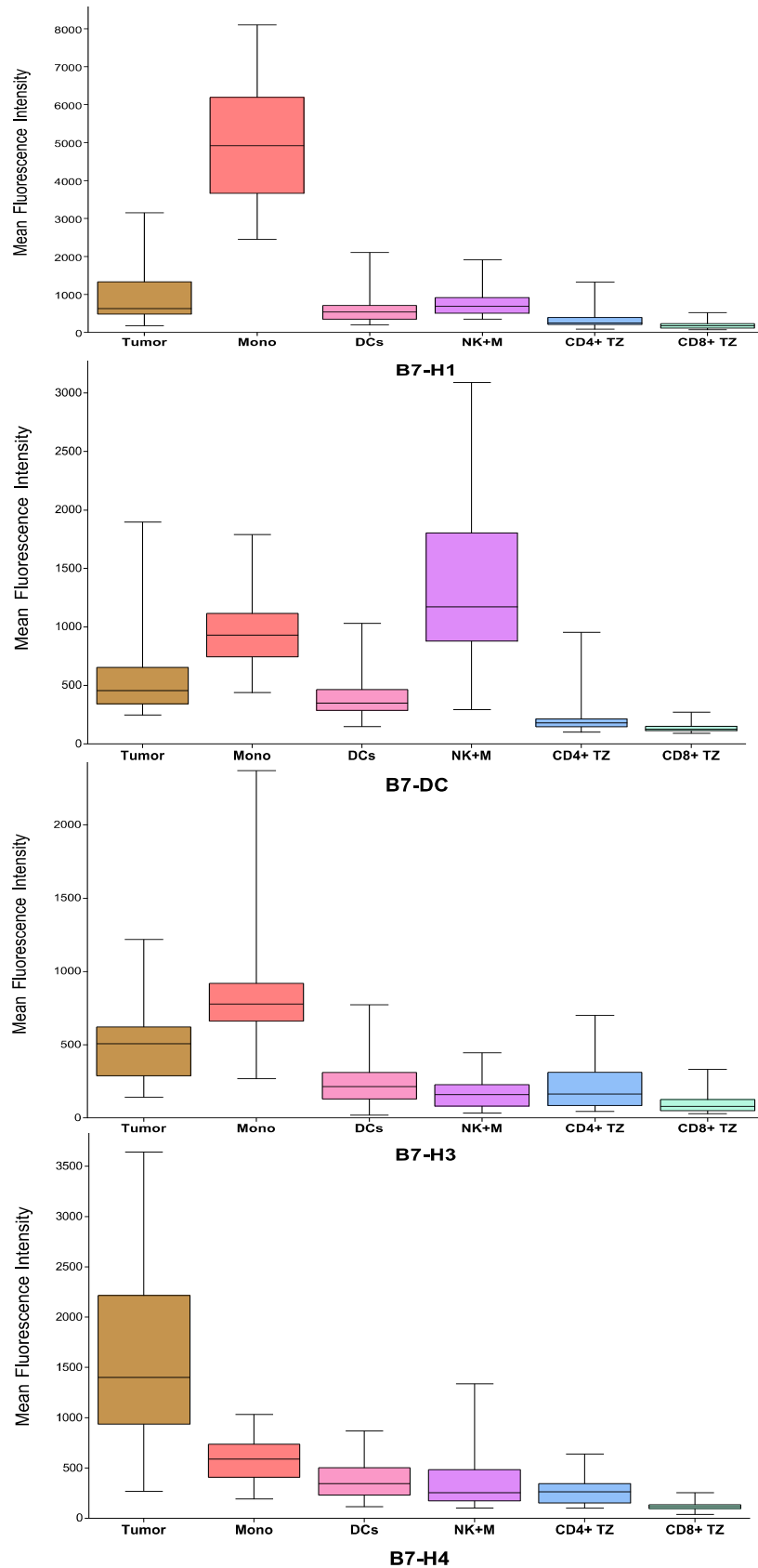


Abb. 19 Expression von B7-H1, B7-DC, B7-H3 und B7-H4 auf verschiedenen Zell-Subsets (je von links nach rechts: Tumorzellen, Monozyten, Dendritische Zellen, NK-Zellen bzw. Makrophagen, CD4+ T-Zellen und CD8+ T-Zellen) in Melanometastasen (n = 39). Erklärung der Box-Plot Statistik: Der Querstrich in der Mitte der Box gibt jeweils den Median an. Die Box gibt den Bereich, in der die mittleren 50% der Daten liegen (oberes und unteres Quartil). Die "Antennen" schließen 95% der Daten ein.

Die Analysen in Abb. 19 zeigen, dass die verschiedenen coinhibitorischen B7-Familienmitglieder präferentiell von unterschiedlichen Zellsubtypen exprimiert werden. Zu bedenken ist, dass die dargestellten Werte die relative Fluoreszenzintensität der gefärbten Zellen angeben. Anders als bei anderen Markern findet man für die hier analysierten Mitglieder der B7-Familie keine klar getrennten positiven und negativen Populationen. Die Definition eines negativen Cut-offs ist daher nicht ohne weiteres möglich und lediglich ein Vergleich der Expressionslevel möglich.

Es zeigt sich, dass B7-H1 fast ausschließlich auf den Zellen mit monozytärem Phänotyp und gering exprimiert auf den Tumorzellen zu finden ist, wohingegen B7-H4 nur von den Tumorzellen exprimiert wird. Das Expressionsmuster von B7-H3 und B7-DC ist nicht ganz so klar. B7H3 wird ohnehin eher schwächer exprimiert und wenn dann hauptsächlich auf Monozyten und schwäch

er auch auf den Tumorzellen selbst. B7-DC hingegen ist überwiegend auf dem NK-Zell oder Makrophagen Subset sowie in schwächerem Umfang auch auf den Monozyten und einzelnen Tumorzellen zu finden. Diese Beobachtungen decken sich auch mit den in Tab. 13 gezeigten PCR-Daten für die Tumorzellen. Eine Expression der coinhibitorischen B7-Familienmitglieder auf T-Zellen war praktisch nicht nachweisbar.

4.5.2. PD1 und CTLA4, die Rezeptoren der coinhibitorischen Liganden

Da die Expression der coinhibitorischen Liganden der B7-Familie auch im gesunden Gewebe sehr weit verbreitet ist, muss die Spezifität der Inhibition durch andere Faktoren, wie die Expression der zugehörigen Rezeptoren vermittelt werden. Im Folgenden wurde daher deren Expression auf den tumorinfiltrierenden T-Zellen (TIL) untersucht.

Der gemeinsame Rezeptor auf T-Zellen für B7-H1 und B7-DC ist PD1. Die Rezeptoren auf T-Zellen für B7-H3 und B7-H4 sind noch nicht bekannt. Neben den coinhibitorischen Mitgliedern der B7-Familie gibt es auch die costimulatorischen B7-1 (CD80) und B7-2 (CD86). Für diese ist sowohl ein costimulatorisch (CD28) aber auch ein coinhibitorisch wirkender Rezeptor, (CTLA4) beschrieben. Eine Übersicht der beschriebenen coinhibitorischen Rezeptor-Ligand-Interaktionen zwischen T-Zellen und Antigenpräsentierenden Zellen (APC) ist in der Einleitung auf Abb. 3 dargestellt.

4.5.2.1. Zusammenhang von PD1 und CTLA4-Expression mit dem Überleben der Patienten

Um die Relevanz der Expression von PD1 und CTLA4 für die Immunsuppression im Tumor einzuschätzen, wurde zunächst der Zusammenhang zwischen der Expression der Rezeptoren auf den TIL und der klinischen Prognose der Patienten analysiert. Die Darstellung erfolgte mit Hilfe von Kaplan-Meier-Diagrammen. Dabei wird auf der Ordinate der Anteil der noch lebenden Patienten (in %) aufgetragen. Für die Abszisse wurde die Zeit zwischen der Entnahme des analysierten Tumors und dem Ableben des Patienten gewählt. Das analysierte Patientenkollektiv wurde entsprechend des Anteils der T-Zellen die den entsprechenden Rezeptor aufweisen in zwei etwa gleich große Gruppen aufgeteilt. Insgesamt wurden 121 Tumorproben und Patienten auf diese Weise analysiert (eine Auflistung aller analysierten Proben befindet sich in Tabelle 5).

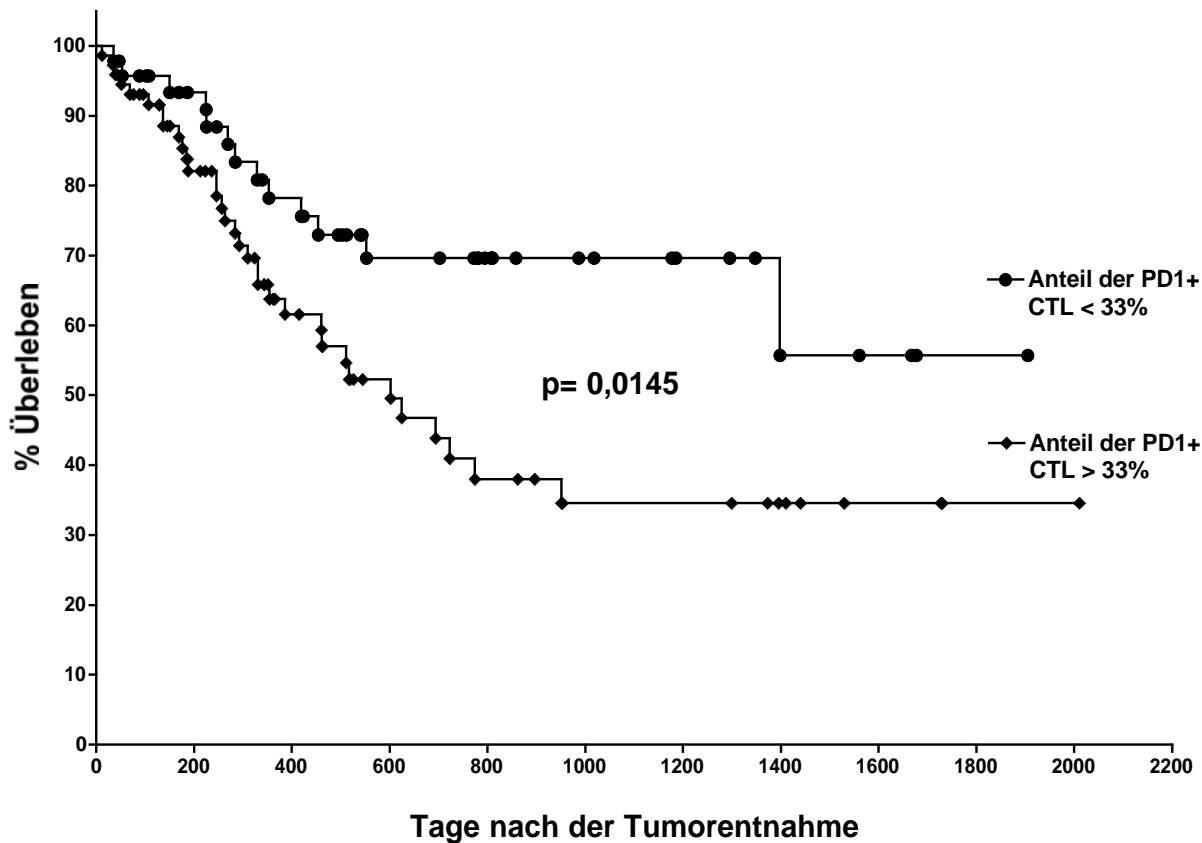


Abb. 20 Kaplan-Meier-Diagramm der Abhängigkeit des Überlebens des Patienten vom Anteil der T-Zellen im Tumor, die PD1 exprimieren. Dazu wurden die Patienten in zwei etwa gleich große Gruppen aufgeteilt, die eine mit einer Expression von PD1 auf weniger als 33% der CTL und die andere mit einer Expression von PD1 auf mehr als 33% der CTL im Tumor. Es wurden insgesamt 121 Tumorproben und Patienten analysiert (n=121).

Das Kaplan-Meier-Diagramm in Abb. 20 zeigt einen signifikanten Zusammenhang ($p=0,0145$) zwischen dem Anteil der PD1-exprimierenden CTL und dem Überleben der Patienten. Dies ist ein erster Hinweis auf die Bedeutung von PD1 für die Immunsuppression in der Tumormikroumgebung. Besonders hervorzuheben ist, dass sich die Überlebenskurven von Patienten mit hohem Anteil von PD1-positiven T-Zellen und solchen mit niedrigem schon relativ früh trennen. Vergleicht man dies mit den in Abb. 21 gezeigten Überlebenskurven bezogen auf die Expression von CTLA4 wird der Unterschied besonders deutlich.

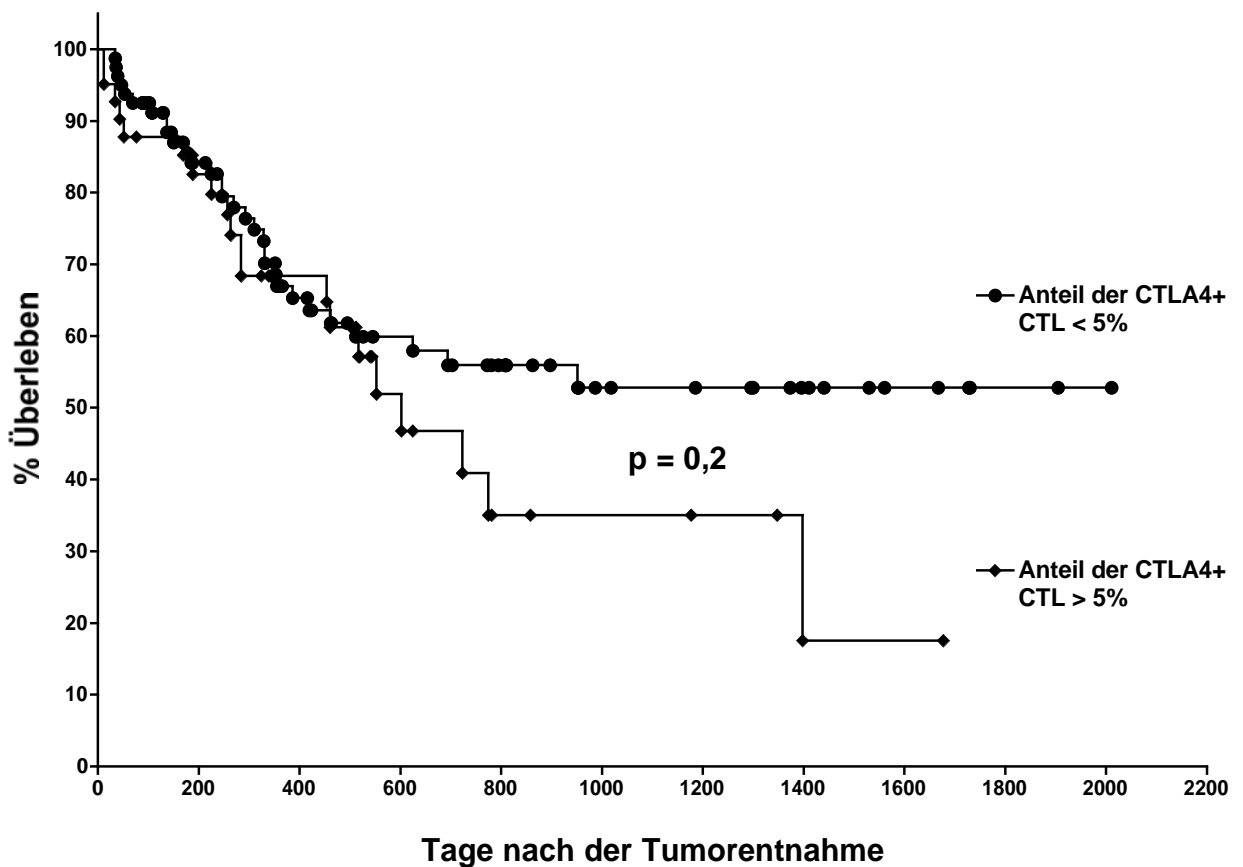


Abb. 21 Kaplan-Meier-Diagramm der Abhängigkeit des Überlebens des Patienten vom Anteil der T-Zellen im Tumor, die CTLA4 exprimieren. Dazu wurden die Patienten in zwei etwa gleich große Gruppen aufgeteilt, die eine mit einer Expression von CTLA4 auf weniger als 5% der CTL und die andere mit einer Expression von CTLA4 auf mehr als 5% der CTL im Tumor. Es wurden insgesamt 121 Tumormproben und Patienten analysiert ($n=121$).

Im Gegensatz zu PD1 zeigt sich beim Anteil der CTLA4-exprimierenden CTL im Tumor kein signifikanter Zusammenhang mit der klinischen Prognose der Patienten. Die ersten knapp 2 Jahre verlaufen die Überlebenskurven sogar nahezu deckungsgleich.

4.5.2.2. Expression von PD1 und CTLA4 auf antigenspezifischen T-Zellen

Um zu untersuchen, inwiefern der durch PD1 vermittelte immunsuppressive Effekt eher antigenspezifisch oder unspezifisch auf CTL wirkt, wurde im folgenden in einem kleineren Patientenkollektiv (n=28) die Expression von PD1 und CTLA4 auf tumorspezifischen und virusspezifischen T-Zellen im Blut von Gesunden und Patienten sowie in Tumorproben analysiert. Voraussetzung für die Analysen war neben einer ausreichenden Qualität und Quantität des Zellmaterials auch die Übereinstimmung mindestens eines HLA-Allels des Patienten bzw. Spenders mit den zur Verfügung stehenden Peptid-HLA-Multimeren.

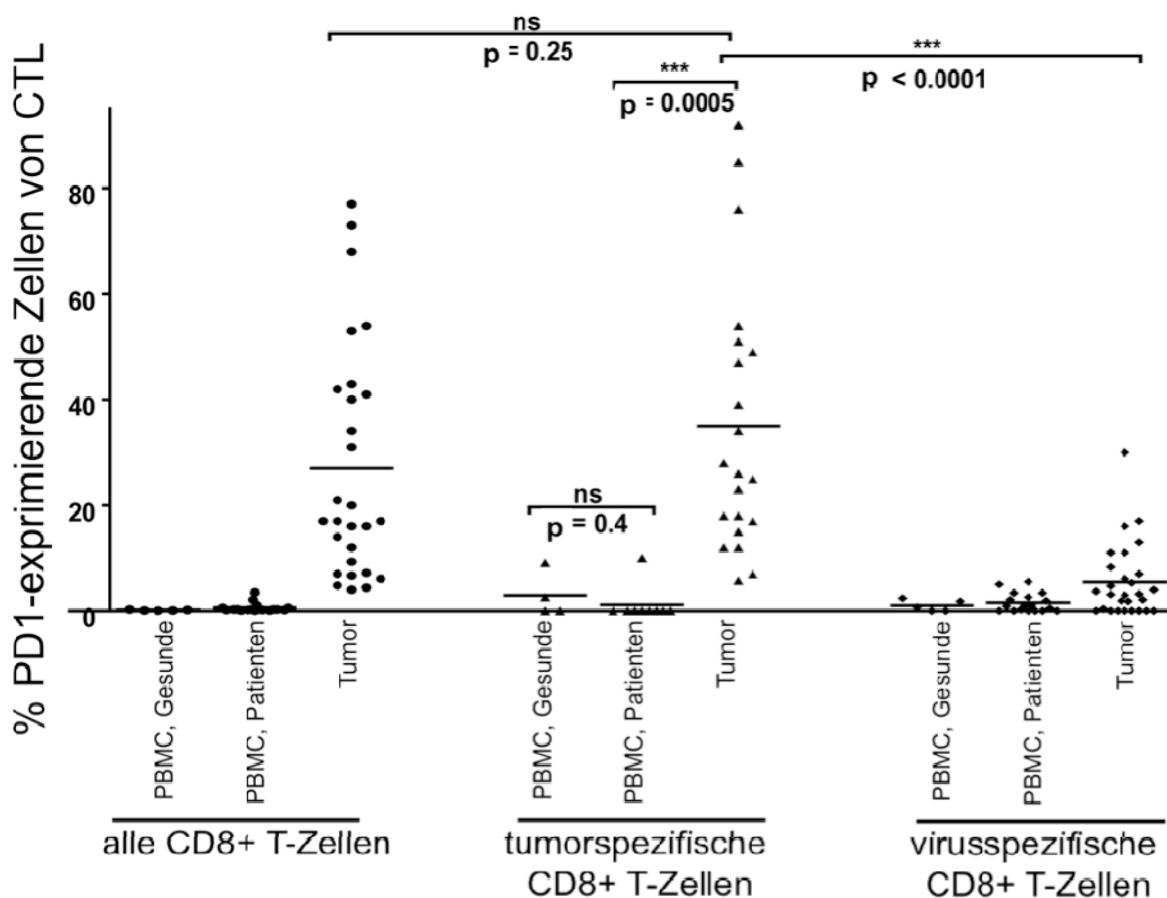


Abb. 22 Expression von PD1 auf tumorspezifischen und virusspezifischen CTL im Blut von Gesunden und Patienten sowie in Tumorproben. Als Statistik zum Vergleich der Populationen wurde ein unverbundener t-Test gewählt, wobei zwei erhaltene Signifikanzwerte beide $P < 0,001$ und damit als höchst signifikant (***) einzustufen sind..

Die Expression von PD1 ist nahezu ausschließlich auf T-Zellen in den Tumorproben zu beobachten. Auch die tumorspezifischen T-Zellen im Blut von Patienten waren PD1-negativ. Allerdings war die Expression von PD1 nicht komplett auf die tumorspezifischen T-Zellen im Tumor beschränkt. Auch die virusspezifischen T-Zellen im Tumor wiesen teilweise PD1 auf.

Deren PD1-Expression war allerdings signifikant ($p < 0,0001$) geringer als auf den tumorspezifischen.

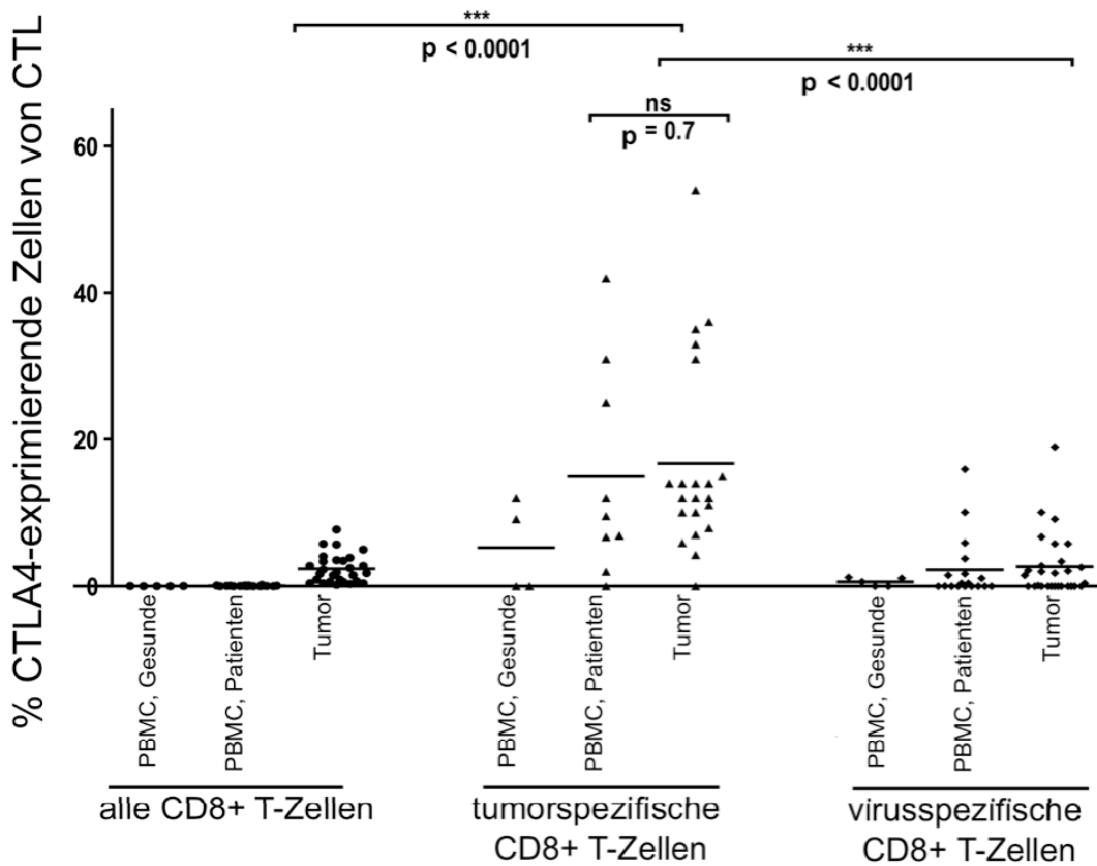


Abb. 23 Expression von CTLA4 auf tumorspezifischen und virusspezifischen CTL im Blut von Gesunden und Patienten sowie in Tumorproben. Als Statistik zum Vergleich der Populationen wurde ein unverbundener t-Test gewählt, wobei zwei erhaltene Signifikanzwerte beide $P < 0,001$ und damit als höchst signifikant (***) einzustufen sind..

Im Gegensatz zu PD1 ergab die Expression von CTLA4 auf tumorspezifischen und virusspezifischen T-Zellen in Blut und Tumorproben ein völlig anderes Bild. CTLA4 wurde zwar wie PD1 überwiegend von tumorspezifischen CTL exprimiert, dies aber nicht nur lokal im Tumor, sondern auch im Blut von Gesunden und Patienten. Der Anteil von CTLA4-positiven Zellen an den tumorspezifischen T-Zellen war im Mittel im Blut und im Tumor von MM-Patienten etwa gleich hoch, wohingegen er im Blut von gesunden Spendern deutlich geringer war.

Allerdings fällt auf, dass im Blut von gesunden Spendern die virusspezifischen T-Zellen ebenso wie das Gros der Zellen unbekannter Spezifität vollständig CTLA4-negativ sind. Lediglich einige der tumorspezifischen T-Zellen in Gesunden, die ja nur einen kleinen Anteil der Zellen insgesamt ausmachen, zeigen zum Teil CTLA4-Expression.

Interessant ist auch, dass der Anteil der CTLA4-positiven Zellen von allen CD8+ T-Zellen im Tumor signifikant niedriger ist, als bei den analysierten tumorspezifischen T-Zellen. Dies könnte darauf zurückzuführen sein, dass ein großer Teil der T-Zellen im Tumor nicht tumorspezifisch ist. Eine weitere Erklärung wäre aber auch, dass die T-Zellen mit Spezifität für die gemessenen Epitope sich anders verhalten als die Mehrheit der tumorspezifischen T-Zellen. Dafür gibt es allerdings keine weiteren Anhaltspunkte.

4.5.2.3. PD1 und CTLA4 bei Lymphomen

Wie schon bei der Analyse der Tregs wurde auch bei der Analyse von PD1 und CTLA4 eine weitere Tumorentität, das Lymphom des Menschen untersucht. Für die Analysen wurden Blut und Tumorproben von Patienten mit Mycosis Fungoides und von Patienten mit nicht näher klassifizierbarem CTCL (im folgenden nur als CTCL bezeichnet) untersucht. Zusätzlich noch Zellen aus Leukapheresen von Patienten mit Sezary Syndrom (weitere Erklärungen siehe Abschnitt 4.4.2.2). Bei der Analyse (Abb. 24) wurde zwischen den Tumorzellen (schraffierte Flächen) und den "normalen" T-Zellen (nicht schraffiert) des Patienten unterschieden mittels der Anfärbung der Tumorzell-eigenen V-Beta Kette des TCR.

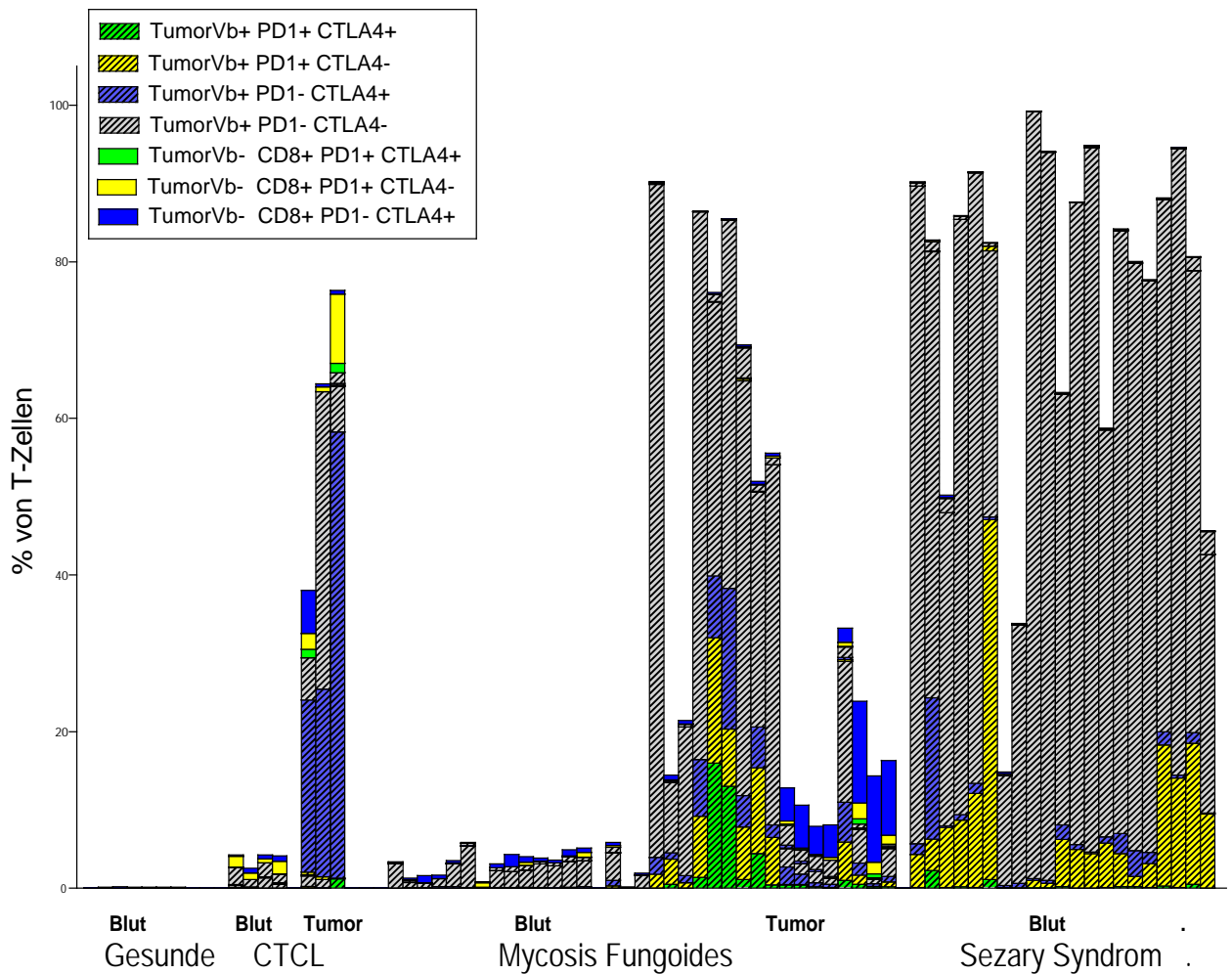


Abb. 24 Analyse des Anteils von Zellen die CTLA und/oder PD1 exprimieren in Proben von Patienten mit verschiedenen kutanen Lymphomen (CTCL = nicht näher klassifiziertes CTCL, im Gegensatz zu Mycosis Fungoides und Sezary Syndrom) und gesunden Probanden. Hierbei wurde zwischen den mutmaßlichen Tumorzellen (schraffiert) und den restlichen Zellen (nicht schraffiert) des Patienten unterschieden mittels der Färbung der TCR-Vbeta-Kette der Tumorzellen.

Bei Lymphomen scheinen hauptsächlich die Tumorzellen (klassifiziert durch vorher bestimmten Vbeta-Typ der Tumorzellen) PD1 bzw. CTLA4 zu exprimieren. Bei den nicht klassifizierten CTCL wird von den Tumorzellen im Tumorgewebe primär CTLA4 (bis zu 70% der Zellen) exprimiert, wohingegen beim Sezary-Syndrom eher PD1 von den Tumorzellen exprimiert wird, allerdings meist in nur von etwa 10 bis max. 40% der Zellen. Die Mehrzahl der T-Zellen mit dem Vbeta-Typ der Tumorzellen ist negativ für beide coinhibitorische Rezeptoren. Bei MF findet man sowohl PD1 als auch CTLA4, allerdings nur bei zwei Patienten deutlich, in der Mehrheit der Fälle eher weniger auf den Tumorzellen. Im Blut der Patienten mit nicht klassifiziertem CTCL und MF findet man nur einen sehr kleinen Teil von Zellen die mit dem Tumor-Vbeta-Antikörper angefärbt werden, bei denen es sich aber nicht unbedingt

um Tumorzellen handelt, da ja auch "normale" T-Zellen diesen Vbeta exprimieren können. In dieser Gruppe findet sich ein kleiner Anteil solcher, die PD1 oder CTLA4 exprimieren.

Leider kann, anders als bei den analysierten Melanom-Proben, keine Aussage zur Antigenspezifität der Zellen getroffen werden. Auch Daten bzgl. der klinischen Progression und zum Überleben der Patienten sind in den analysierten Lymphom-Proben kaum zugänglich, da das Lymphom bedeutend langsamer voranschreitet als das Melanom.

Festgestellt werden kann lediglich, dass das Bild der Expression von PD1 und CTLA4 beim Kutanen Lymphom wenig einheitlich ist. Die Bedeutung von PD1 und CTLA4 für die Regulation in Tumorzellen ist noch nicht geklärt und könnte deutlich von der in normalen T-Zellen abweichen.

4.6. Beeinflussung der T-Zellen durch die Tumorzellen durch lösliche Mediatoren oder direkten Kontakt

Die Wahl des Begriffes "Exhaustion" (engl. Auslaugung) für den dysfunktionalen Zustand der T-Zellen, so wie er von vielen anderen Arbeitsgruppen verwendet wird, legt die Vermutung nahe, dass auch die wiederholte Stimulation der T-Zellen durch Tumorzellen über einen bislang noch unbekanntem Mechanismus den Zustand der Dysfunktionalität in T-Zellen herbeiführen kann. Aber auch die Sekretion bislang noch unbekannter löslicher Mediatoren durch die Tumorzellen kommt als Mechanismus in Frage.

Um zu überprüfen, ob die Dysfunktionalität der T-Zellen durch lösliche Mediatoren oder direkten Kontakt von T-Zelle und Tumorzelle ausgelöst wird, wurden von Tumorproben verschiedener Patienten in vitro Kulturen angelegt. Eine Übersicht aller durchgeführten Kulturansätze ist in Tab. 15 zusammengestellt. Im Verlauf der Kultivierung wurden T-Zellen und Tumorzellen voneinander separiert und expandiert. In einigen Fällen (17 Proben) glückte die parallele Expansion von tumorspezifischen T-Zellen und Tumorzellen aus dem gleichen Patienten. In diesen Patienten wurden dann die T-Zellen mit den autologen Tumorzellen restimuliert, expandiert und dann die Reaktivität der T-Zellen auf die Tumorzellen getestet.

Zellen	Anzahl
Tumorproben kultiviert für parallele Anzucht von Tumorzellen und T-Zellen	68
Ausgewachsene Tumorzellen	37
Ausgewachsene T-Zellen	39
Proben mit ausgewachsenen T-Zellen und Tumorzellen, in denen T-Zellen mit Tumorzellen restimuliert und auf Spezifität getestet werden konnten	17
Proben mit Tumorzell-Reaktivität der T-Zellen	5

Tab. 15 Übersicht der für die Cokultur-Ansätze kultivierten Tumorproben

Bei einem der 5 getesteten Patienten mit Tumor-Reaktivität der T-Zellen zeigten die CTL eine besonders potente Reaktion, die bei Cokultur der Tumorzellen mit den entsprechenden CTL des Patienten zur Abtötung aller Tumorzellen führte und sich durch die Degranulation der CTL und die Produktion verschiedener Zytokine wie $IFN\gamma$, $TNF\alpha$ u.a. auszeichnete.

Die zuvor dysfunktionellen CTL waren durch die separate in vitro Kultivierung wieder zu voll funktionsfähigen Effektor-T-Zellen geworden. Kurze Restimulationen mit einer geringen Menge der Tumorzellen führten zu weiterer Proliferation und Anreicherung der tumorspezifischen CTL in der Kultur.

Leider glückte die Anreicherung und Expansion der T-Zellen mit Tumorzell-Reaktivität nur bei einem Patienten. Bei den anderen war die Proliferation von entweder T-Zellen oder Tumorzellen zu gering um weitere Ansätze zu machen.

Die CTL und autologen Tumorzellen des einen erfolgreich expandierten Patienten wurden im weiteren als Modellsystem genutzt um den Zustand der Dysfunktionalität der CTL in vitro wieder herbeizuführen und ggf. auch Möglichkeiten zu testen die Induktion der Dysfunktionalität zu verhindern. Dafür wurden die verschiedenen im Folgenden gezeigten Cokultur-Experimente angesetzt.

4.6.1. Cokultur-Experimente

Um die Frage zu beantworten, ob die chronische Aktivierung der CTL durch die Tumorzellen der Grund für die mangelnde T-Zell-vermittelte Anti-Tumor-Antwort sein könnte, wurden im zuvor beschriebenen Modellsystem verschiedene Cokultur-Ansätze gemacht, wie in Abb. 25 gezeigt.

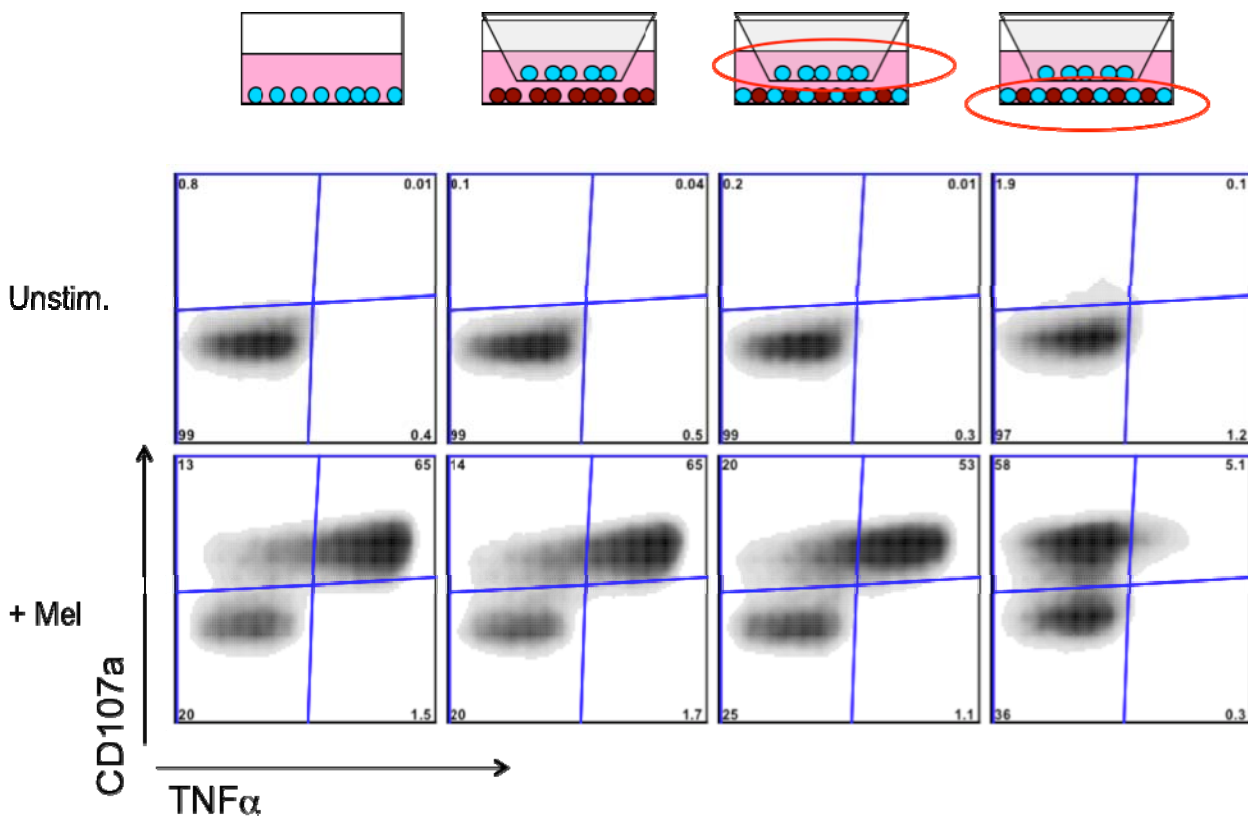


Abb. 25 Beispiel der Färbungen der verschiedenen Cokultur-Ansätze, dabei sind die T-Zellen in Türkis und die Melanomzellen in Braun dargestellt. Getestet wurde die Degranulation (CD107a) und TNF α -Produktion nach Stimulation mit den Melanomtumorzellen. In der ersten Spalte wurden als Kontrolle die T-Zellen ohne vorherige Cokultur mit den Tumorzellen getestet, in der zweiten Spalte erfolgte die Cokultur von T-Zellen und Tumorzellen separiert durch einen Transwell-Einsatz. In der dritten Spalte wurden T-Zellen getestet, die durch ein Transwell von einer Cokultur von T-Zellen mit Tumorzellen separiert waren. In der letzten Spalte ist das Ergebnis von T-Zellen die in direktem Kontakt mit Tumorzellen kokultiviert wurden.

Die wiederholte Stimulation der T-Zellen mit den Melanomzellen bzw. Cokultur der T-Zellen mit einem 10-fachen Überschuß von Melanomzellen führte nach 3 Tagen zu einem dysfunktionellen Zustand der T-Zellen. Dies erfolgte aber nur, wenn T-Zellen und Tumorzellen direkten Kontakt hatten. T-Zellen die lediglich über das Transwell-System mit den

Tumorzellen in Medienaustausch standen oder die im Medienaustausch mit der direkten T-Zell-Tumorzell-Cokultur standen wurden nicht beeinflusst. Der beobachtete Effekt wird also nicht durch einen löslichen Mediator, sondern nur durch direkten Zell-Zell-Kontakt vermittelt.

Der dysfunktionelle Zustand der T-Zellen war allerdings reversibel, wenn diese von den Melanomzellen getrennt und für mindestens 1 Woche mit IL2 kultiviert wurden (Einzelbeobachtungen, basierend auf kleinen Zellmengen und der wieder einsetzenden Tumorzell-Lyse und Proliferation der T-Zellen nach Restimulation. Es wurden keine erneuten Cokultur-Ansätze durchgeführt).

Die einsetzende Dysfunktionalität konnte in weiteren Versuchen nicht durch die wiederholte Gabe von blockierenden CTLA4-, PD1-, B7-H1- und B7-DC-Antikörpern oder die Blockade von IDO mittels 1-Methyl-Tryptophan verhindert werden. Diese Mechanismen scheiden also als Ursache für die Dysfunktionalität der hier getesteten CTL aus, was aber nicht heißt, dass sie in vivo im Patienten nicht eine wichtige Rolle spielen können. Die Korrelation von Überleben und Expression von PD1 in dieser Arbeit (siehe Abb. 20) legt nahe, dass zumindest die Expression von PD1 auf T-Zellen mit der Immunsuppression im Tumor zusammenhängt, ob nun Ursächlich oder nur als Folge dieser.

Bei den hier getesteten T-Zellen zeigt sich, dass die Zellen nicht aufgrund der hier getesteten coinhibitorischen Signale dysfunktional werden, sondern wegen anderer Mechanismen, die vom T-Zell-Tumorzell-Kontakt abhängen (siehe Abb. 26).

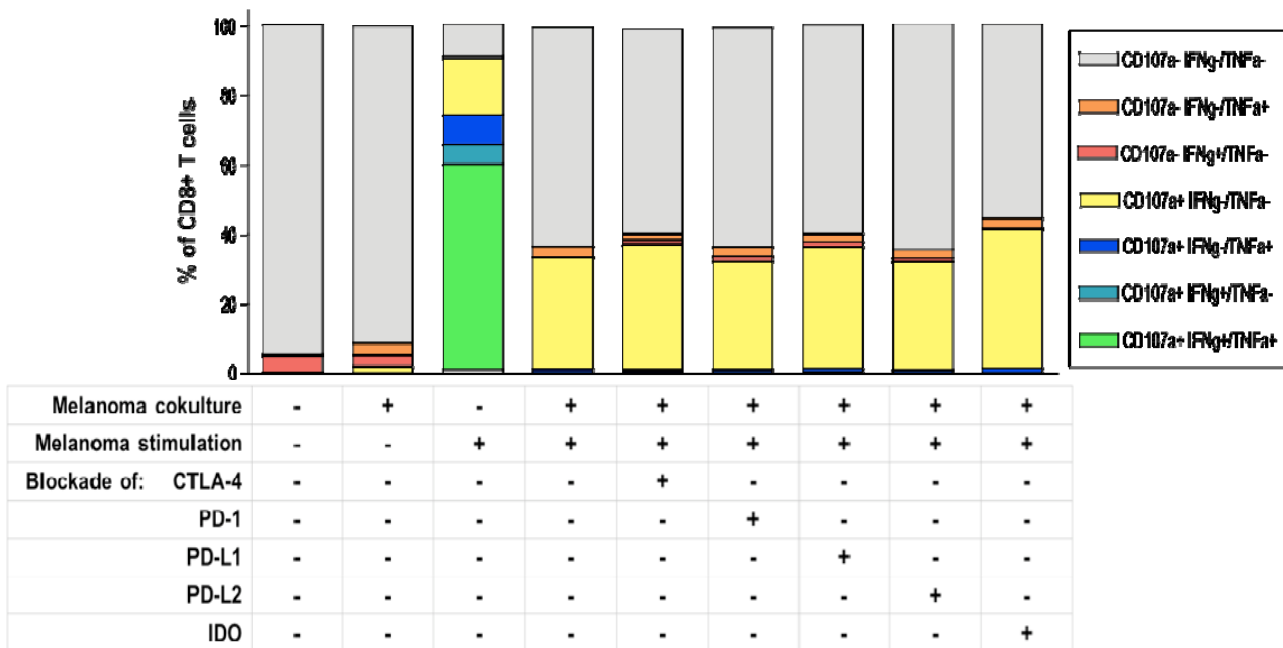


Abb. 26 Zusammenfassung der Ergebnisse des Kokultur-Ansatzes mit Blockierung verschiedener als immunsuppressiv angesehener Moleküle. Dafür wurden die tumorreaktiven T-Zellen mit den autologen Tumorzellen kokultiviert, teilweise in Gegenwart eines IDO-Inhibitors oder zusammen mit blockierenden Antikörpern gegen verschiedene coinhibitorische Rezeptoren oder Liganden. Dann wurden die T-Zellen erneut mit Tumorzellen stimuliert und die Degranulation (CD107a) und Produktion von IFN γ und TNF α gemessen.

Durch die Gabe hoher Dosen IL2 konnte der Kokultur-Effekt deutlich vermindert bzw. verzögert werden. Nach drei Tagen der Kokultur mit einem Überschuß an Tumorzellen und der zusätzlichen wiederholten Gabe großer Mengen IL2 zeigte sich zwar eine Reduktion der Produktion von IFN γ und TNF α und auch die lytische Aktivität bzw. Degranulation war deutlich geringer, aber die Anti-Tumor-Reaktivität war partiell noch erhalten (siehe Abb. 27).

Die durch den T-Zell-Tumorzell-Kontakt induzierte Dysfunktionalität kann also durch IL2 verzögert oder abgeschwächt werden. IL2-Mangel als Ursache für die Dysfunktionalität kann man daraus allerdings nicht ableiten, da die Dysfunktionalität ja primär durch den Kontakt mit den Tumorzellen und nicht durch fehlendes IL2 induziert wird (im in Abb. 27 in der dritten Spalte gezeigten Ansatz reagieren die T-Zellen sehr stark ohne zusätzliches IL2 und ohne Kokultur auf die Stimulation mit den Melanomzellen).

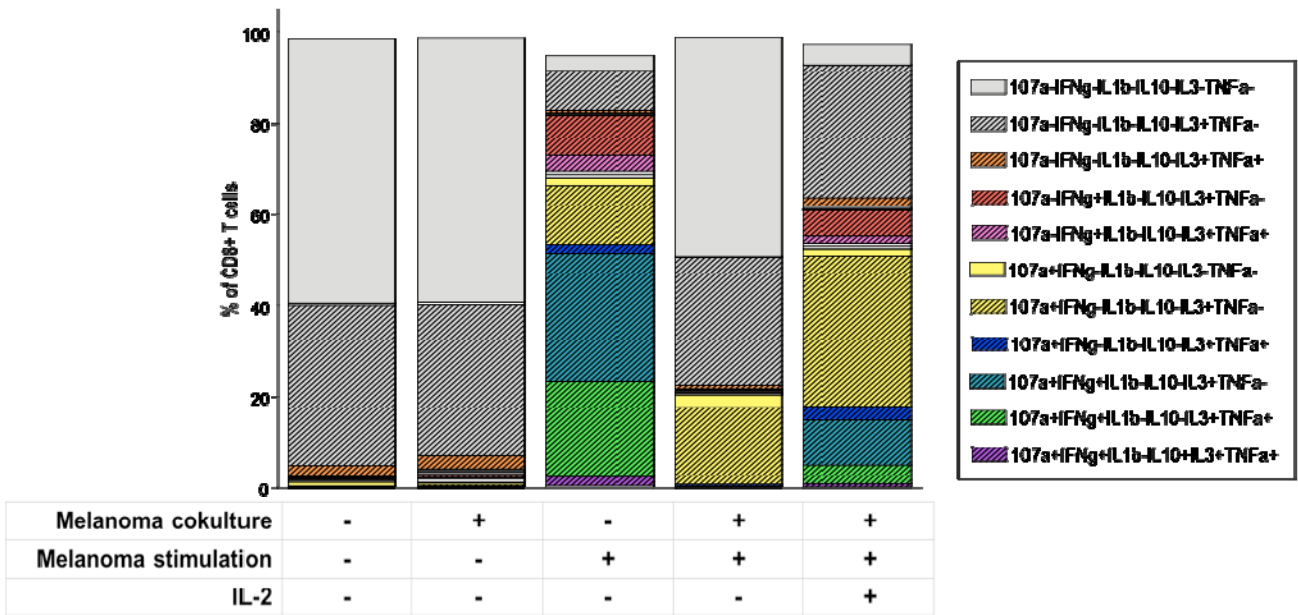


Abb. 27 Ergebnisse des Cokultur-Ansatzes mit Abschwächung des Cokultur-Effektes durch die Gabe von IL2. Dafür wurden die tumorreaktiven T-Zellen teilweise mit den autologen Tumorzellen kokultiviert, mit oder ohne die wiederholte Gabe (an allen drei Tagen) von IL2. Dann wurden die T-Zellen erneut mit Tumorzellen stimuliert und die Degranulation sowie Produktion von IFN γ , IL1b, IL10, IL3 und TNF α gemessen.

Durch die Stimulation von T-Zellen mit PMA/ Ionomycin kann die TCR-Aktivierung umgangen werden, indem die darunter liegenden Signalwege (PKC, aktiviert durch PMA und Calcineurin, aktiviert durch Kalziumeinstrom ausgelöst durch den Porenbildner Ionomycin) direkt angeschaltet werden. In Abb. 28 ist das Cokultur-Experiment mit einer zusätzlichen PMA/ Ionomycin-Stimulation zu sehen.

Es zeigte sich, dass auch durch die Gabe von PMA/ Ionomycin der Großteil der Zellen nicht aktiviert werden konnte, was für einen Block in der Signaltransduktion unterhalb von PKC und Calcineurin spricht.

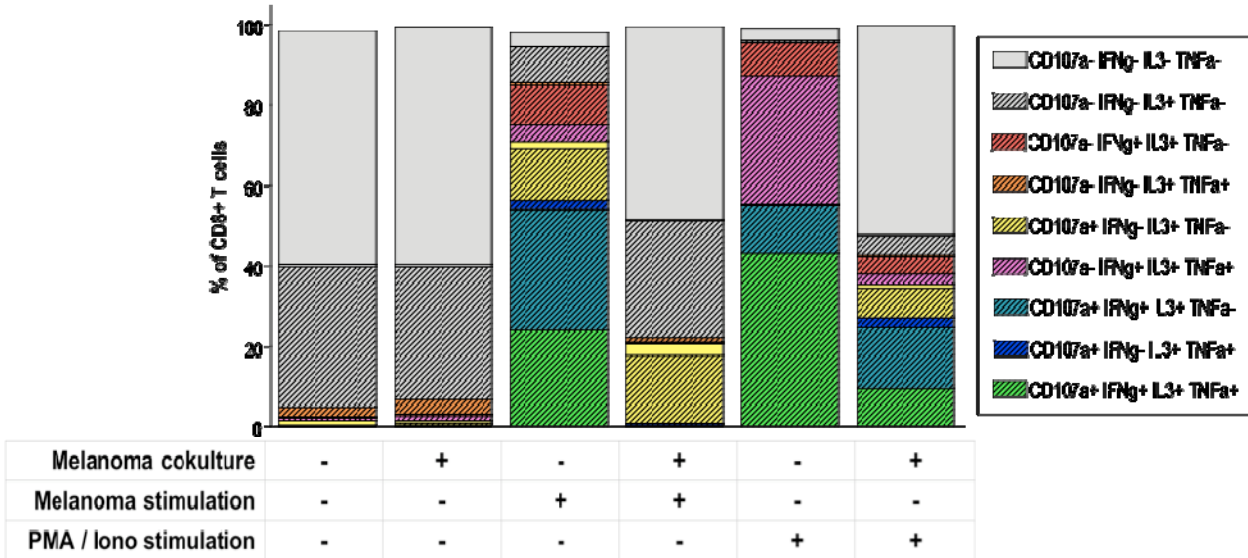


Abb. 28 Ergebnis des Versuches die Dysfunktionalität der T-Zellen mit PMA/ Ionomycin-Stimulation zu umgehen.

Interessant ist, dass es eine Hierarchie zu geben scheint, in der die T-Zell-Funktionen durch den Kontakt mit den Tumorzellen "abgeschaltet" werden. Die Produktion von IFN γ und TNF α verschwindet schnell. Die Fähigkeit zur Degranulation bleibt am längsten (auch nach Cokultur mit den Tumorzellen) erhalten, ebenso wie die Produktion von IL3, welches aber auch basal von den nicht stimulierten T-Zellen produziert wird. Die Wirkung von IL2 und auch die Umgehung der TCR-Aktivierung mittels PMA/ Ionomycin scheinen sich direkt auf dieses hierarchische "Abschalten" auszuwirken und erhalten die Produktion von IFN γ und TNF α zumindest in einem Teil der Zellen.

5. Diskussion

In der vorliegenden Arbeit sollten verschiedene Hypothesen zu den Ursachen der ungenügenden anti-Tumor Immunantwort auf ihre Gültigkeit beim Malignen Melanom des Menschen getestet werden. Den untersuchten Hypothesen liegt zu Grunde, dass das Immunsystem prinzipiell in der Lage ist Tumorzellen zu erkennen und diese zu eliminieren. Diese Grundannahme wird durch drei Beobachtungen gestützt. Zum einen ist das Krebsrisiko immunsupprimierter Patienten deutlich erhöht^{51,52}. Zweitens kommt es, wenn auch selten, zu Spontanremissionen von Primärtumoren, aber auch einzelnen Metastasen im weiteren Verlauf der Erkrankung⁴³, die auf eine plötzlich einsetzende Immunantwort zurückzuführen sind. Und Drittens konnten mit Hilfe adoptiver T-Zell-Transfers und anderer immuntherapeutischer Verfahren schon komplette Remissionen bei Melanompatienten erzielt werden¹²³⁻¹²⁵.

Die primären Effektorzellen der Immunantwort gegen Tumore sind T-Zellen. Wenn also T-Zellen prinzipiell in der Lage sind Tumore zu eliminieren, dies aber in den meisten Patienten nicht geschieht, dann könnte dies verschiedene mögliche Ursachen haben. (1) Tumorspezifische T-Zellen infiltrieren den Tumor nicht in ausreichendem Umfang. (2) Die den Tumor infiltrierenden T-Zellen sind anerg i.e. dysfunktional. (3) Die tumorspezifischen T-Zellen befinden sich im Stadium terminaler Differenzierung und weisen nur noch reduzierte Effektorfunktionen auf. (4) Regulatorische T-Zellen limitieren die Immunantwort im Tumor. (5) T-Zell-Antworten in der Tumormikroumgebung werden durch Coinhibition blockiert. (6) Die Tumorzellen selbst blockieren T-Zell-Antwort durch Sekretion löslicher Faktoren oder durch direkten Kontakt.

Diese verschiedenen möglichen Mechanismen der Immunsuppression im Tumor wurden bislang meist isoliert und oft nur in (Maus-) Modellsystemen getestet. Am Patienten durchgeführte Untersuchungen immunsuppressiver Mechanismen erfolgten in größerem Umfang nur an Zellen aus dem peripheren Blut, wohingegen solche Analysen in humanem Tumorgewebe nur in sehr kleinen Fallzahlen vorliegen.

5.1. T-Zell-Infiltration

Die Analyse der Zusammensetzung der Tumore verdeutlichte die enorme Heterogenität des Melanoms. Der Anteil der T-Zellen in den analysierten Tumoren lag im Mittel bei knapp 10%. Die Streuung war allerdings sehr hoch und es kamen auch Tumore mit weniger als 1% aber auch mit bis zu 43% T-Zellen vor. Weitere lymphozytäre Zellen, wie sie im peripheren Blut zu

finden sind, waren nur in sehr geringem Umfang vorhanden, der größte Anteil davon waren Monozyten mit 0,7 %, andere Lymphozyten waren kaum nachweisbar. Dies spricht dafür, dass es sich bei den hier analysierten Zellen primär um Zellen aus dem Gewebe und nur zu einem sehr kleinen Teil um Zellen aus den Blutgefäßen in den Tumoren handelt.

Der Anteil der meßbaren tumorspezifischen T-Zellen im Blut der Patienten betrug nur 0,02 bis maximal 3 %, wohingegen der Anteil der meßbaren virusspezifischen T-Zellen deutlich höher, bei 0,5 bis zu 9,3 % lag. Die anscheinende deutliche "Überrepräsentation" virusspezifischer gegenüber tumorspezifischen T-Zellen könnte man damit erklären, dass zum einen die antiviralen Immunantworten deutlich stärker sind als die "quasi-autoimmun"-Tumorantworten und zum anderen, dass sich die virusspezifische Immunantwort auf einige wenige immundominante Epitope konzentriert für deren Detektion die pHLA-Multimere konzipiert sind. Bei der Anti-Tumor Immunantwort ist davon auszugehen, dass sich schon aufgrund der Fülle der möglichen Zielstrukturen die Immunantwort auf sehr viele oft noch unbekannte Spezifitäten verteilt. Es kann also mittels pHLA-Multimer nur ein sehr kleiner Ausschnitt des gesamten Spektrums an tumorspezifischen Zellen gemessen werden.

Um eine Aussage über eine mögliche migrationsbedingte Anreicherung der tumorspezifischen T-Zellen im Tumor zu machen, wurde das Verhältnis von tumorspezifischen zu virusspezifischen T-Zellen betrachtet. Im peripheren Blut lag das Verhältnis bei 0,1 wohingegen es im Tumor bei etwa 1 lag. Die tumorspezifischen T-Zellen sind also im Mittel im Tumor um den Faktor 10 (aber auch bis zu 40-fach) angereichert.

Die Anreicherung der tumorspezifischen T-Zellen im Tumor könnte entweder durch antigeninduzierte Proliferation oder durch eine verlängerte Retentionszeit der tumorspezifischen Zellen erklärt werden. Weiterhin könnten tumorspezifische Zellen sich auch in den tumordrainierenden Lymphknoten sammeln und so zu eine Art Abreicherung in der Peripherie führen, während die viruspezifischen T-Zellen hingegen mangels lokalem Infektionsgeschehen in der Peripherie zirkulieren. Da leider kein Material aus dem Tumor, einem Lymphknoten und dem Blut eines Patienten zur Verfügung stand, konnte diese Überlegung nicht weiter verfolgt werden.

Um zu testen, inwiefern eine antigeninduzierte Proliferation für die Anreicherung der tumorpezifischen T-Zellen verantwortlich sein könnte, wurde der Aktivierungszustand der tumor- und virusspezifischen T-Zellen analysiert. Die Analysen wurden mittels pHLA-Multimerfärbungen eines Teil des virusspezifischen bzw. tumorspezifischen Repertoires und der Messung der Expression der Aktivierungsmarker CD25 und CD69 durchgeführt.

Hintergrund der Analysen ist die Annahme, dass eine antigenspezifische Aktivierung die Voraussetzung für die Proliferation von T-Zellen, aber vermutlich auch für eine spezifische Änderung des Migrationsverhaltens ist.

Ein Zusammenhang zwischen der verringerten Migration spezifischer T-Zellen mit der Präsenz von Tumorzellen, die das entsprechende Antigen präsentieren, konnte von der Gruppe von S. Amigorena im Mausmodell gezeigt werden¹²⁶. Andererseits weisen Arbeiten der Gruppe von RN Germain in explantierten Lymphknoten auf eine zügige Migration weg vom antigenen Stimulus hin¹²⁷. Eine Kontakt mit dem Antigen im Lymphknoten führt also zu verstärkter Migration der T-Zelle einerseits, andererseits migrieren T-Zellen mit Antigen-Kontakt in der Tumorumgebung weniger stark. Diese Beobachtungen scheinen auf den ersten Blick widersprüchlich. Bedenkt man jedoch, dass im Lymphknoten meist das Priming naiver T-Zellen erfolgt, die dann möglichst zügig ins Gewebe wandern sollen um ihre Zielzelle zu finden, während patroulierende Memory-Zellen nach Aktivierung im Gewebe vor Ort ggf. noch weitere Zielzellen antreffen könnten, ist der Unterschied im Migrationsverhalten durchaus sinnvoll. Der Mechanismus der Steuerung des Migrationsverhaltens ist allerdings noch nicht geklärt. Werden T-Zellen im Tumor anders aktiviert oder sorgen weitere Faktoren, wie beispielsweise ein bestimmtes Zytokinmilieu, für eine veränderte Migration?

Für die Interpretation der Ergebnisse dieser Arbeit ist es wichtig zu wissen, dass CD25 nur nach antigenspezifischer Stimulation über den TCR exprimiert wird, wohingegen die Expression von CD69 eher durch Zytokine in einem inflammatorischen Milieu induziert wird. Wie in Abb 11 gezeigt bleibt die Expression von CD25 über einige Tage nach Aktivierung stabil.

Im Tumor exprimieren nur etwa 8 % der insgesamt vorkommenden CD8+T-Zellen CD25, sind also in einem antigenspezifisch aktivierten Zustand, z.B. weil sie ihr Antigen auf einer Tumorzelle erkannt haben, also tumorspezifisch sind. Das mittels pHLA-Multimer ermittelte Verhältniss von tumor- zu virusspezifischen T-Zellen lag im Tumor bei etwa 1 zu 1. Von den so gemessenen tumorspezifischen T-Zellen waren nur etwa 15% auch CD25 positiv. Die virusspezifischen T-Zellen im Tumor zeigen wie erwartet keine Expression von CD25. Im Tumor ist also nur ein relativ kleiner Teil der tumorspezifischen T-Zellen, und auch der T-Zellen insgesamt, in einem antigenspezifisch aktivierten Zustand mit Expression von CD25. Die tumorspezifischen T-Zellen sind also entweder nicht mehr in der Lage CD25 zu mobilisieren, was auf eine Anergie dieser Zellen hindeutet (siehe nächster Abschnitt), oder das entsprechende Epitop wird vom Tumor nicht (mehr) präsentiert und die T-Zellen somit auch nicht mehr aktiviert.

Wie bereits diskutiert findet eine Infiltration sowohl von virusspezifischen als auch von tumorspezifischen T-Zellen ins Tumorgewebe statt. Zumindest die Infiltration der virusspezifischen T-Zellen wird dabei von einer Antigen-unspezifischen Komponente bestimmt. Bei dieser Antigen-unabhängigen Komponente könnte es sich um ein generell eher inflammatorisches Milieu mit entsprechenden Chemokinen oder Zytokinen wie IL2 oder IFN α , die z.B. die Expression von CD69 induzieren können, handeln. Ein großer Teil der tumorinfiltrierenden T-Zellen exprimiert CD69 unabhängig von der Spezifität. Auch die infiltrierenden virusspezifischen T-Zellen exprimieren CD69 zu fast 60%, wohingegen im peripheren Blut nahezu keine CD69-Expression zu finden ist.

Die Hypothese, dass keine ausreichende Migration von tumorspezifischen T-Zellen in den Tumor erfolgt ist also für die hier analysierten Proben widerlegt. In vielen Patienten ist der Anteil der gemessenen potentiell funktionsfähigen tumorspezifischen T-Zellen, der ja wie beschrieben nur ein kleiner Ausschnitt aus dem gesamten tumorspezifischen Repertoire ist, zwar klein, aber vorhanden.

5.2. T-Zell Anergie

Wie im vorangegangenen Kapitel diskutiert, sind also die meisten Tumore von T-Zellen infiltriert, von denen auch ein Teil tumorspezifisch ist. Der Anteil der CD25-positiven TAA-spezifischen T-Zellen war allerdings nur gering und könnte in einer möglichen Anergie der T-Zellen begründet sein.

Diese Art der Dysfunktionalität von CTL wurde bereits von T. Whiteside beschrieben⁶⁷. Der von ihr beschriebene antigenunabhängig wirkende Mechanismus der Anergieinduktion bei T-Zellen beruht auf der Degradierung der ζ -Kette des TCR. Dadurch können Signale der erfolgten TCR-Peptid-HLA-Interaktion nicht mehr weitergeleitet werden und die T-Zelle ist dadurch unfähig auf antigenspezifischen Stimuli zu reagieren. Untersuchungen anderer Gruppen zeigten, dass dieser Effekt durch reaktive Sauerstoffspezies (ROS - engl. reactive oxygen species), wie sie auch in der Tumormikroumgebung vermehrt durch tumorassoziierte Makrophagen und Monozyten gebildet werden, vermittelt wird^{128,129}. In den in dieser Arbeit untersuchten Proben zeigte sich bei einem Teil der tumorinfiltrierenden T-Zellen tatsächlich ein Verlust der TCR ζ -Kette. Das Ausmaß des Verlustes der ζ -Kette war allerdings sehr heterogen. Etwa 40% der analysierten Proben wiesen sogar eine vergleichbare Intensität der ζ -Kette auf, wie die T-Zellen aus dem Blut gesunder Spender.

In den Proben mit reduzierter Expression der ζ -Kette fiel auf, dass die Art der Reduktion bei CD4+ und CD8+ T-Zellen unterschiedlich war. Bei den CD4+ T-Zellen war meist nur ein Teil der

Zellen betroffen. In einigen Fällen konnte man im Histogramm zwei Peaks, also zwei Gruppen von CD4+ T-Zellen sehen. Solche mit normaler und solche mit deutlich reduzierter ζ -Kette.

Bei den CD8+ T-Zellen wurde jeweils ein "Shiften" des gesamten Peaks beobachtet. Bei CD8+ T-Zellen scheint also eher eine graduelle Verringerung der ζ -Kette in allen Zellen vorzuliegen, wohingegen es bei den CD4+ T-Zellen deutliche Unterschiede zwischen den einzelnen Zellen gibt. Diese Beobachtungen legen die Vermutung nahe, dass entweder verschiedene Mechanismen zum Verlust der TCR ζ -Kette führen können: Einerseits die schon beschriebene Wirkung von ROS auf alle T-Zellen, die sich in der Nähe befinden und andererseits ein eher kontaktabhängiger Mechanismus der nur auf einzelne T-Zellen wirkt; oder dass verschiedene T-Zell-Subtypen unterschiedlich empfindlich auf ROS reagieren.

Die Antigenpezifität der CD4+ und CD8+ T-Zellen ohne TCR ζ -Kette und die Korrelation mit den anderen bisher untersuchten Mechanismen konnte in diesem Zusammenhang leider nicht untersucht werden.

Im Hinblick auf die anfangs aufgestellte Hypothese, dass die unzureichende Immunantwort beim Melanom des Menschen durch die Anergie der infiltrierenden tumorspezifischen T-Zellen verursacht wird, lässt sich feststellen:

Der Verlust der ζ -Kette könnte in einigen der tumorspezifischen T-Zellen zur Anergie führen, aber es handelt sich anscheinend nicht um einen allgemeinen in allen Patienten gleichermaßen auftretenden Mechanismus mit dem das Ausbleiben einer produktiven Anti-Tumor Immunantwort erklärt werden könnte, da in etwa 40% der analysierten Proben weitgehend normale Mengen der ζ -Kette detektiert wurden. Im Fall der CD8+ T-Zellen ist aufgrund des homogenen Vorhandenseins von normaler bis eher reduzierter ζ -Kette davon auszugehen, dass die Degradierung nicht nur tumorspezifische Zellen betrifft.

5.3. Differenzierungsstatus und Effektorfunktion tumorinfiltrierender T-Zellen

Eine weitere Hypothese zur ungenügenden Immunabwehr beim Melanom besagt, dass die infiltrierenden tumorspezifischen T-Zellen zwar nicht anerg sind, aber aufgrund ihrer terminalen Differenzierung keine ausreichenden Effektorfunktionen mehr ausüben können. Der Zustand der terminalen Differenzierung wird auch als "exhaustion" engl. Erschöpfung beschrieben. Eine Anhäufung terminal differenzierter tumorspezifischer T-Zellen im Tumor wäre entweder durch die gezielte Migration solcher Zellen in den Tumor oder aufgrund der andauernden Stimulation durch das persistierende Antigen, die Tumorzellen, im Tumor, zu erklären.

Als Marker für die Differenzierung der T-Zellen diene in den hier gezeigten Analysen eine Kombination von CD45RA und CD57. Naive T-Zellen werden als (CD45RA+ CD57-) charakterisiert, während die weiter differenzierten central und effektor memory T-Zellen (CD45RA- CD57-/+) sind. Terminal differenzierte Zellen schließlich behalten die CD57-Expression bei und regulieren CD45RA wieder herauf (CD45RA+ CD57+).

Schon beim Vergleich der verschiedenen Differenzierungsstadien in T-Zellen unabhängig von ihrer Spezifität wurden interessante Beobachtungen gemacht. So war die Verteilung der Zellen aus dem Blut von gesunden Spendern und Patienten relativ ähnlich. Mit einem überwiegenden Anteil von naiven Zellen und dem Rest hauptsächlich aus Central Memory Zellen. Unterschiede im Blut von Gesunden und Patienten bestanden allerdings darin, dass der Anteil von terminal differenzierten Effektor und Effektor-Memory T-Zellen etwas höher und der Anteil der naiven T-Zellen etwas geringer bei den Patienten war. Dies könnte am im Durchschnitt höheren Alter der Melanompatienten gegenüber den jüngeren gesunden Spendern und der damit zusammenhängenden häufigeren antigenen Stimulation (bezogen auf alle Antigene) liegen. Veränderungen in der T-Zell Zusammensetzung hin zu mehr Memory und terminal differenzierten Stadien mit zunehmendem Alter wurde schon beschrieben¹³⁰.

Bei den virusspezifischen T-Zellen im Blut von Gesunden und Melanompatienten zeigte sich eine nahezu identische Verteilung, was darauf schließen lässt, dass das Immunsystem der Patienten nur im Bezug auf die anti-Tumor Antwort verändert gegenüber dem von Gesunden ist, aber auf andere Antigene normal reagiert. Auch die Zusammensetzung der virusspezifischen T-Zellen im Tumor ist ähnlich, allerdings findet man einen erhöhten Anteil von Memory T-Zellen und kaum Zellen mit naivem Phänotyp. Es scheint also eine Eigenschaft von Memory-Zellen, nicht aber von naiven T-Zellen zu sein, ins Gewebe zu migrieren und so auch Tumore zu infiltrieren.

Tumorspezifische T-Zellen im Blut von Gesunden unterschieden sich kaum von den anderen Zellen unbekannter Spezifität. Nur der Anteil der terminal differenzierten Zellen war deutlich höher und entsprach in etwa dem der virusspezifischen T-Zellen im Blut. Die tumorspezifischen T-Zellen im Blut von Melanompatienten hingegen wiesen eine stark abweichende Verteilung auf. Der Anteil von terminal differenzierten und effektor memory T-Zellen war deutlich höher. Dies lässt darauf schließen, dass die tumorspezifischen Zellen in Gesunden zwar teilweise geprimed wurden, der Antigenkontakt ist aber eher selten erfolgt (frühes Memory-Stadium). Demgegenüber hatten die tumorspezifischen T-Zellen in Melanompatienten deutlich häufiger Antigenkontakt (mehr späte Memory-Stadien).

Interessant ist, dass die potentiell nur noch gering funktionellen terminalen Effektorzellen überwiegend im Blut der Patienten zu finden sind, aber kaum im Tumor. Dies könnte man damit erklären, dass solche terminal differenzierten Zellen aus dem Tumor ins Blut abwandern und/ oder nicht ins Gewebe migrieren können.

Festzustellen ist allerdings, dass die mangelnde Effektivität der tumorspezifischen tumorinfiltrierenden T-Zellen bei Melanompatienten nicht mit einer zu weit fortgeschrittenen Differenzierung und der damit einhergehenden zunehmenden Dysfunktionalität der T-Zellen erklärt werden kann, da der größte Teil der tumorspezifischen T-Zellen im Tumor eher einen noch nicht zu stark differenzierten Memory-Phänotyp aufweist. Die Zellen sind quasi in genau dem Zustand in dem sie sein sollen; noch nicht zu stark differenziert und damit theoretisch im Tumor noch voll funktionstüchtig. Allerdings scheinen sich die terminal differenzierten T-zellen im Blut der Patienten anzureichern, da der Anteil hier höher ist als in Gesunden. Zudem ist der Anteil der naiven T-Zellen in Patienten etwas reduziert. Dies könnte auf einen erhöhten Umsatz der tumorspezifischen T-Zellen in den Patienten hindeuten. Da es sich aber dabei um einen dynamischen Prozess handelt und die T-Zellen nicht "verbraucht" werden, läßt sich die ungenügende Immunabwehr gegen den Tumor so nicht begründen.

Die zu überprüfende Hypothese bezüglich der ungenügenden anti-Tumor-Antwort aufgrund einer terminalen Differenzierung der tumorinfiltrierenden tumorspezifischen T-Zellen kann aufgrund der hier gezeigten Daten als widerlegt angesehen werden.

5.4. Regulatorische T-Zellen (Treg)

Eine weitere in dieser Arbeit zu überprüfende Hypothese besagt, dass Tregs im Tumor die Immunantwort effektiv verhindern. Um dies zu überprüfen wurden zunächst die bekannten Voraussetzungen für das Vorhandensein von Tregs im Tumor untersucht. Zum einen können natürliche nTregs via CCL22 gezielt in den Tumor migrieren ¹¹⁹. Zum anderen kann durch das Enzym Indolamin-2,3-Dioxygenase (IDO) ein Mikromillieu entstehen, dass die Induktion von iTregs begünstigt. IDO katalysiert den Abbau von Tryptophan zu N-Formylkynurenin und kann so bei Überexpression zu einer Depletion des Tryptophans führen. Der Tryptophan-Mangel und Überschuß seiner Metaboliten führt zu verschiedenen immuntolerisierenden Effekten wie z.B. die vermehrte Induktion von Tregs durch APC ¹³¹⁻¹³³.

Mittels PCR konnte gezeigt werden, dass CCL22 in etwa der Hälfte und IDO im Großteil der analysierten Melanombiopsien exprimiert ist. IDO wurde auch von vielen der analysierten Melanom-Linien exprimiert. Die Voraussetzungen für das Vorkommen von Tregs in Melanommetastasen sind also gegeben.

Hinweise auf die mögliche Rolle von Tregs bei der Immunsuppression im Tumor geben auch klinische Studien, in denen verschiedene Strategien zur Depletion von Tregs in Tumorpatienten (Lymphom und Melanom) getestet werden^{134,135}. Der einzige derzeit von der FDA für die Verwendung im Menschen zugelassene Wirkstoff der spezifisch gegen Tregs wirken soll ist Denileukin-Diftitox (Ontak). Dabei handelt es sich um ein chimäres Fusionsprotein aus Interleukin2 und dem Diphtherietoxin. Der Wirkmechanismus wird folgendermaßen erklärt: Der IL2-Teil bindet an die hochaffine IL2-Rezeptor-Untereinheit CD25 die besonders stark auf Tregs exprimiert ist. Danach kommt es zur Internalisierung des Komplexes durch Endozytose, woraufhin im Endosom eine proteolytische Spaltung und Freisetzung des katalytisch aktiven A Fragmentes des Toxins erfolgt. Das Toxin katalysiert die ADP-Ribosylierung des Diphthamid im Elongationsfaktor-2 (EF2), der dadurch gehemmt wird. Als Folge dessen kommt die Proteinbiosynthese der Zelle zum Erliegen, was schließlich zum Tod der Zelle führt¹³⁶. Neben Ontak wird auch eine niedrig dosierte Therapie mit dem Chemotherapeutikum Cyclophosphamid zur Reduktion der Treg-Frequenz eingesetzt. Diese Therapie wirkt allerdings nicht spezifisch auf Tregs, sondern bewirkt einen Abfall aller Lymphozytenpopulationen, was auch das homeostatische Gleichgewicht deutlich verändert.

Beide Therapieansätze zur Reduktion von Tregs brachten bislang nicht die erhofften klinischen Erfolge beim Melanom. Es wurden nur einige wenige positiv verlaufene Fallstudien vorgestellt¹³⁷, das Gros der behandelten Patienten zeigte allerdings keinen Behandlungserfolg. Die Erklärung dafür könnte der viel diskutierte Umstand sein, dass die verwendeten Therapien die Treg-Frequenzen nur unzureichend, bzw. bei vielen Patienten auch gar nicht, gesenkt hätten¹³⁸. Eine andere Erklärung für das Nicht-Anschlagen der Treg-depletierenden Therapien ist, dass Tregs nur in einem kleinen Teil der Tumore eine entscheidende Rolle spielen, wie es auch die Daten der vorliegenden Arbeit nahelegen. In den bisher durchgeführten Studien erfolgte allerdings auch keine Auswahl der Patienten nach ggf. erhöhter Treg-Frequenz.

Im nächsten Schritt dieser Arbeit wurde der Anteil von Tregs in den Melanomen mittels einer Marker-Kombination von CD4, CD25, CD127, CTLA4 und FoxP3, wobei Tregs CD4+, CD25high, CD127low, CTLA4+ und FoxP3+ sind, bestimmt. Diese Marker-Kombination ermöglicht es jedoch nur, Zellen zu identifizieren, die Tregs sein könnten. Der Beleg, dass die so identifizierten Zellen tatsächlich immunsupprimierende Eigenschaften besitzen ist allerdings nur durch funktionelle Tests möglich. Für funktionelle Tests ist allerdings die Isolierung der möglichen Tregs in ausreichender Menge nötig und war aufgrund des nur begrenzt vorhandenen Materials in dieser Arbeit nicht nötig.

Die in dieser Arbeit untersuchten Tumore zeigten nur in einem Teil (unter 40%) deutlich erhöhte Zahlen von Tregs. Anders als von verschiedenen Gruppen gezeigt^{139,140} korrelierte der Anteil der Tregs im Tumor nicht mit dem Überleben des Patienten in den hier analysierten Proben. Die Korrelation der Frequenz infiltrierender Tregs mit der klinischen Prognose des Patienten ist allerdings auch umstritten.

Auch in den analysierten Lymphomen ergab sich ein eher uneinheitliches Bild. Ein sehr kleiner Anteil der analysierte Lymphomzellen (primär bei MF) wiesen zum Teil selbst einen Treg-Phänotyp auf, aber hauptsächlich war der Treg-Phänotyp unter den infiltrierenden "Nicht-Tumor" T-Zellen in MF-Läsionen zu finden. Die geringe Zahl der untersuchten Lymphom-Proben in Kombination mit deren Heterogenität läßt allerdings keine weiteren Schlüsse bzgl. der Bedeutung von Tregs für den Progress der Erkrankung zu. Es kann lediglich festgestellt werden, dass die hier analysierten Tumorzellen selbst größtenteils keinen klassischen Treg-Phänotyp aufweisen.

Die Hypothese der Ursächlichkeit von Tregs für die Immunsuppression in Tumoren kann in den in dieser Arbeit analysierten Proben insgesamt nicht bestätigt werden, da zum einen in einem großen Teil der Proben normale Treg-Frequenzen, im Vergleich zum Blut Gesunder, gefunden wurden und zum anderen das Vorhandensein und die Frequenz von Tregs nicht mit dem Verlauf der Erkrankung korreliert.

5.5. Coinhibition

Außer den Tregs können auch andere Zellen mittels Coinhibition die Terminierung von Immunantworten bewirken, so lautete eine weitere zu überprüfende Hypothese für diese Arbeit.

Die für diese Arbeit durchgeführten Analysen auf RNA und Proteinebene zeigen eine starke Expression verschiedener coinhibitorischer Liganden der B7-Familie auf unterschiedlichen zellulären Bestandteilen der Tumorproben.

Die am stärksten im Tumorgewebe vertretene Gruppe von APCs, Zellen mit monozytärem Phänotyp, exprimierten verstärkt B7-H1. Auch mittels PCR wurde eine deutliche Expression von B7-H1 in Tumorbiopsien gezeigt.

Für die Expression von B7-H1, konnte schon von anderen Gruppen eine deutliche Korrelation mit der klinischen Prognose der Patienten gezeigt werden^{95,141}. Die Korrelation der B7-H1-Expression mit dem Überleben der Patienten war für die in dieser Arbeit untersuchten Proben leider aufgrund der starken Heterogenität der Proben bei insgesamt zu geringer

Probenzahl nicht möglich. Ein therapeutischer Antikörper, welcher B7-H1 blockiert befinden sich zurzeit in klinischen Studien. Die Ergebnisse dieser Studien sind allerdings noch nicht publiziert.

Neben B7-H1 zeigte auch B7-H4 ein sehr klares Expressionsmuster, welches fast ausschließlich auf die Tumorzellen beschränkt war. Dies zeigte sich sowohl in der PCR als auch in den durchflußzytometrischen Untersuchungen. B7-H4 wird zwar nur von etwa der Hälfte der Tumorzelllinien exprimiert, ist dafür aber im Gegensatz zu den anderen coinhibitorischen Liganden auf die Tumorzellen beschränkt und wird kaum in gesundem Gewebe exprimiert. Lediglich in zwei PCR-Analysen von Proben aus Vorhaut konnte B7-H4 nachgewiesen werden. Genauere Spezifikationen dieser beiden Proben konnten leider nicht ermittelt werden, so wäre es möglich, dass es sich entweder, im Gegensatz zu den anderen Proben, um entzündetes oder sonstwie krankhaft verändertes Gewebe handelte oder um Haut sehr junger noch im Wachstum befindlicher Patienten (Babys) handelte. Da sowohl bei gewebverändernden Erkrankungen als auch im normalen Wachstum ähnliche Vorgänge wie in einem Tumor auftreten (Zellproliferation, Neoangiogenese etc.) könnte es sich bei der Expression von B7-H4 dennoch um eine eher tumorspezifische Form der Immunsuppression handeln. Dies wird auch dadurch belegt, dass in den Proben gesunder Haut von Erwachsenen (aus Brustreduktionen) keine Expression von B7-H4 gefunden wurde. Leider sind der entsprechende Rezeptor auf T-Zellen sowie der Wirkmechanismus noch nicht aufgeklärt.

Im Gegensatz zu B7-H1 und B7-H4 war das Expressionsmuster von B7-H3 und B7-DC nicht ganz so klar. B7H3 zeigte sich in den PCR-Analysen deutlich positiv auf den Melanomlinien, in Melanombiopsien und in gesundem Gewebe aber negativ in PBMCs. Die Färbungen auf Einzelzellebene waren eher schwach und zeigten neben einer eher schwachen und stark schwankenden Expression auf Tumorzellen eine deutlichere Expression auf den Monozyten im Tumor. B7-DC wurde mittels PCR in vielen der Proben nachgewiesen. Die Einzelzellanalysen zeigten eine überwiegende Expression auf dem NK-Zell oder Makrophagen Subset sowie in schwächerem Umfang auch auf den Monozyten und einzelnen Tumorzellen. Auf T-Zellen konnte keiner der coinhibitorischen Liganden nachgewiesen werden.

Im nächsten Schritt wurde die Expression der coinhibitorischen Rezeptoren PD1 und CTLA4 auf T-Zellen untersucht. Eine entsprechende Expression im Tumor wurde zwar schon von anderen Gruppen gezeigt, allerdings konnte bislang weder eine Korrelation mit der klinischen Prognose, noch ein Zusammenhang mit der Spezifität der jeweiligen T-Zelle gezeigt werden.

Für die Korrelation der Expression von PD1 und CTLA4 mit dem Überleben der Patienten wurden insgesamt 121 Tumorproben analysiert und die Ergebnisse einer Kaplan-Meier-

Analyse unterzogen (Abb. 20 und 21). Für die Expression von PD1 zeigte sich ein signifikanter Zusammenhang ($p=0,0145$) zwischen dem Anteil der PD1-exprimierenden CTL und dem Überleben der Patienten. Im Gegensatz dazu konnte für CTLA4 keine signifikante Korrelation mit der klinischen Prognose gezeigt werden. Besonders interessant ist, dass sich die Überlebenskurven bei PD1 schon sehr früh, nach einigen Monaten trennen, wohingegen sie bei CTLA4 in den ersten zwei Jahren nahezu deckungsgleich sind. PD1 scheint also für das Fortschreiten der Erkrankung und die damit verbundene Immunsuppression im Tumor eine deutlich größere Rolle zu spielen, als CTLA4. Die weiteren Analysen der Expression von PD1 und CTLA4 in tumorspezifischen und virusspezifischen T-Zellen im peripheren Blut und im Tumor stützen diese Vermutung.

Auch die Erfahrungen mit dem CTLA4-blockierenden Antikörper Ipilimumab in der Klinik untermauern die Beobachtungen. Die Wirkung von Ipilimumab zeigt sich, wenn überhaupt, dann erst sehr spät nach 9 bis 12 Monaten. Die in dieser Arbeit gezeigten Daten lassen hoffen, dass der derzeit noch in Entwicklung befindliche Antikörper gegen PD1 schnellere klinische Wirkung zeigt.

Bei den weiteren Analysen in dieser Arbeit zeigte sich, dass anscheinend vor allem die tumorspezifischen T-Zellen spezifisch PD1 exprimieren, dies aber nur im Umfeld des Tumors auftritt.

PD1 wurde nur auf T-Zellen in den Tumorproben nachgewiesen, auch die tumorspezifischen T-Zellen im Blut von Patienten waren negativ. Die Expression war allerdings nicht nur auf die tumorspezifischen T-Zellen im Tumor beschränkt, auch die virusspezifischen T-Zellen zeigten eine, allerdings signifikant ($p < 0,001$) geringere, PD1-Expression. Die Expression von PD1 ist also eher als Zeichen eines peripher lokal wirkenden Toleranzmechanismus zu sehen.

CTLA4 wurde ebenfalls primär von tumorspezifischen T-Zellen exprimiert. Im Gegensatz zu PD1 war die Expression jedoch nicht lokal auf die Mikroumgebung des Tumors beschränkt, sondern fand sich auch auf tumorspezifischen T-Zellen im Blut von Patienten und auch im Blut von gesunden Probanden. In Blut und Tumor von Patienten war der Anteil der CTLA4-exprimierenden Zellen an den tumorspezifischen sogar im Mittel gleich hoch. Im Blut von Gesunden fiel er allerdings deutlich geringer aus. Der durch CTLA4-Expression repräsentierte Toleranzmechanismus scheint also eher zentral im gesamten System zu wirken und ist daher auf T-Zellen sowohl im Gewebe als auch im Blut zu finden.

In Abb. 30 ist eine Hypothese zur Erklärung dieser Phänomene dargestellt. Dabei wird angenommen, dass die CTLA4-exprimierenden T-Zellen als autoreaktive T-Zelle in einem lymphoiden Organ identifiziert und toleriert wurden aber weiter durch den Körper

zirkulieren. Daher sind diese Zellen auch in Gesunden zu finden. Die PD1-exprimierenden Zellen finden sich jedoch fast ausschließlich in der Mikroumgebung des Tumors, da die PD1-Expression durch lokale Faktoren (wie z.B. die Expression der entsprechenden Liganden) erst induziert bzw. verstärkt und aufrechterhalten wird. Die deutliche Anreicherung dieser Zellen könnte durch eine induzierte verminderte Migration der PD1-exprimierenden Zellen erklärt werden.

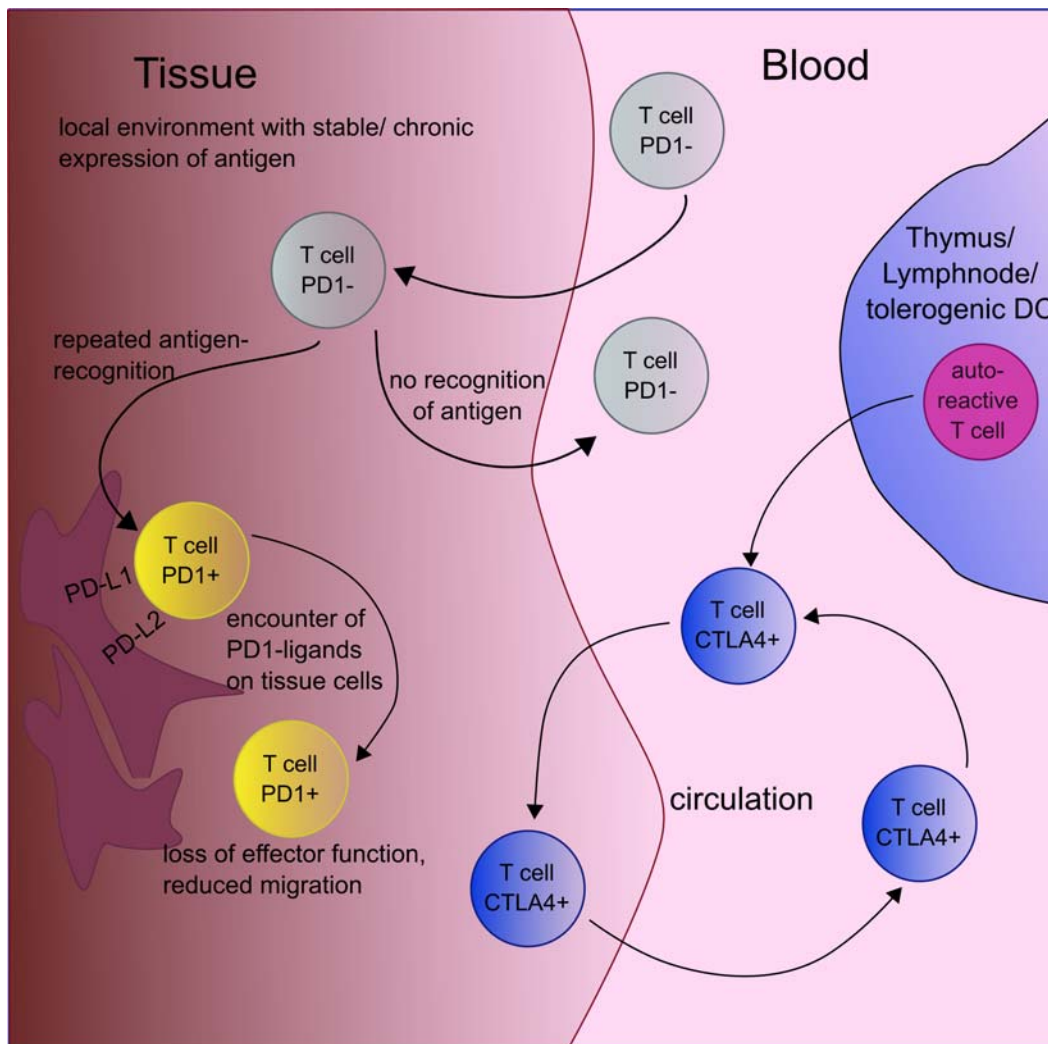


Abb. 29 Hypothetische Darstellung der Prozesse die zur Anreicherung von PD1+ T-Zellen im Tumorgewebe führen können, gegenüber der gleichmäßigen Verteilung von CTLA4+ T-Zellen in Blut und Gewebe.

Ähnlich wie bei der Analyse der regulatorischen T-Zellen wurde auch im Fall von PD1 und CTLA4 noch das Lymphom als weitere Tumorentität untersucht. Leider konnten die in den Melanomproben gemachten Beobachtungen in den Lymphom-Proben so nicht bestätigt werden. Zum einen war es nicht möglich gezielt die tumorspezifischen T-Zellen anzufärben,

da zu wenige T-Zell-Epitope des Lymphoms bekannt sind. Auch Daten bzgl. der klinischen Progression und zum Überleben der Patienten waren in den analysierten Lymphom-Proben kaum zugänglich, da das Lymphom bedeutend langsamer voranschreitet als das Melanom. Zum anderen wurde die Expression von PD1 und CTLA4 beim Lymphom hauptsächlich auf den Tumorzellen nachgewiesen. Dabei ergaben sich je nach Subtyp gewisse Unterschiede im Expressionsmuster. Die nicht klassifizierten CTCL exprimierten im Tumorgewebe primär CTLA4 (bis zu 70% der Zellen), wohingegen beim Sezary-Syndrom eher PD1 von den Tumorzellen exprimiert wurde, allerdings in nur etwa 10 bis max. 40% der Zellen. Bei MF fand sich sowohl PD1 als auch CTLA4 auf knapp maximal der Hälfte der Tumorzellen.

Ähnlich wie bei den Analysen im Blut von Melanompatienten und Gesunden zeigte sich im Blut der Lymphompatienten auf den "Nicht-Tumor-Zellen" keine erhöhte Expression von PD1 oder CTLA4. Festgestellt werden kann lediglich, dass das Bild der Expression von PD1 und CTLA4 beim Kutanen Lymphom wenig einheitlich ist, sich beide Rezeptoren aber eher auf einem Teil der Tumorzellen finden und weniger auf den normalen T-Zellen. Inwiefern diese Expression zur Immunsuppression im Lymphom beiträgt ist unklar, hierfür wären weitere Analysen der Wirkung dieser Rezeptoren auf die Tumorzellen und die Zellen der Mikroumgebung des Lymphoms nötig.

Die Immunsuppression durch coinhibitorische Ligand-Rezeptor-Interaktionen präsentiert sich aufgrund der vorliegenden Daten als ein möglicher Mechanismus der Immunsuppression im Melanom in vielen Patienten und die zuvor aufgestellte Hypothese muss nicht direkt verworfen werden. Allerdings zeigten die Analysen auch, dass dieser Mechanismus, wie die anderen bislang untersuchten Faktoren, nicht bei allen Patienten die tragende Rolle spielt. Auch konnte nur für die Expression von PD1 auf CD8+ T-Zellen eine signifikante Korrelation mit der klinischen Prognose gezeigt werden. Für CTLA4 war dieser Zusammenhang nicht signifikant. Die Korrelation ist zwar nur ein Hinweis und belegt nicht die Ursächlichkeit oder die direkte Einflußnahme von PD1. Es könnte sich also bei PD1 auch durchaus um einen Marker für einen immunsupprimierten Zustand, aber nicht unbedingt um den Auslöser dieses Zustandes handeln. Die Daten der ersten klinischen Studien mit blockierenden Antikörpern gegen PD1 könnten hier bald mehr Klarheit schaffen. Die klinischen Erfolge in Studien mit Ipilimumab, einem blockierenden Antikörper gegen CTLA4, deuten auf eine wichtige Rolle von CTLA4 zumindest in einem kleinen Kollektiv von Patienten hin.

5.6. Wirkung von Tumorzellen auf tumorinfiltrierende T-Zellen

Die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten in vitro Cokultur Experimente zeigen, dass die Immunsuppression von tumorspezifischen T-Zellen durch den wiederholten Kontakt mit Tumorzellen ausgelöst werden kann und nicht allein auf den schon analysierten immunsupprimierenden Mechanismen (TCR- ζ -Ketten Degradation, Coinhibition, Tregs etc.) beruhen kann.

Die beobachtete, durch dauernden Kontakt mit Tumorzellen ausgelöste Dysfunktionalität der T-Zellen spiegelt in vitro die Erfahrungen wieder, die beim adoptiven Transfer von in vitro kultivierten tumorspezifischen T-Zellen in Patienten gemacht wurden. Dazu wurden die Zellen aus dem Tumor des Patienten isoliert, in vitro expandiert und dann dem Patienten per adoptivem Transfer wieder infundiert. In einigen beschriebenen Fallstudien zeigte sich eine beeindruckende Wirkung. Sogar große Metastasen verschwanden innerhalb kürzester Zeit. Die Wirkung war aber selten von Dauer. Die transferierten CTL verschwanden zum größten Teil und der verbliebene Rest verlor seine funktionellen Eigenschaften¹⁴².

Hier könnte es sich um einen universellen Mechanismus zur Terminierung von Immunantworten handeln, eine Art negativen Feedback-Loop der überschießende Immunantworten bremst um stärkere Gewebeschädigungen zu verhindern.

Dafür spricht auch die in den Experimenten gemachte Beobachtung, dass die Immunantwort in Gegenwart von großen Mengen IL2, also einem inflammatorischen Milieu, etwas geringer supprimiert wird, als bei nur geringen IL2-Konzentrationen.

Der Versuch die induzierte Blockade durch direkte Aktivierung bestimmter Signaltransduktionskaskaden zu umgehen zeigte, dass sich die Blockade in unterhalb von PKC und Calcineurin befindlichen Signaltransduktionsebene befinden muss, da sie nicht durch PMA/Ionomycin umgangen werden konnte. Auch die Blockade von PD1 und seinen Liganden, sowie CTLA4 oder dem immunsuppressiven Zytokin IL10 konnte die Dysfunktionalität nicht verhindern.

Lediglich die Entfernung T-Zellen aus der Umgebung der Tumorzellen und die Kultivierung mit hohen Konzentrationen von IL2 konnten den dysfunktionalen Zustand partiell wieder revidieren. Dies spiegelt auch die Erfahrungen in der Kultivierung von tumorinfiltrierenden T-Zellen wieder. Diese beginnen meist überhaupt erst dann zu wachsen, wenn sie aus dem Tumor isoliert und einige Zeit mit IL2 kultiviert wurden.

Die letzte der in dieser Arbeit zu testenden Hypothesen der Immunsuppression im Tumor; dass T-Zellen durch den direkten Kontakt mit den Tumorzellen inhibiert werden, kann also in den

in vitro Cokultur-Ansätzen bestätigt werden. Zumindest für das getestete T-Zell-Tumorzell-Pärchen. Leider standen für diese Art der Cokultur nur Zellen eines Tumors zur Verfügung und es kann keine Aussage über die Verbreitung dieser Art der Immunsuppression bei den anderen Melanomproben gemacht werden.

5.7. Schlußfolgerungen und Ausblick

Die Grundhypothese, dass die Tumorzellen etwas tun, das dann eine effektive Anti-Tumor-Immunantwort von vornherein verhindert ist nicht haltbar.

Die in dieser Arbeit zu testenden Hypothesen, dass die Immunsuppression im Malignen Melanom des Menschen durch: (1) unzureichende Migration von tumorspezifische T-Zellen in den Tumor, (2) Anergie der Tumor infiltrierenden T-Zellen, (3) terminales und nicht mehr funktionelles Differenzierungsstadium der T-Zellen im Tumor, (4) Präsenz von regulatorischen T-Zellen im Tumor, (5) Coinhibition der T-Zell-Antworten im Tumor, (6) direkte Blockade der T-Zell-Antwort durch Kontakt mit den Tumorzellen, verhindert wird, konnten zu einem großen Teil widerlegt werden. Lediglich bei den letzten beiden Hypothesen konnten Hinweise für deren Glaubwürdigkeit gefunden werden.

Insgesamt scheint alles auf eine tumorspezifische Aktivierung der T-Zellen hinzudeuten:

- CD25-Expression und damit Aktivierung, Expansion, höhergradige Differenzierung tumorspezifischer Zellen und deren Anreicherung im Tumor.
- Die Expression der coinhibitorischer Rezeptoren, die zum Teil mit dem Überleben der Patienten korreliert, die aber, wie die Cokulturexperimente zeigen, nicht ursächlich mit dem anergen Phänotyp assoziiert ist, sondern auch nur Ausdruck einer Dysfunktionalität.

Die in dieser Arbeit gezeigten Analysen präsentieren ein scheinbar widersprüchliches Bild: vieles ist so, wie es als wünschenswert angenommen wird, aber der Tumor wächst.

Ausgedehnte immunregulatorische Netzwerke ermöglichen das Wachstum von Tumoren in der Gegenwart eines funktionierenden Immunsystems. Ein Großteil der bislang beschriebenen Faktoren dieser regulatorischen Netzwerke setzt sich aus Mechanismen zusammen, die der normalen Aufrechterhaltung der Toleranz gegen "Selbst" dienen, und ist nicht spezifisch für Tumore. Zur Aufrechterhaltung der Toleranz gegen "Selbst" und zum Schutz des Gewebes vor übermäßiger Schädigung¹⁴³ migrieren vor allem in chronischen inflammatorischen Situationen immunregulatorische Zellen ins Gewebe oder werden vor Ort induziert, um überschießende Immunantworten zu bremsen. In den Tumoren scheinen

Aktivierung, Effektorzell-Aktionen, Suppression und Selbstterminierung nebeneinander herzulaufen, jeweils mit unterschiedlichen Ausprägungen in den verschiedenen Patienten, wodurch sich für jeden Patienten ein sehr individuelles Bild ergibt.

Bei der therapeutischen Beeinflussung dieser Mechanismen ist also stets auch mit Autoimmun-Nebenwirkungen zu rechnen. Für die Bereitstellung möglichst maßgeschneiderter Kombinationstherapien, welche die Immunblockade im Tumor aushebeln aber die lebenswichtige Selbst-Toleranz möglichst wenig beeinträchtigen, ist ein Grundlegendes Verständnis der Vorgänge in Tumoren in Patienten nötig.

Immunsuppressive oder toleranzinduzierende Mechanismen sind der Hauptgrund des Scheiterns spezifischer Immuntherapien bei soliden Tumoren. Die verschiedenen, auch in der vorliegenden Arbeit untersuchten, Mechanismen präsentieren sich aber im Fall des MM nicht als einheitliches immunregulatorisches Konstrukt, sondern vielmehr als komplexes Netzwerk mit verschiedenen individuellen Ausprägungsformen. Diese Annahme wird neben den Daten aus der vorliegenden Arbeit auch durch die Erfahrungen aus vielen bisher durchgeführten immunmodulatorischen Studien gestützt. Bislang wurden klinische Studien zur Depletion von regulatorischen T-Zellen (Ontak, Cyclophosphamid), zur Blockierung von Coinhibitorischen Signalwegen über CTLA4 oder PD1 (Ipilimumab, PD1-Antikörper) und zur allgemeinen Anregung des Immunsystems (IL2, IFN α , TLR-Agonisten) durchgeführt. Die Studien wurden aber meist nur als Monotherapie oder in wenigen Fällen in Kombination mit einer Vakzination durchgeführt. Auch eine Selektion der Patienten im Hinblick auf die jeweilige individuelle Ausprägung des jeweils bekämpften immunsuppressiven Mechanismus erfolgte nicht. In allen Studien zeigte sich jeweils nur in einem kleinen Patientenkollektiv (5-20%) ein deutlich verlängertes Überleben bzw. in einzelnen Fällen sogar eine mögliche Heilung. Da die Therapien allerdings in der Masse der Patienten keine signifikante Wirkung hatten, ist die Verlängerung des Überlebens auf die Gesamtheit der Patienten bezogen nur relativ gering. Im Fall von Ipilimumab, dem derzeit am häufigsten in klinischen Studien eingesetzten Immunmodulator, verlängert sich das Überleben um durchschnittlich 4,1 Monate, dies aber auf Kosten zum Teil gravierender Nebenwirkungen (2,5% therapiebedingte Todesfälle) und massiver Kosten für die Krankenkassen (knapp 100.000 Euro pro Patient).

Das Ziel zukünftiger Studien und späterer Therapien muss es also sein, für jeden Immunmodulator im Vorfeld genau das Patientenkollektiv auszuwählen, das von der entsprechenden Therapie profitieren wird. Detaillierte Analysen der Komponenten des immunsuppressiven Netzwerkes in der Mikroumgebung des Tumors eines jeden Patienten, wie in dieser Arbeit durchgeführt, könnten in Zukunft wichtige Anhaltspunkte für die Wahl

der geeigneten Therapie liefern. Arbeiten zur Identifikation geeigneter Biomarker für die Therapieentscheidung werden zurzeit von einigen wissenschaftlichen Arbeitsgruppen aber auch vielen Pharmakonzernen betrieben, da eine verbesserte Diagnostik und Auswahl im Vorfeld zu deutlich höheren Ansprech-Raten und damit auch zur Rechtfertigung der hohen Therapiekosten führt. Bislang waren die Ergebnisse der Biomarkerforschung allerdings eher enttäuschend, da oft nach einem spezifischen Biomarker gesucht wurde. Die Ergebnisse dieser Arbeit legen nahe, dass es nicht auf einen prognostischen Biomarker ankommt, sondern nur die Kombination einer Reihe unterschiedlicher Marker aussagekräftig sein kann für Therapieentscheidungen.

Viele der aktuell laufenden aber auch in Planung befindlichen klinischen Studien sind außerdem weiterhin auf Monotherapien fokussiert, was aufgrund der Heterogenität und der Plastizität sowohl der Tumorzellen aber auch der immunregulatorischen Netzwerke die Gefahr von "Escape-Varianten" birgt.

Zukünftige Therapien, die nicht nur auf eine Verlängerung des Überlebens, sondern auch auf eine Heilung des Patienten abzielen, müssen aber auf vielen Säulen aufgebaut sein. Grundlage bildet jeweils die individuelle Diagnose und Analyse der immunsuppressiven Komponenten des Tumors des Patienten. Dementsprechend wird dann ausgewählt und beständig angepaßt werden müssen. Zu den möglichen zu kombinierenden Therapien zählen dann:

1. Bei hoher Tumorlast des Patienten zunächst Maßnahmen die Tumormasse zu reduzieren, entweder durch geeignete Chemotherapien oder operative Entfernung. Einerseits wird so evtl. Zeit für die Induktion einer effektiven Immunantwort gewonnen und andererseits die Masse sowohl der zu bekämpfenden Zielzellen als auch eventuell vorhandener weiterer immunsuppressiver Faktoren reduziert.
2. Bei übermäßiger Präsenz von Tregs entsprechende Maßnahmen um diese zu reduzieren oder deren Effekte zu blockieren (neben Ontak und Cyclophosphamid sind auch therapeutische Antikörper gegen IL10 und TGF β in der Entwicklung).
3. Bei starker Anergie der vorhandenen tumorspezifischen T-Zellen oder nur niedrigen Frequenzen kann durch Vakzinierung oder den adoptiven Transfer von in vitro generierten tumorspezifischen Zellen der Mangel an funktionellen T-Zellen ausgeglichen werden.
4. Blockade der im Tumor vorherrschenden Coinhibition durch blockierende Antikörper wie beispielsweise Ipilimumab, aber auch PD1 (in Entwicklung) sind ein erster Schritt. Allerdings fehlen hierzu aktuell noch geeignete Biomarker-Kombinationen um möglichst effektive

Therapieentscheidungen treffen zu können. Letztendlich werden feinere Möglichkeiten benötigt die Balance zwischen gewünschter Anti-Tumor-Immunantwort und gefährlichen Autoimmun-Nebenwirkungen zu halten.

Eine Kombination dieser verschiedenen Therapieformen setzt allerdings auch Analysen zur Kompatibilität der Therapien untereinander voraus. Diese Art der Analysen, sowie alles in diesem Zusammenhang ist bislang allerdings noch Gegenstand der Forschung. Bis zu einem wirklichen Durchbruch in der Therapie oder gar einer möglichen Heilbarkeit des Malignen Melanoms ist es also noch ein weiter Weg.

6. Zusammenfassung

Ziel der hier vorgelegten Arbeit war es, Phänotyp und Eigenschaften von tumorinfiltrierenden T-Zellen in Melanometastasen und Lymphomproben sowie aus dem peripheren Blut von Patienten und Gesunden zu analysieren und so verschiedene Hypothesen für die Gründe der unzureichenden Anti-Tumor-Immunantwort in Tumoren des Menschen zu überprüfen.

Getestet wurde, ob die unzureichende Migration von tumorspezifische T-Zellen in den Tumor (1), die Anergie der Tumor infiltrierenden T-Zellen (2), ein terminales und nicht mehr funktionelles Differenzierungsstadium der T-Zellen im Tumor (3), die Präsenz von regulatorischen T-Zellen im Tumor (4), Coinhibition der T-Zell-Antworten im Tumor (5) oder die direkte Blockade der T-Zell-Antwort durch Kontakt mit den Tumorzellen (6) verantwortlich sind.

In den untersuchten Tumorproben konnte ein großer Teil der Hypothesen widerlegt werden. Lediglich für die Relevanz der Coinhibition und die direkte Wirkung der Tumorzellen auf T-Zellen wurden Belege gefunden.

Ingesamt zeigte sich eine Infiltration und Anreicherung von tumorspezifischen T-Zellen im Tumor, die mit einer tumorspezifischen Aktivierung einher ging. Weiterhin ergaben sich Hinweise darauf, dass die teilweise mit dem Überleben der Patienten korrelierte Expression coinhibitorischer Rezeptoren nicht notwendiger Weise Ursache, sondern eher Ausdruck der Dysfunktionalität der T-Zellen ist.

7. Summary

The aim of this work was to test different hypotheses for the insufficient anti tumor immunity in human melanoma and lymphoma samples, by analyzing phenotype and properties of tumor-infiltrating T cells and T cell from peripheral blood of patients and healthy donors.

It was tested whether insufficient migration into the tumor (1), anergy of tumor-infiltrating T cells (2), terminal and nonfunctional differentiation state of T cells infiltrating the tumor (3), presence of regulatory T cells (4), expression of coinhibitory receptors (5) or direct blockade of T cell responses mediated by tumor cell contact were the cause for the dysfunctionality of T cells in the tumor.

In the Samples analyzed, most of the hypotheses were refuted. Only coinhibition and direct contact with the tumor cells seem to be of relevance for the local immune suppression in the tumormicroenvironment.

All in all an infiltration and enrichment of tumor-specific T cells in the tumor could be shown and was accompanied with tumor-specific activation. Furthermore, there was shown evidence that the expression of coinhibitory receptors, which partially correlated with patients survival, is rather a consequence and not the cause for the dysfunctionality of the T cells.

8. Anhang

8.1. Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AICD	engl. Activation induced cell death
APC	Allophycocyanin
APC	engl. antigen-presenting cell
BFA	Brefeldin A
bp	Basenpaare
BTLA	engl. B and T lymphocyte attenuator
CD	engl. cluster of differentiation
cDNA	engl. complementary deoxyribonucleic acid
CMV	engl. cytomegalo virus
CTCL	engl. cutaneous T cell lymphoma
CTL	engl. cytotoxic T lymphocyte
CTLA	engl. cytotoxic T lymphocyte antigen
DC	engl. dendritic cell
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	engl. deoxyribonucleic acid
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
EBV	Eppstein-Barr-Virus
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
FACS	engl. fluorescence activated cell sorter
FCS	engl. fetal calf serum
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
g	Erdbeschleunigung
HLA	Humanes Leukozyten Antigen
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
LyPap	Lymphomatoide Papulose
MHC	engl. Major histocompatibility complex
min	Minute
MF	Mycosis Fungoides
MM	Malignes Melanom

NK-Zelle	Natürliche Killer Zelle
PBMC	engl. peripheral blood mononuclear cells
PBS	engl. phosphate buffered saline
PCR	engl. polymerase chain reaction
PD1	Programmed Death1
PE	Phycoerythrin
PerCP	Peridinin-Chlorophyll-Protein
ROS	engl. reactive oxygen species
RT	Raumtemperatur
SS	Sezary Syndrom
TAA	tumorassoziiertes Antigen
Tab.	Tabelle
TCR	engl. T cell receptor
TGF	engl. transforming growth factor
Th	T Helferzelle
TNF	Tumor-Nekrose-Faktor
Treg	Regulatorische T-Zelle
U	engl. unit, Einheit für Enzymaktivität
WHO	World Health Organization

9. Literatur

1. Janeway C, Travers P, Walport M, Shlomchik M. Immunobiology. 6th ed. Garland Science; 2004:800.
2. Arstila TP. A Direct Estimate of the Human T Cell Receptor Diversity. *Science*. 1999;286(5441):958–961.
3. Mason D. A very high level of crossreactivity is an essential feature of the T-cell receptor. *Immunol. Today*. 1998.
4. Panayi GS. Auto-immune disease. *Rheumatol Rehabil*. 1976;15(1):1–9.
5. Derbinski J, Schulte A, Kyewski B, Klein L. Promiscuous gene expression in medullary thymic epithelial cells mirrors the peripheral self. *Nat Immunol*. 2001;2(11):1032–1039.
6. Surh CD, Sprent J. T-cell apoptosis detected in situ during positive and negative selection in the thymus. *Nature*. 1994;372(6501):100–103.
7. Fry A, Jones L, Kruisbeek A. Thymic requirement for clonal deletion during T cell development. *Science*. 1989.
8. Baniyash M. TCR ζ -chain downregulation: curtailing an excessive inflammatory immune response. *Nat Rev Immunol*. 2004;4(9):675–687.
9. DAUSSET J. [Presence of A & B antigens in leukocytes disclosed by agglutination tests]. *C. R. Seances Soc. Biol. Fil.* 1954;148(19-20):1607–1608.
10. Zinkernagel RM. Restriction by H-2 gene complex of transfer of cell-mediated immunity to *Listeria monocytogenes*. *Nature*. 1974;251(5472):230–233.
11. Zinkernagel RM, Doherty PC. MHC-restricted cytotoxic T cells: studies on the biological role of polymorphic major transplantation antigens determining T-cell restriction-specificity, function, and responsiveness. *Adv. Immunol*. 1979;27:51–177.
12. Castellino F, Germain RN. Extensive trafficking of MHC class II-invariant chain complexes in the endocytic pathway and appearance of peptide-loaded class II in multiple compartments. *Immunity*. 1995;2(1):73–88.
13. Mosmann TR, Cherwinski H, Bond MW, Giedlin MA, Coffman RL. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J. Immunol*. 1986;136(7):2348–2357.
14. Weaver CT, Harrington LE, Mangan PR, Gavrieli M, Murphy KM. Th17: An Effector CD4 T Cell Lineage with Regulatory T Cell Ties. *Immunity*. 2006;24(6):677–688.
15. Zielinski CE, Corti D, Mele F, et al. Dissecting the human immunologic memory for pathogens. *Immunol. Rev*. 2011;240(1):40–51.
16. Becker S. Effect of interferon-gamma on class-II antigen expression and accessory cell function. *Immunol Res*. 1985.
17. Henkart PA. Mechanism of lymphocyte-mediated cytotoxicity. *Annu. Rev. Immunol*. 1985;3:31–58.

18. Hishii M, Kurnick JT, Ramirez-Montagut T, Pandolfi F. Studies of the mechanism of cytolysis by tumour-infiltrating lymphocytes. *Clin. Exp. Immunol.* 1999;116(3):388–394.
19. Gershon RK, Kondo K. Cell interactions in the induction of tolerance: the role of thymic lymphocytes. *Immunology.* 1970;18(5):723–737.
20. Scotto L, Naiyer AJ, Galluzzo S, et al. Overlap between molecular markers expressed by naturally occurring CD4+CD25+ regulatory T cells and antigen specific CD4+CD25+ and CD8+CD28– T suppressor cells. *Human Immunology.* 2004;65(11):1297–1306.
21. Smith TRF, Kumar V. Revival of CD8+ Treg-mediated suppression. *Trends in Immunology.* 2008;29(7):337–342.
22. Sun D, Qin Y, Chluba J, Epplen JT, Wekerle H. Suppression of experimentally induced autoimmune encephalomyelitis by cytolytic T-T cell interactions. *Nature.* 1988;332(6167):843–845.
23. Endharti AT, Rifa'i M, Shi Z, et al. Cutting edge: CD8+CD122+ regulatory T cells produce IL-10 to suppress IFN-gamma production and proliferation of CD8+ T cells. *J. Immunol.* 2005;175(11):7093–7097.
24. Chang CC, Ciubotariu R, Manavalan JS, et al. Tolerization of dendritic cells by TS cells: the crucial role of inhibitory receptors ILT3 and ILT4. *Nat Immunol.* 2002;3(3):237–243.
25. Feau S, Arens R, Togher S, Schoenberger SP. Autocrine IL-2 is required for secondary population expansion of CD8+ memory T cells. *Nature Publishing Group.* 2011;12(9):908–913.
26. Edwards LJ, Evavold BD. T cell recognition of weak ligands: roles of signaling, receptor number, and affinity. *Immunol Res.* 2011;50(1):39–48.
27. Sallusto F, Lenig D, Förster R, Lipp M, Lanzavecchia A. Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions. *Nature.* 1999;401(6754):708–712.
28. Tarazona R, DelaRosa O, Alonso C, et al. Increased expression of NK cell markers on T lymphocytes in aging and chronic activation of the immune system reflects the accumulation of effector/senescent T cells. *Mech. Ageing Dev.* 2000;121(1-3):77–88.
29. Kern F, Khatamzas E, Surel I, et al. Distribution of human CMV-specific memory T cells among the CD8pos. subsets defined by CD57, CD27, and CD45 isoforms. *Eur. J. Immunol.* 1999;29(9):2908–2915.
30. Gilchrist BA, Eller MS, Geller AC, Yaar M. The pathogenesis of melanoma induced by ultraviolet radiation. *N Engl J Med.* 1999;340(17):1341–1348.
31. Diepgen TL, Mahler V. The epidemiology of skin cancer. *Br J Dermatol.* 2002;146 Suppl 61:1–6.
32. Kleeberg UR. Etiology and risk factors of melanoma. *Ann Ital Chir.* 1989;60(4):231–236.
33. Blum A, Volkenandt M. [Skin cancer]. *Dtsch. Med. Wochenschr.* 2002;127(33):1679–1681.
34. Schultz ES, Schuler G. Malignes Melanom. *HNO.* 2005;53(11):928–939.
35. Jemal A, Devesa SS, Hartge P, Tucker MA. Recent trends in cutaneous melanoma incidence among whites in the United States. *J. Natl. Cancer Inst.* 2001;93(9):678–683.

36. Merkel S, Meyer T, Papadopoulos T, et al. Testing a new staging system for cutaneous melanoma proposed by the American Joint Committee on Cancer. *European Journal of Cancer*. 2002;38(4):517–526.
37. Dickson PV, Gershenwald JE. Staging and prognosis of cutaneous melanoma. *Surg. Oncol. Clin. N. Am.* 2011;20(1):1–17.
38. Garbe C, Eigentler TK, Keilholz U, Hauschild A, Kirkwood JM. Systematic review of medical treatment in melanoma: current status and future prospects. *The Oncologist*. 2011;16(1):5–24.
39. Atallah E, Flaherty L. Treatment of metastatic malignant melanoma. *Curr Treat Options Oncol*. 2005;6(3):185–193.
40. Chapman PB, Hauschild A, Robert C, et al. Improved Survival with Vemurafenib in Melanoma with BRAF V600E Mutation. *N Engl J Med*. 2011;364(26):2507–2516.
41. Klein O, Schmidt C, Knights A, et al. Melanoma vaccines: developments over the past 10 years. *Expert Rev Vaccines*. 2011;10(6):853–873.
42. Hodi FS, O'Day SJ, McDermott DF, et al. Improved Survival with Ipilimumab in Patients with Metastatic Melanoma. *N Engl J Med*. 2010;363(8):711–723.
43. Kalialis LV, Drzewiecki KT, Klyver H. Spontaneous regression of metastases from melanoma: review of the literature. *Melanoma Res*. 2009;19(5):275–282.
44. Komenaka I, Hoerig H, Kaufman HL. Immunotherapy for melanoma. *Clin. Dermatol*. 2004;22(3):251–265.
45. Guevara-Patiño JA, Turk MJ, Wolchok JD, Houghton AN. Immunity to cancer through immune recognition of altered self: studies with melanoma. *Adv. Cancer Res*. 2003;90:157–177.
46. Dictor M, Warenholt J, Isinger A. Resolving T-cell receptor clonality in two and genotype in four multiplex polymerase chain reactions. *Haematologica*. 2005;90(11):1524–1532.
47. Galper SL, Smith BD, Wilson LD. Diagnosis and management of mycosis fungoides. *Oncology (Williston Park, N.Y.)*. 2010;24(6):491–501.
48. Olsen EA, Rook AH, Zic J, et al. Sézary syndrome: immunopathogenesis, literature review of therapeutic options, and recommendations for therapy by the United States Cutaneous Lymphoma Consortium (USCLC). *Journal of the American Academy of Dermatology*. 2011;64(2):352–404.
49. Bergman R, Marcus-Farber B-S, Manov L, et al. Clinicopathologic reassessment of non-mycosis fungoides primary cutaneous lymphomas during 17 years. *Int. J. Dermatol*. 2002;41(11):735–743.
50. Wimmer CD, Rentsch M, Crispin A, et al. The janus face of immunosuppression - de novo malignancy after renal transplantation: the experience of the Transplantation Center Munich. *Kidney Int*. 2007;71(12):1271–1278.
51. Stewart T, Tsai SC, Grayson H, Henderson R, Opelz G. Incidence of de-novo breast cancer in women chronically immunosuppressed after organ transplantation. *Lancet*. 1995;346(8978):796–798.

52. Rama I, Grinyó JM. Malignancy after renal transplantation: the role of immunosuppression. *Nat Rev Nephrol.* 2010;6(9):511–519.
53. Ruter J, Barnett BG, Kryczek I, et al. Altering regulatory T cell function in cancer immunotherapy: a novel means to boost the efficacy of cancer vaccines. *Front. Biosci.* 2009;14:1761–1770.
54. Vetsika E-K, Konsolakis G, Aggouraki D, et al. Immunological responses in cancer patients after vaccination with the therapeutic telomerase-specific vaccine Vx-001. *Cancer Immunol Immunother.* 2011.
55. Matsuda K, Tsunoda T, Tanaka H, et al. Enhancement of cytotoxic T-lymphocyte responses in patients with gastrointestinal malignancies following vaccination with CEA peptide-pulsed dendritic cells. *Cancer Immunol Immunother.* 2004;53(7):609–616.
56. Karbach J, GNJATIC S, Pauligk C, et al. Tumor-reactive CD8+ T-cell clones in patients after NY-ESO-1 peptide vaccination. *Int. J. Cancer.* 2007;121(9):2042–2048.
57. Walker EB, Haley D, Miller W, et al. gp100(209-2M) peptide immunization of human lymphocyte antigen-A2+ stage I-III melanoma patients induces significant increase in antigen-specific effector and long-term memory CD8+ T cells. *Clin. Cancer Res.* 2004;10(2):668–680.
58. Appay V, Jandus C, Voelter V, et al. New generation vaccine induces effective melanoma-specific CD8+ T cells in the circulation but not in the tumor site. *J. Immunol.* 2006;177(3):1670–1678.
59. Gross S, Walden P. Immunosuppressive mechanisms in human tumors: why we still cannot cure cancer. *Immunology Letters.* 2008;116(1):7–14.
60. Jenkins MK, Pardoll DM, Mizuguchi J, Quill H, Schwartz RH. T-cell unresponsiveness in vivo and in vitro: fine specificity of induction and molecular characterization of the unresponsive state. *Immunol. Rev.* 1987;95:113–135.
61. Jenkins MK, Chen CA, Jung G, Mueller DL, Schwartz RH. Inhibition of antigen-specific proliferation of type 1 murine T cell clones after stimulation with immobilized anti-CD3 monoclonal antibody. *J. Immunol.* 1990;144(1):16–22.
62. Day CL, Kaufmann DE, Kiepiela P, et al. PD-1 expression on HIV-specific T cells is associated with T-cell exhaustion and disease progression. *Nature.* 2006;443(7109):350–354.
63. Kantzanou M, Lucas M, Barnes E, et al. Viral escape and T cell exhaustion in hepatitis C virus infection analysed using Class I peptide tetramers. *Immunology Letters.* 2003;85(2):165–171.
64. Reignat S, Webster GJM, Brown D, et al. Escaping high viral load exhaustion: CD8 cells with altered tetramer binding in chronic hepatitis B virus infection. *J. Exp. Med.* 2002;195(9):1089–1101.
65. Appleman LJ, Tzachanis D, Grader-Beck T, van Puijenbroek AA, Boussiotis VA. Helper T cell anergy: from biochemistry to cancer pathophysiology and therapeutics. *J Mol Med.* 2001;78(12):673–683.
66. Fields PE, Gajewski TF, Fitch FW. Blocked Ras activation in anergic CD4+ T cells. *Science.* 1996;271(5253):1276–1278.

67. Whiteside TL. Signaling defects in T lymphocytes of patients with malignancy. *Cancer Immunol Immunother.* 1999;48(7):346–352.
68. Matsuda M, Petersson M, Lenkei R, et al. Alterations in the signal-transducing molecules of T cells and NK cells in colorectal tumor-infiltrating, gut mucosal and peripheral lymphocytes: correlation with the stage of the disease. *Int. J. Cancer.* 1995;61(6):765–772.
69. Kono K, Salazar-Onfray F, Petersson M, et al. Hydrogen peroxide secreted by tumor-derived macrophages down-modulates signal-transducing zeta molecules and inhibits tumor-specific T cell-and natural killer cell-mediated cytotoxicity. *Eur. J. Immunol.* 1996;26(6):1308–1313.
70. Ohshima H, Tatemichi M, Sawa T. Chemical basis of inflammation-induced carcinogenesis. *Arch. Biochem. Biophys.* 2003;417(1):3–11.
71. Sakaguchi S. Regulatory T cells: key controllers of immunologic self-tolerance. *Cell.* 2000;101(5):455–458.
72. Hsieh C-S, Liang Y, Tyznik AJ, et al. Recognition of the peripheral self by naturally arising CD25+ CD4+ T cell receptors. *Immunity.* 2004;21(2):267–277.
73. Vence L, Palucka AK, Fay JW, et al. Circulating tumor antigen-specific regulatory T cells in patients with metastatic melanoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 2007;104(52):20884–20889.
74. Piersma SJ, Welters MJP, van der Burg SH. Tumor-specific regulatory T cells in cancer patients. *HIM.* 2008;69(4-5):241–249.
75. Curiel TJ, Coukos G, Zou L, et al. Specific recruitment of regulatory T cells in ovarian carcinoma fosters immune privilege and predicts reduced survival. *Nat Med.* 2004;10(9):942–949.
76. Fontenot JD, Gavin MA, Rudensky AY. Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. *Nat Immunol.* 2003;4(4):330–336.
77. Chen W. Conversion of Peripheral CD4+CD25- Naive T Cells to CD4+CD25+ Regulatory T Cells by TGF- Induction of Transcription Factor Foxp3. *Journal of Experimental Medicine.* 2003;198(12):1875–1886.
78. Bennett CL, Christie J, Ramsdell F, et al. The immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome (IPEX) is caused by mutations of FOXP3. *Nat Genet.* 2001;27(1):20–21.
79. Hartigan-O'Connor DJ, Poon C, Sinclair E, McCune JM. Human CD4+ regulatory T cells express lower levels of the IL-7 receptor alpha chain (CD127), allowing consistent identification and sorting of live cells. *Journal of Immunological Methods.* 2007;319(1-2):41–52.
80. Groux H, O'Garra A, Bigler M, et al. A CD4+ T-cell subset inhibits antigen-specific T-cell responses and prevents colitis. *Nature.* 1997;389(6652):737–742.
81. Roncarolo M-G, Gregori S, Battaglia M, et al. Interleukin-10-secreting type 1 regulatory T cells in rodents and humans. *Immunol. Rev.* 2006;212:28–50.
82. Collison LW, Workman CJ, Kuo TT, et al. The inhibitory cytokine IL-35 contributes to regulatory T-cell function. *Nature.* 2007;450(7169):566–569.

83. Thornton AM, Shevach EM. CD4+CD25+ immunoregulatory T cells suppress polyclonal T cell activation in vitro by inhibiting interleukin 2 production. *J. Exp. Med.* 1998;188(2):287–296.
84. Grossman WJ, Verbsky JW, Barchet W, et al. Human T Regulatory Cells Can Use the Perforin Pathway to Cause Autologous Target Cell Death. *Immunity.* 2004;21(4):589–601.
85. Grossman WJ. Differential expression of granzymes A and B in human cytotoxic lymphocyte subsets and T regulatory cells. *Blood.* 2004;104(9):2840–2848.
86. Sakaguchi S, Wing K, Onishi Y, Prieto-Martin P, Yamaguchi T. Regulatory T cells: how do they suppress immune responses? *International Immunology.* 2009;21(10):1105–1111.
87. Vignali DAA, Collison LW, Workman CJ. How regulatory T cells work. *Nat Rev Immunol.* 2008;8(7):523–532.
88. Inman BA, Frigola X, Dong H, Kwon ED. Costimulation, coinhibition and cancer. *Curr Cancer Drug Targets.* 2007;7(1):15–30.
89. Boni C, Fisicaro P, Valdatta C, et al. Characterization of Hepatitis B Virus (HBV)-Specific T-Cell Dysfunction in Chronic HBV Infection. *Journal of Virology.* 2007;81(8):4215–4225.
90. Trautmann L, Janbazian L, Chomont N, et al. Upregulation of PD-1 expression on HIV-specific CD8+ T cells leads to reversible immune dysfunction. *Nat Med.* 2006;12(10):1198–1202.
91. Urbani S, Amadei B, Tola D, et al. PD-1 Expression in Acute Hepatitis C Virus (HCV) Infection Is Associated with HCV-Specific CD8 Exhaustion. *Journal of Virology.* 2006;80(22):11398–11403.
92. Greenwald RJ, Freeman GJ, Sharpe AH. THE B7 FAMILY REVISITED. *Annu. Rev. Immunol.* 2005;23(1):515–548.
93. Carreno BM, Collins M. THE B7 FAMILY OF LIGANDS AND TLR RECEPTORS: New Pathways for Costimulation and Inhibition of Immune Responses. *Annu. Rev. Immunol.* 2002;20(1):29–53.
94. Hamanishi J, Mandai M, Iwasaki M, et al. Programmed cell death 1 ligand 1 and tumor-infiltrating CD8+ T lymphocytes are prognostic factors of human ovarian cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 2007;104(9):3360–3365.
95. Nakanishi J, Wada Y, Matsumoto K, et al. Overexpression of B7-H1 (PD-L1) significantly associates with tumor grade and postoperative prognosis in human urothelial cancers. *Cancer Immunol Immunother.* 2006;56(8):1173–1182.
96. WU C, ZHU Y, JIANG J, et al. Immunohistochemical localization of programmed death-1 ligand-1 (PD-L1) in gastric carcinoma and its clinical significance. *Acta Histochemica.* 2006;108(1):19–24.
97. Ghebeh H, Mohammed S, Al-Omair A, et al. The B7-H1 (PD-L1) T Lymphocyte–Inhibitory Molecule Is Expressed in Breast Cancer Patients with Infiltrating Ductal Carcinoma: Correlation with Important High-Risk Prognostic Factors. *NEO.* 2006;8(3):190–198.
98. Slavik JM, Hutchcroft JE, Bierer BE. CD28/CTLA-4 and CD80/CD86 families: signaling and function. *Immunol Res.* 1999;19(1):1–24.

99. Linsley PS, Greene JL, Brady W, et al. Human B7-1 (CD80) and B7-2 (CD86) bind with similar avidities but distinct kinetics to CD28 and CTLA-4 receptors. *Immunity*. 1994;1(9):793–801.
100. Alegre ML, Frauwirth KA, Thompson CB. T-cell regulation by CD28 and CTLA-4. *Nat Rev Immunol*. 2001;1(3):220–228.
101. Boucher N, Dufeu-Duchesne T, Vicaut E, et al. CD28 expression in T cell aging and human longevity. *Experimental Gerontology*. 1998;33(3):267–282.
102. Cesana GC. Characterization of CD4+CD25+ Regulatory T Cells in Patients Treated With High-Dose Interleukin-2 for Metastatic Melanoma or Renal Cell Carcinoma. *Journal of Clinical Oncology*. 2006;24(7):1169–1177.
103. Egen JG, Kuhns MS, Allison JP. CTLA-4: new insights into its biological function and use in tumor immunotherapy. *Nat Immunol*. 2002;3(7):611–618.
104. Bhatia S, Edidin M, Almo SC, Nathenson SG. B7-1 and B7-2: Similar costimulatory ligands with different biochemical, oligomeric and signaling properties. *Immunology Letters*. 2006;104(1-2):70–75.
105. Fallarino F, Grohmann U, Hwang KW, et al. Modulation of tryptophan catabolism by regulatory T cells. *Nat Immunol*. 2003;4(12):1206–1212.
106. Ledford H. Melanoma drug wins US approval. *Nature*. 2011;471(7340):561.
107. Watanabe N, Gavrieli M, Sedy JR, et al. BTLA is a lymphocyte inhibitory receptor with similarities to CTLA-4 and PD-1. *Nat Immunol*. 2003;4(7):670–679.
108. Tao R, Wang L, Han R, et al. Differential effects of B and T lymphocyte attenuator and programmed death-1 on acceptance of partially versus fully MHC-mismatched cardiac allografts. *J. Immunol*. 2005;175(9):5774–5782.
109. Wang X-F, Chen Y-J, Wang Q, et al. Distinct expression and inhibitory function of B and T lymphocyte attenuator on human T cells. *Tissue Antigens*. 2007;69(2):145–153.
110. Flies D, Liu D, Dong H, Sica G. B7-H3: a costimulatory molecule for T cell activation and IFN- γ production. *Nature*. 2001.
111. Miyatake T, Tringler B, Liu W, et al. B7-H4 (DD-O110) is overexpressed in high risk uterine endometrioid adenocarcinomas and inversely correlated with tumor T-cell infiltration. *Gynecologic Oncology*. 2007;106(1):119–127.
112. Sun Y, Wang Y, Zhao J, et al. B7-H3 and B7-H4 expression in non-small-cell lung cancer. *Lung Cancer*. 2006;53(2):143–151.
113. Altman JD, Moss PA, Goulder PJ, et al. Phenotypic analysis of antigen-specific T lymphocytes. *Science*. 1996;274(5284):94–96.
114. Picker LJ, Singh MK, Zdraveski Z, et al. Direct demonstration of cytokine synthesis heterogeneity among human memory/effector T cells by flow cytometry. *Blood*. 1995;86(4):1408–1419.
115. Betts MR, Brenchley JM, Price DA, et al. Sensitive and viable identification of antigen-specific CD8+ T cells by a flow cytometric assay for degranulation. *Journal of Immunological Methods*. 2003;281(1-2):65–78.

116. Bodey B, Bodey B, Siegel SE, Kaiser HE. Controversies on the prognostic significance of tumor infiltrating leukocytes in solid human tumors. *Anticancer Res.* 2000;20(3A):1759–1768.
117. Oble DA, Loewe R, Yu P, Mihm MC. Focus on TILs: prognostic significance of tumor infiltrating lymphocytes in human melanoma. *Cancer Immun.* 2009;9:3.
118. Merckenschlager M, Beverley PC. Evidence for differential expression of CD45 isoforms by precursors for memory-dependent and independent cytotoxic responses: human CD8 memory CTLp selectively express CD45RO (UCHL1). *International Immunology.* 1989;1(4):450–459.
119. Gobert M, Treilleux I, Bendriss-Vermare N, et al. Regulatory T cells recruited through CCL22/CCR4 are selectively activated in lymphoid infiltrates surrounding primary breast tumors and lead to an adverse clinical outcome. *Cancer Research.* 2009;69(5):2000–2009.
120. Heid JB, Schmidt A, Oberle N, et al. FOXP3+CD25- tumor cells with regulatory function in Sézary syndrome. *J. Invest. Dermatol.* 2009;129(12):2875–2885.
121. Hallermann C, Schulze H-J, Neumann C, Klemke C-D. The regulatory T-cell phenotype in progressive mycosis fungoides. *G Ital Dermatol Venereol.* 2008;143(1):15–19.
122. van de Ven R, van den Hout MFCM, Lindenberg JJ, et al. Characterization of four conventional dendritic cell subsets in human skin-draining lymph nodes in relation to T-cell activation. *Blood.* 2011;118(9):2502–2510.
123. Maker AV, Phan GQ, Attia P, et al. Tumor regression and autoimmunity in patients treated with cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 blockade and interleukin 2: a phase I/II study. *Ann Surg Oncol.* 2005;12(12):1005–1016.
124. Rosenberg SA, Yang JC, Sherry RM, et al. Durable complete responses in heavily pretreated patients with metastatic melanoma using T-cell transfer immunotherapy. *Clin. Cancer Res.* 2011;17(13):4550–4557.
125. Salcedo M, Bercovici N, Taylor R, et al. Vaccination of melanoma patients using dendritic cells loaded with an allogeneic tumor cell lysate. *Cancer Immunol Immunother.* 2006;55(7):819–829.
126. Boissonnas A, Fetler L, Zeelenberg IS, Hugues S, Amigorena S. In vivo imaging of cytotoxic T cell infiltration and elimination of a solid tumor. *J. Exp. Med.* 2007;204(2):345–356.
127. Stoll S, Delon J, Brotz TM, Germain RN. Dynamic imaging of T cell-dendritic cell interactions in lymph nodes. *Science.* 2002;296(5574):1873–1876.
128. Otsuji M, Kimura Y, Aoe T, Okamoto Y, Saito T. Oxidative stress by tumor-derived macrophages suppresses the expression of CD3 zeta chain of T-cell receptor complex and antigen-specific T-cell responses. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1996;93(23):13119–13124.
129. Cemerski S, Cantagrel A, Van Meerwijk JPM, Romagnoli P. Reactive oxygen species differentially affect T cell receptor-signaling pathways. *J. Biol. Chem.* 2002;277(22):19585–19593.

130. Henson SM, Akbar AN. Memory T-cell homeostasis and senescence during aging. *Adv. Exp. Med. Biol.* 2010;684:189–197.
131. Mantovani A, Schioppa T, Porta C, Allavena P, Sica A. Role of tumor-associated macrophages in tumor progression and invasion. *Cancer Metastasis Rev.* 2006;25(3):315–322.
132. Singer K, Gottfried E, Kreutz M, Mackensen A. Suppression of T-cell responses by tumor metabolites. *Cancer Immunol Immunother.* 2011;60(3):425–431.
133. Chen W, Liang X, Peterson AJ, Munn DH, Blazar BR. The indoleamine 2,3-dioxygenase pathway is essential for human plasmacytoid dendritic cell-induced adaptive T regulatory cell generation. *The Journal of Immunology.* 2008;181(8):5396–5404.
134. Powell DJ, Felipe-Silva A, Merino MJ, et al. Administration of a CD25-directed immunotoxin, LMB-2, to patients with metastatic melanoma induces a selective partial reduction in regulatory T cells in vivo. *J. Immunol.* 2007;179(7):4919–4928.
135. Koenecke C, Ukena SN, Ganser A, Franzke A. Regulatory T cells as therapeutic target in Hodgkin's lymphoma. *Expert Opin. Ther. Targets.* 2008;12(6):769–782.
136. Litzinger MT, Fernando R, Curiel TJ, et al. IL-2 immunotoxin denileukin diftitox reduces regulatory T cells and enhances vaccine-mediated T-cell immunity. *Blood.* 2007;110(9):3192–3201.
137. Rasku MA, Clem AL, Telang S, et al. Transient T cell depletion causes regression of melanoma metastases. *J Transl Med.* 2008;6:12.
138. de Vries IJM, Castelli C, Huygens C, et al. Frequency of circulating Tregs with demethylated FOXP3 intron 1 in melanoma patients receiving tumor vaccines and potentially Treg-depleting agents. *Clin. Cancer Res.* 2011;17(4):841–848.
139. Adotevi O, Pere H, Ravel P, et al. A decrease of regulatory T cells correlates with overall survival after sunitinib-based antiangiogenic therapy in metastatic renal cancer patients. *J. Immunother.* 2010;33(9):991–998.
140. Xu L, Xu W, Qiu S, Xiong S. Enrichment of CCR6+Foxp3+ regulatory T cells in the tumor mass correlates with impaired CD8+ T cell function and poor prognosis of breast cancer. *Clin. Immunol.* 2010;135(3):466–475.
141. Thompson RH, Gillett MD, Cheville JC, et al. Costimulatory B7-H1 in renal cell carcinoma patients: Indicator of tumor aggressiveness and potential therapeutic target. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2004;101(49):17174–17179.
142. Gattinoni L, Powell DJ, Rosenberg SA, Restifo NP. Adoptive immunotherapy for cancer: building on success. *Nat Rev Immunol.* 2006;6(5):383–393.
143. Matzinger P, Kamala T. Tissue-based class control: the other side of tolerance. *Nat Rev Immunol.* 2011;11(3):221–230.

10. Eigene Publikationen

Gross S, Walden P. Immunosuppressive mechanisms in human tumors: why we still cannot cure cancer. *Immunology Letters*. 2008;116(1):7–14.

Gross S, Geldmacher A, Sharav T, Losch FO, Walden P. Immunosuppressive mechanisms in cancer: Consequences for the development of therapeutic vaccines. *Vaccine*. 2009;27:3398–400

11. Curriculum Vitae

Der Lebenslauf ist in der Online-Version aus Gründen des Datenschutzes nicht enthalten.