

TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

III. Medizinische Klinik und Poliklinik, Klinikum rechts der Isar

Klinische Relevanz des PD-1 Rezeptors beim malignen Melanom

Kathrin Julia Falchner

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der Technischen Universität
München zur Erlangung des akademischen Grades eines Doktors der Medizin
genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. E. J. Rummeny

Prüfer der Dissertation:

1. apl. Prof. Dr. H. Bernhard
2. Univ.-Prof. Dr. M. Ollert

Die Dissertation wurde am 11.08.2011 bei der Technischen Universität München
eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 14.12.2011 angenommen.

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Immunsystem der Haut.....	1
1.1.1 Aktivierung zytotoxischer T-Zellen	1
1.1.2 Differenzierung zytotoxischer T-Zellen	2
1.2 Immuntherapie des malignen Melanom	3
1.3 Immunescape-Mechanismen beim malignen Melanom	5
1.3.1 Programmed-death-factor 1 (PD-1) und seine Liganden	6
1.4 Zielsetzung	9
2. Ergebnisse	11
2.1 Charakterisierung der Melan-A spezifischen CD8 ⁺ T-Zellen in Abhängigkeit vom Tumorstadium.....	11
2.1.1 Die Frequenz der Melan-A spezifischen CD8 ⁺ T-Zellen steigt signifikant mit dem Tumorstadium.....	11
2.1.2 Die Frequenz der Melan-A spezifischen naiven CD8 ⁺ T-Zellen ist im Tumorstadium 2 statistisch signifikant erniedrigt	13
2.1.3 Die Frequenz der Melan-A spezifischen Zentral-Gedächtnis CD8 ⁺ T-Zellen ist im Tumorstadium 2 statistisch signifikant erhöht	14
2.1.4 Die Frequenz der Melan-A spezifischen Effektor-Gedächtnis CD8 ⁺ T-Zellen ist im Tumorstadium 1 statistisch signifikant erniedrigt	15
2.1.5 Die Frequenz der Melan-A spezifischen Effektor-Gedächtnis-RA ⁺ CD8 ⁺ T-Zellen zeigt keine statistisch signifikante Korrelation mit dem Tumorstadium.....	16
2.2 Charakterisierung der PD-1 ⁺ Melan-A spezifischen CD8 ⁺ T-Zellen in Abhängigkeit vom Tumorstadium.....	18
2.2.1 Die Frequenz der PD-1 ⁺ Melan-A spezifischen CD8 ⁺ T-Zellen ist in den Tumorstadien 3 und 4 statistisch signifikant erhöht.....	18
2.3 Gegenüberstellung der Analyseergebnisse der PD-1 ⁺ CD8 ⁺ T-Zellen und der PD-1 ⁺ Melan-A spezifischen CD8 ⁺ T-Zellen.....	19

2.3.1 Der prozentuale Anteil der PD-1 ⁺ T-Zellen ist in der Population der Melan-A spezifischen CD8 ⁺ T-Zellen im Vergleich zu der Population der CD8 ⁺ T-Zellen in den Tumorstadien 1, 3 und 4 statistisch signifikant erhöht	20
2.3.2 Der prozentuale Anteil der PD-1 ⁺ T-Zellen ist in der Population der naiven CD8 ⁺ T-Zellen im Vergleich zu der Population der Melan-A spezifischen naiven CD8 ⁺ T-Zellen in den Tumorstadien 1 und 4 statistisch signifikant erniedrigt.....	21
2.3.3 In der Gegenüberstellung der PD-1 ⁺ Zentral-Gedächtnis CD8 ⁺ T-Zellen und der PD-1 ⁺ Melan-A spezifischen Zentral-Gedächtnis CD8 ⁺ T-Zellen zeigten sich keine statistisch signifikanten Unterschiede in den Tumorstadien 1 bis 4.....	23
2.3.4 In der Gegenüberstellung der PD-1 ⁺ Effektor-Gedächtnis CD8 ⁺ T-Zellen und der PD-1 ⁺ Melan-A spezifischen Effektor-Gedächtnis CD8 ⁺ T-Zellen zeigten sich keine statistisch signifikanten Unterschiede in den Tumorstadien 1 bis 4.....	24
2.3.5 In der Gegenüberstellung der PD-1 ⁺ Effektor-Gedächtnis-RA ⁺ CD8 ⁺ T-Zellen und der PD-1 ⁺ Melan-A spezifischen Effektor-Gedächtnis-RA ⁺ CD8 ⁺ T-Zellen zeigten sich keine statistisch signifikanten Unterschiede in den Tumorstadien 1 bis 4	26
3. Diskussion	28
3.1 Analyse der peripheren Melan-A spezifischen CD8 ⁺ T-Zellen von Melanompatienten in Abhängigkeit vom Tumorstadium.....	28
3.2 Phänotypische Charakterisierung der Melan-A spezifischen CD8 ⁺ T-Zellen in Abhängigkeit vom Tumorstadium.....	29
3.3 Charakterisierung der peripheren PD-1 ⁺ Melan-A spezifischen CD8 ⁺ T-Zellen von Melanompatienten in Abhängigkeit vom Tumorstadium.....	32
4. Zusammenfassung	34
5. Material und Methoden.....	36
5.1. Patientenkollektiv	36
5.2 Material.....	38
5.2.1 Chemikalien und biogene Substanzen.....	38
5.2.2 Standardlösungen und -puffer	39

5.2.3 Antikörper.....	39
5.2.4 Standardgeräte	39
5.3 Methoden	40
5.3.1 Isolierung von mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMCs).....	40
5.3.1.1 Bestimmung der Zellzahl	40
5.3.1.2 Einfrieren und Auftauen von Zellen.....	41
5.3.2 Durchflusszytometrische Zellanalysen („FACS-Analysen“).....	41
5.3.2.1 Durchflusszytometrischer Nachweis von Oberflächenmolekülen und MHC: Peptid-Multimerkomplexen.....	42
5.3.2.2 Untersuchungsablauf und Kontrollen.....	43
5.3.2.2.1 Einzelfärbungen und Kompensation	44
5.3.2.2.2 FMO-Kontrollen.....	44
5.3.2.2.4 Kontrolle Melan-A Tetramer.....	45
5.3.3 Auswertung der durchflusszytometrischen Daten.....	45
5.3.4 Statistische Analyse.....	48
Literaturverzeichnis.....	49
Abkürzungsverzeichnis.....	58
Danksagung.....	60
Publikationen.....	61

1. Einleitung

1.1 Immunsystem der Haut

Die Schutzmechanismen des Immunsystems lassen sich grundsätzlich in eine angeborene und eine adaptive Immunität unterteilen. Das angeborene Immunsystem gewährleistet eine erste schnelle, jedoch wenig spezifische Abwehrreaktion auf verschiedenste Krankheitserreger. Im Bereich der Haut beinhaltet dieses neben dem Stratum corneum als rein physikalische Barriere auch zelluläre (dendritische Zellen, Monozyten, Makrophagen, Granulozyten und natürliche Killerzellen) und azelluläre (Komplementsystem) Elemente. Das adaptive Immunsystem hingegen zeichnet sich durch eine hohe Spezifität sowie die Ausbildung eines antigenspezifischen Gedächtnisses aus, ist in seiner Initiierung jedoch von dem angeborenen Immunsystem abhängig. Diese erworbene Immunität lässt sich in eine humorale und zelluläre Komponente unterteilen. Die humorale Immunantwort wird durch von B-Lymphozyten sezernierte lösliche Antikörper gegen membranständige Antigene repräsentiert. Der zelluläre Anteil umfasst verschiedene Untergruppen zytotoxischer T-Lymphozyten (CD8 positiv), welche über ihre spezifischen T-Zell-Rezeptoren von antigenpräsentierenden Zellen prozessierte Antigene erkennen und virusinfizierte Zellen oder Tumorzellen durch die Ausschüttung verschiedener Enzyme wie z.B. Perforin lysieren.¹⁵

1.1.1 Aktivierung zytotoxischer T-Zellen

Bei der Aktivierung von CD8⁺ zytotoxischen T-Zellen kommt den dendritischen Zellen eine Schlüsselrolle zu. Die zunächst unreifen dendritischen Zellen nehmen Antigene, wie z.B. Tumorantigene auf, prozessieren diese und präsentieren sie an MHC-Moleküle gebunden auf ihrer Oberfläche. Darüberhinaus kommt es zur Expression charakteristischer kostimulatorischer Oberflächenmoleküle (z.B. CD80, CD86), welche bei der Initiierung einer T-Zell vermittelten Immunantwort entscheidend sind. Die reifen antigenpräsentierenden Zellen wandern in sekundär lymphatische Organe ein und aktivieren dort naive CD8⁺ T-Zellen über die Bindung ihres MHC-Klasse-I-Peptid-Komplexes an die spezifischen T-Zell-Rezeptoren der zytotoxischen T-Zellen.⁹ Die

Bedeutung der dendritischen Zellen in der Immunabwehr gegen Tumorzellen des malignen Melanoms wurde in Studien bereits belegt. So konnte bei einigen Melanompatienten nach Vakzinierung mit tumorantigenspezifischen reifen dendritischen Zellen das Auftreten tumorspezifischer zytotoxischer T-Zellen nachgewiesen werden. Darüberhinaus zeigte sich eine deutliche Korrelation zwischen dem Nachweis dieser zytotoxischen T-Zellen und dem progressionsfreien Überleben der vakzinierten Melanompatienten.¹

1.1.2 Differenzierung zytotoxischer T-Zellen

Im Rahmen der Aktivierung der naiven CD8⁺ zytotoxischen T-Zellen durch reife dendritische Zellen kommt es zu einer Proliferation und Differenzierung in Effektor- und Gedächtniszellen. Die verschiedenen T-Zell-Subpopulationen lassen sich durch die unterschiedliche Expression der Oberflächenmoleküle CD45RA und CCR7 charakterisieren. Die naiven CD8⁺ T-Lymphozyten exprimieren auf ihrer Zelloberfläche sowohl CD45RA als auch CCR7. Der Chemokinrezeptor CCR7 ermöglicht den naiven zytotoxischen T-Zellen die Einwanderung in die T-Zell-Regionen der sekundär lymphatischen Organe, um dort mit antigenpräsentierenden Zellen in Kontakt zu treten. Nach der Aktivierung erfolgt die Differenzierung der naiven zytotoxischen T-Lymphozyten in Zentral-Gedächtniszellen sowie Effektor-Gedächtniszellen. Die Effektor-Gedächtniszellen sind durch das Fehlen von CD45RA und CCR7 gekennzeichnet. Sie besitzen die Fähigkeit in infiziertes oder tumoröses Gewebe einzuwandern und dort durch die Produktion von IFN- γ und Ausschüttung von Perforin eine sehr rasche Abwehrreaktion zu initiieren. Auf einigen der CD8⁺ Effektor-Gedächtniszellen findet sich jedoch der Oberflächenrezeptor CD45RA. Diese CCR7⁻ CD45RA⁺ T-Zellen werden als Effektor-Gedächtnis-RA⁺ T-Zellen bezeichnet. Sie zeichnen sich durch die höchste Perforinproduktion aller T-Zell Subpopulationen aus. Den CCR7⁺ CD45RA⁻ Zentral-Gedächtniszellen fehlt die unmittelbare Effektorfunktion, jedoch haben sie durch die Expression des Chemokinrezeptors CCR7 die Möglichkeit, in die sekundär lymphatischen Organe einzuwandern. Dort gewährleisten sie eine schnelle Immunantwort bei erneuter Antigenpräsentation, da sie im Vergleich zu den naiven Zellen deutlich sensitiver gegenüber Antigenstimulation sind und weniger Kostimulation benötigen.^{57,59,60} Die Frage, in welchem Zusammenhang die

verschiedenen T-Zell Subpopulationen untereinander stehen, wird kontrovers diskutiert. Longitudinalstudien an Mäusen ergaben Hinweise auf ein lineares Entwicklungsmodell, in welchem sich aus der Grundform, den naiven T-Zellen, durch Aktivierung Effektor-Gedächtnis-T-Zellen bilden. Ein kleiner Anteil dieser Effektor-Gedächtnis-T-Zellen entwickelt sich dann in lang lebende Zentral-Gedächtnis-T-Zellen weiter. Ein alternatives Modell sieht die direkte Entwicklung von naiven Zellen in Zentral-Gedächtnis-T-Zellen vor. Sallusto et al. vermuteten eine Differenzierung der naiven T-Zellen in seine Subpopulationen in Abhängigkeit von der Dauer der Antigenstimulation sowie Typ und Menge an ausgeschütteten Zytokinen. Eine weitere Theorie schlägt eine Differenzierung der naiven T-Zellen über die Zwischenstufe der Zentral- und Effektor-Gedächtnis-T-Zellen zu völlig ausdifferenzierten Effektor-Gedächtnis-RA⁺-T-Zellen vor.^{57,59,60}

1.2 Immuntherapie des malignen Melanom

Die Identifizierung definierter Tumorantigene sowie der Nachweis tumorantigenspezifischer Antikörper und tumorassoziierter zytotoxischer T-Zellen im peripheren Blut von Melanompatienten haben zur Entwicklung neuer immuntherapeutischer Strategien geführt. Studien konnten einen positiven Einfluss von tumorantigenspezifischen CD8⁺ zytotoxischen T-Zellen und tumorinfiltrierenden CD8⁺ T-Zellen auf die Tumorprogression des malignen Melanoms nachweisen. Derzeit kommen zur Verstärkung der tumorantigenspezifischen T-Zell Antwort beim malignen Melanom drei Hauptansätze zur Anwendung. Einen ersten Ansatz stellt die unspezifische Stimulation einer Immunantwort gegen den Tumor über die Stimulation endogener Effektorzellen mittels Zytokinen dar. Hierbei kommen vor allem Therapieversuche mit Interleukin-2 (IL-2) und Interferon- α (IFN- α) zum Einsatz, welche bislang jedoch nur geringe Erfolge erzielten. Desweiteren wird durch die Gabe von Antikörpern gegen den inhibitorisch wirkenden Rezeptor CTLA-4 (Cytotoxic T Lymphocyte-associated antigen-4) versucht, eine tumorspezifische T-Zell Antwort zu generieren. Einen zweiten immuntherapeutischen Ansatz bietet die aktive Immunisierung mittels Tumorstimmung. Zum klinischen Einsatz kommen hierbei mono- oder polyvalente Impfstoffe auf Basis von Melanozytendifferenzierungsantigenen wie Melan-A/MART-1, gp100 und Tyrosinase. Dabei handelt es sich um von

Melanomzellen isolierte Tumorantigene, welche auch auf normalen melanozytären Zellen zu finden sind. Darüberhinaus gelten Cancer-Testis-Antigene wie z.B. MAGE-3 und NY-ESO als potenzielle Peptide. In vitro kultivierte und mit dem spezifischen Tumorantigen beladene dendritische Zellen stellen eine weitere Strategie der Vakzinierung dar. Einen dritten Ansatz stellt der adoptive T-Zell-Transfer dar. Hierbei werden periphere mononukleäre Zellen aus dem Blut von Melanompatienten isoliert, mit autologen tumorantigenpräsentierenden Zellen stimuliert und nach in vitro Selektion und Expansion tumorantigenspezifischer Klone dem Patienten transferiert.^{21,40} Verschiedene Untersuchungen konnten ex vivo die Präsenz von Melan-A spezifischen CD8⁺ T-Zellen im peripheren Blut von Melanompatienten sowie gesunden Personen nachweisen. Während diese antigenspezifischen zytotoxischen T-Zellen bei Gesunden meist einen naiven Phänotyp aufwiesen, zeigten die Zellen bei Melanompatienten zum Großteil einen Effektor-Phänotyp (CD45RA⁺ CCR7⁻) mit der Fähigkeit der Interferon- γ (IFN- γ) Produktion.^{51,70} Studien, in denen Patienten in fortgeschrittenen Melanomstadien mit adoptivem T-Zell-Transfer und Vakzinierung behandelt wurden, konnten einen deutlichen Frequenzanstieg der tumorantigenspezifischen zytotoxischen T-Zellen im peripheren Blut sowie eine Ansammlung dieser Zellen im Tumorgewebe selbst belegen. Desweiteren konnte ein Überleben dieser Zellen für mehrere Wochen gezeigt werden.^{43,50,54,55,76} In deutlicher Diskrepanz zu diesen Ergebnissen steht die geringe klinische Ansprechrate der Melanompatienten. Ursache hierfür scheinen multiple, die T-Zell Funktion inhibierende, negativ regulatorische Mechanismen in der Mikroumgebung des Tumors zu sein. So konnte bereits in mehreren Studien gezeigt werden, dass tumorantigenspezifische T-Zellen im Tumorgewebe einen aktivierten Effektor-Phänotyp (CD45RA⁻ CCR7⁻ oder CD45RA⁺ CCR7⁻) aufweisen. Diese tumorinfiltrierenden, antigenspezifischen T-Zellen zeigten jedoch in ex-vivo Analysen im Gegensatz zu den im peripheren Blut befindlichen antigenspezifischen T-Zellen keine Funktionalität. So fehlte den Melan-A spezifischen CD8⁺ Effektor-T-Zellen der untersuchten Lymphknoten und Fernmetastasen die Fähigkeit einer adäquaten Produktion von IFN- γ , Perforin und Granzym B.^{5,28,77} Einige wichtige auf die T-Zell Funktion negativ regulatorisch wirkende Mechanismen beim malignen Melanom wurden bereits identifiziert und sollen im Folgenden näher behandelt werden.

1.3 Immunescape-Mechanismen beim malignen Melanom

Bereits 1995 wurde von Denfeld et al. auf Melanomzellen eine verminderte Expression von B7-1 (CD 80) und B7-2 (CD 86), welche wichtige kostimulatorische Faktoren der T-Zell Aktivierung darstellen, nachgewiesen.¹⁷ Über die Bindung von B7-1 und B7-2 an den CD-28 Rezeptor der T-Zellen werden wichtige kostimulatorische Signale generiert, welche für eine optimale T-Zell Aktivierung von Bedeutung sind. So konnte gezeigt werden, dass eine Stimulation des T-Zell-Rezeptors ohne B7 Kostimulation (fehlende Bindung von B7 an den CD28 Rezeptor der T-Zellen) mit einer verminderten bzw. ausbleibenden T-Zell Antwort einhergeht.^{3,22} Diese Inaktivität seitens der T-Zellen bestätigte sich auch in einem Mausmodell mit B7-negativen Tumoren.¹⁴ Desweiteren konnte in einem anderen Mausmodell durch direkte Kostimulation der CD8⁺ T-Zellen mittels B7-transfizierter Melanomzellen eine Abstoßung des Tumors erzielt werden.⁶⁶ Einen weiteren wichtigen T-Zell Regulationsmechanismus stellen die CD25⁺ FoxP3⁺ CD4⁺ T-regs dar. Bei diesen regulatorischen T-Zellen handelt es sich um eine Subpopulation von T-Zellen mit verstärkter Expression des transkriptionalen Regulators FoxP3, welcher die Aktivierung von T-Zellen hemmt und unter anderem auch periphere autoreaktive T-Zellen kontrolliert.⁵⁸ Bei verschiedenen Tumoren wurde im fortgeschrittenen Stadium ein Anstieg an zirkulierenden CD25⁺ FoxP3⁺ CD4⁺ T-regs nachgewiesen.⁷⁵ Desweiteren konnte auch in Lymphknotenmetastasen von malignen Melanomen eine erhöhte Expression von regulatorischen T-Zellen gezeigt werden, welche *in vitro* die Proliferation und Zytokinproduktion von CD25⁻CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen inhibierten.⁷¹ In präklinischen Versuchen mit monoklonalen anti-CD-25 Antikörpern konnte zudem eine verbesserte Tumorkontrolle *in vivo* erzielt werden.³⁴ Als weiterer wichtiger negativ regulatorischer Faktor der T-Zell Funktion ist die metabolische Dysregulation im Tumorgewebe durch das Tryptophan katabolisierende Enzym Indolamin-2,3-Dioxygenase (IDO) zu nennen. Durch die lokale Limitierung von Tryptophan scheint IDO sowohl die Proliferation alloreaktiver T-Lymphozyten zu blockieren, als auch Immunantworten durch Beeinflussung der T-Zell Proliferation zu supprimieren. Die Expression von Indolamin-2,3-Dioxygenase konnte bei zahlreichen Tumoren nachgewiesen werden, so auch im Tumorgewebe von metastasierten malignen Melanomen.⁶⁹ Neben der direkten Expression auf Tumorzellen kann IDO auch auf Tumor infiltrierenden dendritischen Zellen und Endothelzellen exprimiert werden.⁴⁴ Das

Oberflächenmolekül CTLA-4 stellt einen weiteren inhibitorisch fungierenden Rezeptor der T-Zell Aktivierung dar. CTLA-4 wird auf aktivierten T-Zellen exprimiert und besitzt, homolog zu CD-28, die Fähigkeit zur Bindung von B7-1 und B7-2, jedoch mit einer vergleichsweise höheren Affinität. Auf diese Weise kann CTLA-4 Immunantworten blockieren und unerwünschte unspezifische Immunantworten gegen körpereigene Proteine verhindern. Studien mit Anti-CTLA-4 Antikörpern und Vakzinierung bei Patienten in fortgeschrittenen Melanomstadien konnten eine direkte Aktivierung zytotoxischer T-Zellen sowie eine begrenzte Tumorregression nachweisen.^{36,39,73}

1.3.1 Programmed-death-factor 1 (PD-1) und seine Liganden

Der Programmed-death-factor 1 (PD-1, CD279) und seine Liganden Programmed-death-ligand 1 und 2 (PD-L1, PD-L2) liefern inhibitorische Signale, welche die Balance zwischen T-Zell Aktivierung und T-Zell Toleranz regulieren. PD-1 ist ein 55-kDA transmembraner Rezeptor vom Typ 1 und Mitglied der Ig-Superfamilie. PD-1 wird auf aktivierten B- und T-Zellen, sowie Monozyten und dendritischen Zellen exprimiert. Die PD-1 Liganden Programmed-death-ligand 1 (PD-L1, B7-H1, CD274) und Programmed-death-ligand 2 (PD-L2, B7-DC, CD273) stellen ebenfalls Mitglieder der Ig-Superfamilie dar, zeigen jedoch deutliche Unterschiede in ihrem Expressionsspektrum. Während PD-L1 auf ruhenden und aktivierten B- und T-Zellen sowie myeloiden und dendritischen Zellen exprimiert wird, findet sich PD-L2 vorzugsweise auf Makrophagen und dendritischen Zellen. Darüberhinaus wird PD-L1 auf einer Vielfalt nicht hämatopoetischer Zelltypen exprimiert, unter anderem auf Gefäßendothelzellen, Epithelzellen, Muskelzellen, Hepatozyten sowie auf Inselzellen des Pankreas und auf Plazentazellen. Die Bindung des Rezeptors PD-1 an seine Liganden bewirkt neben einer verminderten T-Zell Proliferation auch eine Abnahme der Zytokin Produktion, darüberhinaus kann eine Apoptose der Lymphozyten induziert werden. Dies lässt eine regulatorische Fähigkeit von PD-L1 auf autoreaktive T- und B-Zellen und entzündliche Prozesse sowie eine steuernde Funktion des Liganden im Rahmen von Abwehrreaktionen vermuten.^{18,23,37,47,61} So konnten Studien eine Schlüsselrolle von PD-1 und seinen Liganden bei akuten und chronischen Infektionen nachweisen. Dem PD-1/PD-L Signalweg scheint hierbei die Aufgabe der Regulation der

Balance zwischen effektiver antimikrobieller Immunreaktion und Immunsystem vermittelter Gewebeerstörung zuzukommen. Es konnte gezeigt werden, dass mit Adenovirus infizierte PD-1^{-/-} Mäuse zwar rascher eine Elimination des Virus erreichen, jedoch im Vergleich zur Gruppe der Wildtyp Mäuse einen deutlichen hepatozellulären Schaden entwickeln.³² Darüberhinaus gibt es Hinweise, dass verschiedene chronische Infektionen verursachende Mikroorganismen den PD-1/PD-L Signalweg nutzen, um sich einer Reaktion des Immunsystems zu entziehen und eine persistierende Infektion etablieren zu können. So konnte bei Mäusen, welche mit dem lymphozytären Choriomeningitis Virus (LCMV) infiziert waren, eine deutlich verminderte Proliferationsfähigkeit und reduzierte Zytokinproduktion der CD8⁺ virusspezifischen T-Zellen nachgewiesen werden. Weitere Untersuchungen ergaben eine vergleichsweise hohe PD-1 Expression der dysfunktionellen T-Zellen. Eine Antikörper induzierte PD-L1 Blockade der chronisch infizierten Mäuse führte zu einer Wiederherstellung der Funktionalität der zuvor dysfunktionellen virusspezifischen CD8⁺ T-Zellen, gekennzeichnet durch eine erhöhte IFN- γ und TNF- α Produktion sowie eine reduzierte Viruslast der Tiere im Vergleich zur unbehandelten Vergleichsgruppe.³² Eine funktionelle Dysregulation virusspezifischer CD8⁺ T-Zellen *in vivo* sowie eine Wiederherstellung der Funktionsfähigkeit dieser Zellen durch Blockierung des PD-1/PD-L1 Signalwegs *in vitro* konnte auch bei chronischen HIV, HBV und HCV Infektionen gezeigt werden.^{12,67,68} Neben der Bedeutung im Rahmen von Infektionen scheint die PD-1/PD-L1 Interaktion eine ausschlaggebende Rolle in der Regulation von peripherer T-Zell Toleranz und Autoimmunität zu spielen. Verschiedene Studienergebnisse weisen daraufhin, dass die Bindung von auf Gewebezellen exprimiertem PD-L1 an den Rezeptor PD-1 das Gewebe vor autoimmunen Angriffen schützen kann. So entwickelten PD-1^{-/-} Mäuse eine autoimmun induzierte dilatative Kardiomyopathie.⁴⁵ In einem anderen Modell führte ein PD-1 bzw. PD-L1 Defizit der Mäuse bei nachgewiesener hoher Expressionsrate von PD-L1 auf den Pankreasinseln zum akuten Auftreten eines autoimmun induzierten Diabetes mit vermehrter Infiltration mit IFN- γ produzierenden CD8⁺ T-Zellen.⁷² Über die Interaktion zwischen PD-1 und auf der Plazenta exprimierten PD-Liganden soll durch eine Unterdrückung des mütterlichen Immunsystems eine feto-maternale Toleranz erreicht werden.²⁶ Desweiteren konnte in Transplantationsmodellen mit Mäusen auch eine regulatorische Funktion des PD-1/PD-L Signalwegs bei Abstoßungsreaktionen

allogener Transplantate belegt werden. So konnte eine Hochregulation von PD-L1 auf transplantiertem Gewebe nach allogener Herztransplantation nachgewiesen werden. Unter Anwendung von PD-L1 blockierenden Antikörpern zeigte sich eine beschleunigte Abstoßungsreaktion des transplantierten Gewebes.^{30,49} Die T-Zellfunktion inhibierende Wirkung des PD-1/PD-L Signalwegs spielt darüberhinaus eine Schlüsselrolle in der Tumormunität. Die Expression von PD-L1 konnte, im Gegensatz zu normalem Gewebe, auf einer Vielzahl solider Tumoren *in situ* nachgewiesen werden, so unter anderem auf Lungen-, Ovarial-, Nierenzell- und Colonkarzinomen sowie malignen Melanomen.¹⁸ Retrospektive Studien bei Patienten mit Nierenzellkarzinomen konnten eine Korrelation zwischen der PD-L1 Expressionsrate und der Krankheitsprognose nachweisen. So war eine hohe Expressionsrate von PD-L1 seitens des Tumors mit einer signifikant schlechteren Krankheitsprognose der Patienten assoziiert. Desweiteren konnte eine PD-1 Expression der tumorinfiltrierenden Lymphozyten gezeigt werden. Auch hier war eine Tumordinfiltration mit PD-1 exprimierenden Lymphozyten mit einer ungünstigen Tumorphathologie und einer verminderten Überlebensrate der Patienten vergesellschaftet.^{64,65} Ein Zusammenhang zwischen hoher PD-L1 Expressionsrate des Tumors und ungünstiger Prognose der Erkrankung wurde auch bei Patienten mit Ovarial-, Mamma- und Ösophaguskarzinom beschrieben.^{24,27,46} In mehreren Modellen ist es bereits gelungen durch Blockade der PD-L1/PD-1 Interaktion eine Eradikation des Tumors bzw. eine verbesserte Tumorkontrolle zu erzielen. Im Rahmen einer antikörperinduzierten PD-1 Blockade humaner melanomspezifischer CD8⁺ T-Zellen zeigte sich *in vitro* eine vermehrte Proliferation funktionsfähiger Tumorantigen spezifischer T-Zellen mit einer erhöhten Fähigkeit der Antigenerkennung. In einem Mausmodell mit Melanom- und Colonkarzinomzellen wurde durch den Einsatz eines murinen blockierenden anti-PD-1 Antikörpers in Kombination mit GM-CSF ein signifikanter Anstieg von Anzahl, Wirksamkeit und Aktivitätsdauer der tumorspezifischen T-Zellen erzielt. Außerdem konnte eine deutlich verlängerte Überlebenszeit der behandelten Tiere im Vergleich zur Gruppe der nur mit GM-CSF behandelten Mäuse gezeigt werden. Das Wachstum von Myelomzellen in Mäusen konnte durch die Applikation eines murinen anti-PD-L1 Antikörpers *in vivo* signifikant eingedämmt werden, in *Pcdcl^{-/-}* Tieren gelang sogar eine komplette Unterdrückung des Tumorstwachstums.^{11,29,31,41,74}

1.4 Zielsetzung

Die Identifizierung spezifischer Tumorantigene sowie der Nachweis von tumorantigenspezifischen T-Zellen bei Patienten mit malignem Melanom haben zur Entwicklung verschiedener immuntherapeutischer Verfahren geführt. Einen wichtigen immunmodulierenden Therapieansatz stellt hierbei der Einsatz von Melan-A spezifischen CD8⁺ T-Zellen dar.^{21,40}

Um die Rolle von Melan-A spezifischen T-Zellen im Rahmen der Immunantwort bei Patienten mit malignem Melanom genauer zu definieren, wurden in einem ersten Teil der Arbeit die peripheren mononukleären Zellen von 100 Melanompatienten unter Berücksichtigung des Tumorstadiums durchflusszytometrisch auf den prozentualen Anteil Melan-A spezifischer CD8⁺ T-Zellen untersucht. Ziel dieses Versuchsansatzes war es, eine mögliche Korrelation zwischen der Frequenz der Melan-A spezifischen T-Zellen und dem Tumorstadium nachzuweisen, welche Rückschlüsse auf die Entwicklung der körpereigenen, tumorspezifischen Immunabwehr im Rahmen der Tumorausbreitung liefern könnte.

In einem zweiten Ansatz wurden die Melan-A spezifischen CD8⁺ T-Zellen mittels der Oberflächenmoleküle CCR7 und CD45RA phänotypisiert. Da den verschiedenen T-Zell Phänotypen verschiedene Funktionen des Abwehrsystems zugeordnet werden können^{57,59,60}, sollte dieser Versuchsansatz vor allem dazu dienen, das Ausmaß und die Effektivität der körpereigenen Tumorabwehr näher zu beschreiben. Unterschiede im Aktivierungsgrad der Melan-A spezifischen T-Zellen unter Berücksichtigung des Tumorstadiums könnten wichtige Hinweise auf die Funktion der Melan-A spezifischen T-Zellen im Hinblick auf die Tumorausbreitung liefern.

Ein elementares Problem stellt die, trotz Nachweis von erhöhten Frequenzen Melan-A spezifischer T-Zellen^{4,25,63}, enttäuschende klinische Ansprechrate der Melanompatienten dar.^{28,54,77} Dies wird auf verschiedene, die T-Zell Funktion inhibierende, Mechanismen zurückgeführt, wobei bei Patienten mit malignem Melanom der PD-1/PD-L1 Signalweg von entscheidender Bedeutung zu sein scheint.^{11,29,31,74} Vor diesem Hintergrund wurde in einem dritten Teil dieser Arbeit die prozentuale PD-1 Expressionsrate der Melan-A spezifischen CD8⁺ T-Zellen und deren Phänotypen in Abhängigkeit vom Tumorstadium analysiert. Darüberhinaus erfolgte eine Gegenüberstellung der Ergebnisse mit den Resultaten für die Population der PD-1⁺ CD8⁺ T-Zellen und deren Subgruppen. Hierbei

stand die Fragestellung im Vordergrund, ob Unterschiede in der PD-1 Expressionsrate der untersuchten T-Zellen in Abhängigkeit von Tumorstadium sowie im Zellvergleich zu erkennen sind.

2. Ergebnisse

2.1 Charakterisierung der Melan-A spezifischen CD8⁺ T-Zellen in Abhängigkeit vom Tumorstadium

In der Immunreaktion des Körpers gegen Tumoren scheint die zelluläre Immunantwort von entscheidender Bedeutung zu sein. Aus diesem Grund wurden die peripheren mononukleären Zellen von 100 Melanompatienten zunächst durchflusszytometrisch auf die Expression der T-Zellmarker CD3 und CD8 sowie auf ihre Spezifität bezüglich des Melanozytendifferenzierungsantigens Melan-A analysiert. Alle Analyseergebnisse sind im Folgenden graphisch in Form von Säulendiagrammen dargestellt. Hierbei entspricht die Höhe einer Säule dem Mittelwert der Frequenz der analysierten Zellpopulation aller untersuchten Patientenproben in dem entsprechenden Tumorstadium. Der Standardfehler wird über den jeweiligen Fehlerbalken angegeben. Darüberhinaus werden die Anzahl der untersuchten Patienten sowie die experimentell ermittelten zugehörigen Mittelwerte und Standardfehler der analysierten Zellpopulation für die Tumorstadien 1 bis 4 nochmals jeweils tabellarisch aufgelistet.

2.1.1 Die Frequenz der Melan-A spezifischen CD8⁺ T-Zellen steigt signifikant mit dem Tumorstadium

Die Abbildung 1 sowie Tabelle 1 geben die Ergebnisse der Analyse der Population der Melan-A spezifischen CD8⁺ T-Zellen wieder. Die Frequenz der Melan-A spezifischen CD8⁺ T-Zellen war im Stadium 1 mit einem Mittelwert von 0,016% am geringsten. Die Analyse der Patientenproben der Tumorstadien 2 und 3 ergab einen deutlichen Frequenzanstieg der untersuchten Zellpopulation mit Zunahme des Krankheitsstadiums. Die höchsten mittleren Frequenzen konnten bei den Melanompatienten im Tumorstadium 4 gemessen werden. Hier lag der Mittelwert der Melan-A spezifischen CD8⁺ T-Zellen bei 0,057%. Entsprechend dem definierten statistischen Signifikanzniveau von $p \leq 0,05$ konnten beim Vergleich der Ergebnisse statistisch signifikante Unterschiede bezüglich der Frequenz der Melan-A spezifischen CD8⁺ T-Zellen in den unterschiedlichen Tumorstadien des malignen Melanoms nachgewiesen werden. So zeigte sich zwischen Tumorstadium 1 und 3 ein, mit einem p-Wert von

0,035 statistisch signifikanter Unterschied in der Frequenz der untersuchten Zellpopulation. Der Frequenzunterschied zwischen Tumorstadium 1 und 4 lässt sich sogar als statistisch hoch signifikant einstufen. Desweiteren konnten zwischen den Tumorstadien 2 und 4 ($p=0,012$), sowie zwischen den Stadien 3 und 4 ($p=0,036$) statistisch signifikante Frequenzunterschiede nachgewiesen werden. Somit konnte mit diesem Versuch sehr deutlich gezeigt werden, dass die Frequenz der Melan-A spezifischen $CD8^+$ T-Zellen mit Zunahme des Tumorstadiums statistisch signifikant ansteigt.

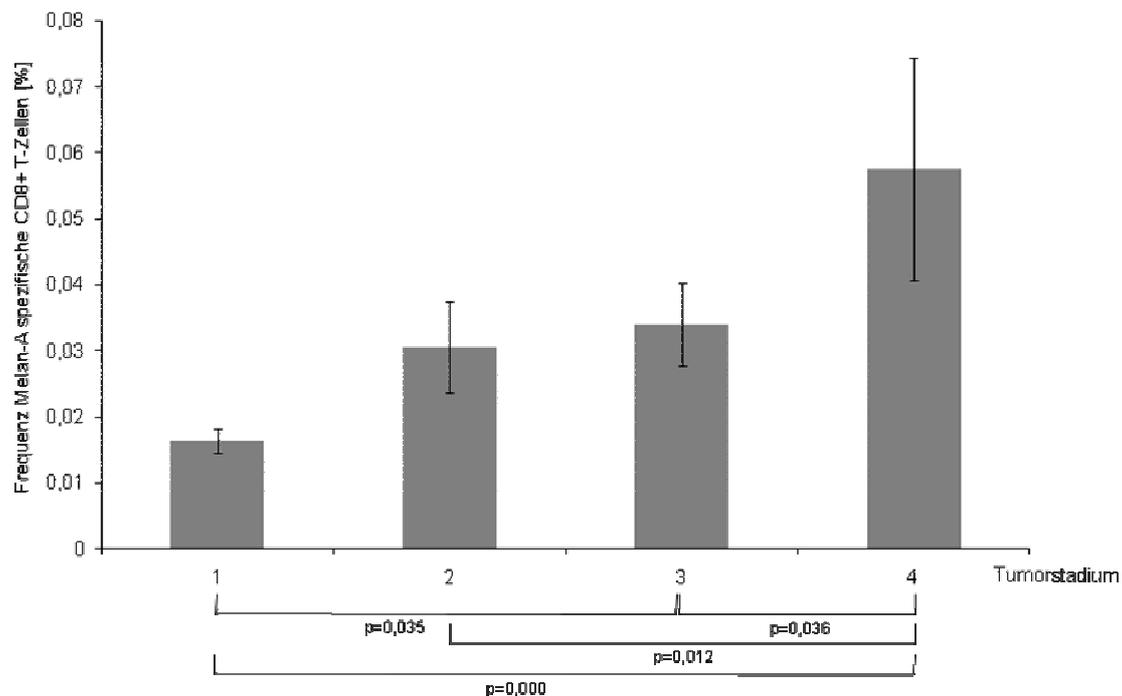


Abb. 1: Analyse der Frequenz der Melan-A spezifischen $CD8^+$ T-Zellen in den Tumorstadien 1 bis 4 Statistisch signifikanter Anstieg der Frequenz der Melan-A spezifischen $CD8^+$ T-Zellen mit Zunahme des Tumorstadiums; statistisches Signifikanzniveau $p \leq 0,05$

	<i>Untersuchungs-kollektiv (n)</i>	<i>Mittelwert (%)</i>	<i>Standardfehler</i>
<i>Tumorstadium 1</i>	44	0,016	0,002
<i>Tumorstadium 2</i>	25	0,031	0,007
<i>Tumorstadium 3</i>	19	0,034	0,006
<i>Tumorstadium 4</i>	12	0,057	0,017

Tabelle 1: Analyse der Melan-A spezifischen $CD8^+$ T-Zellen in den Tumorstadien 1 bis 4 Tabellarische Auflistung von Anzahl der untersuchten Patienten, Mittelwert und Standardfehler

2.1.2 Die Frequenz der Melan-A spezifischen naiven CD8⁺ T-Zellen ist im Tumorstadium 2 statistisch signifikant erniedrigt

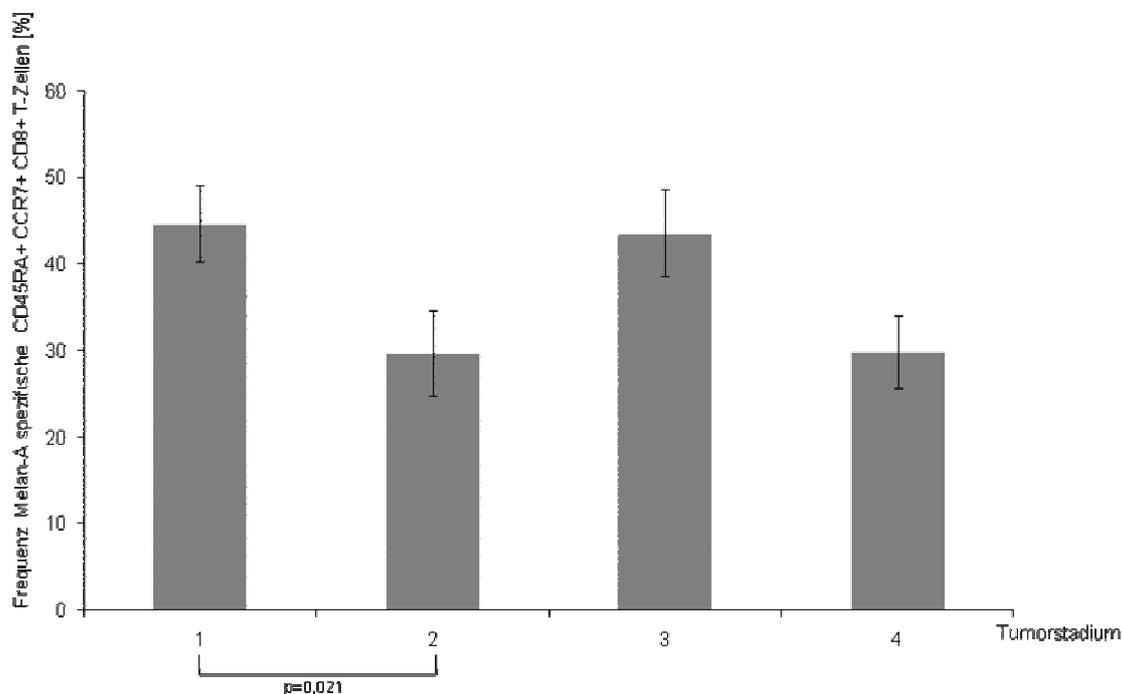


Abb. 2: Analyse der Frequenz der Melan-A spezifischen naiven CD8⁺T-Zellen in den Tumorstadien 1 bis 4 Statistisch signifikanter Unterschied der Frequenz der analysierten Zellpopulation zwischen den Tumorstadien 1 und 2; statistisches Signifikanzniveau $p \leq 0,05$

	<i>Untersuchungs-kollektiv (n)</i>	<i>Mittelwert (%)</i>	<i>Standardfehler</i>
<i>Tumorstadium 1</i>	42	44,660	4,427
<i>Tumorstadium 2</i>	24	29,684	4,934
<i>Tumorstadium 3</i>	18	43,614	5,048
<i>Tumorstadium 4</i>	12	29,846	4,208

Tabelle 2: Analyse der Melan-A spezifischen naiven CD8⁺ T-Zellen in den Tumorstadien 1 bis 4 Tabellarische Auflistung von Anzahl der untersuchten Patienten, Mittelwert und Standardfehler

Im Weiteren wurden die Melan-A spezifischen CD8⁺ T-Zellen mittels der Aktivierungsmarker CD45RA und CCR7 charakterisiert und deren prozentuale Verteilung auf die verschiedenen Phänotypen analysiert. Abbildung 2 und Tabelle 2 zeigen die Ergebnisse dieses Experiments für die Subpopulation der naiven, CD45RA⁺ CCR7⁺ T-Zellen. Der Vergleich der Mittelwerte der Frequenz der Melan-A spezifischen naiven CD8⁺ T-Zellen in den unterschiedlichen Tumorstadien ergab erhöhte mittlere

Zellfrequenzen in den Tumorstadien 1 und 3. Die analysierten Patientenproben der Tumorstadien 2 und 4 hingegen zeigten vergleichsweise deutlich geringere Mittelwerte. Im Tumorstadium 1 war der Mittelwert der Frequenz der Melan-A spezifischen naiven $CD8^+$ T-Zellen mit 44,66% am höchsten, der geringste Mittelwert wurde mit 29,684 % im Tumorstadium 2 ermittelt. Trotz deutlicher Frequenzunterschiede der analysierten Zellpopulation in den verschiedenen Krankheitsstadien, zeigte sich lediglich zwischen Tumorstadium 1 und 2 ein mit einem p-Wert von 0,021 statistisch signifikanter Unterschied. Somit konnte eine statistisch signifikante Frequenzabnahme der Melan-A spezifischen naiven $CD8^+$ T-Zellen im Tumorstadium 2 nachgewiesen werden.

2.1.3 Die Frequenz der Melan-A spezifischen Zentral-Gedächtnis $CD8^+$ T-Zellen ist im Tumorstadium 2 statistisch signifikant erhöht

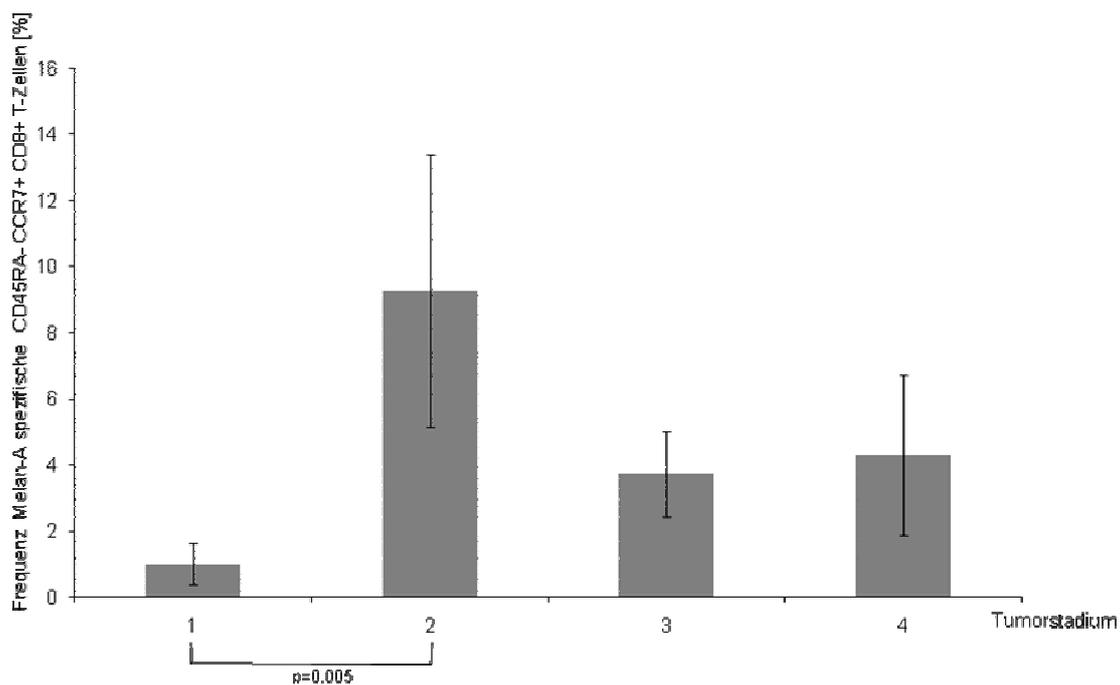


Abb. 3: Analyse der Frequenz der Melan-A spezifischen Zentral-Gedächtnis $CD8^+$ T-Zellen in den Tumorstadien 1 bis 4 Statistisch signifikant erhöhte Frequenz der Melan-A spezifischen Zentral-Gedächtnis $CD8^+$ T-Zellen im Tumorstadium 2; statistisches Signifikanzniveau $p \leq 0,05$

	<i>Untersuchungs- kollektiv (n)</i>	<i>Mittelwert (%)</i>	<i>Standardfehler</i>
<i>Tumorstadium 1</i>	42	1,023	0,626
<i>Tumorstadium 2</i>	24	9,276	4,111
<i>Tumorstadium 3</i>	18	3,75	1,293
<i>Tumorstadium 4</i>	12	4,312	2,430

Tabelle 3: Analyse der Melan-A spezifischen Zentral-Gedächtnis CD8⁺ T-Zellen in den Tumorstadien 1 bis 4 Tabellarische Auflistung von Anzahl der untersuchten Patienten, Mittelwert und Standardfehler

Abbildung 3 und Tabelle 3 zeigen die Ergebnisse der durchflusszytometrischen Analyse für die Subpopulation der Zentral-Gedächtnis-T-Zellen (CD45RA⁻ CCR7⁺). Der höchste Mittelwert der Melan-A spezifischen Zentral-Gedächtnis CD8⁺ T-Zellen wurde mit 9,276 % im Tumorstadium 2 ermittelt. Die Tumorstadien 1, 3 und 4 zeigten deutlich geringere mittlere Zellfrequenzen der untersuchten Zellpopulation. Der geringste Mittelwert zeigte sich mit 1,023 % im Tumorstadium 1. Die statistische Analyse auf Basis der experimentell ermittelten Daten ergab einen deutlich signifikanten Unterschied zwischen den Tumorstadien 1 und 2. Der p-Wert lag hier bei 0,005. Zwischen den restlichen Tumorstadien waren keine statistisch signifikanten Unterschiede nachweisbar.

2.1.4 Die Frequenz der Melan-A spezifischen Effektor-Gedächtnis CD8⁺ T-Zellen ist im Tumorstadium 1 statistisch signifikant erniedrigt

Die Analyseergebnisse der Subpopulation der Effektor- Gedächtnis CD8⁺ T-Zellen (CD45RA⁻ CCR7⁻) der 100 Melanompatienten sind der Abbildung 4 und Tabelle 4 zu entnehmen. Die Frequenz der Melan-A spezifischen Effektor-Gedächtnis CD8⁺ T-Zellen war im Tumorstadium 1 mit einem Mittelwert von 9,824 % am geringsten. Die Tumorstadien 2 bis 4 hingegen zeigten deutlich höhere mittlere Zellfrequenzen, der höchste Mittelwert wurde mit 25,110 % im Tumorstadium 4 ermittelt. Die statistische Auswertung ergab signifikante Frequenzunterschiede der analysierten Zellpopulation zwischen den Tumorstadien 1 und 2 (p=0,003), Tumorstadien 1 und 3 (p=0,035) sowie Tumorstadien 1 und 4 (p=0,002).

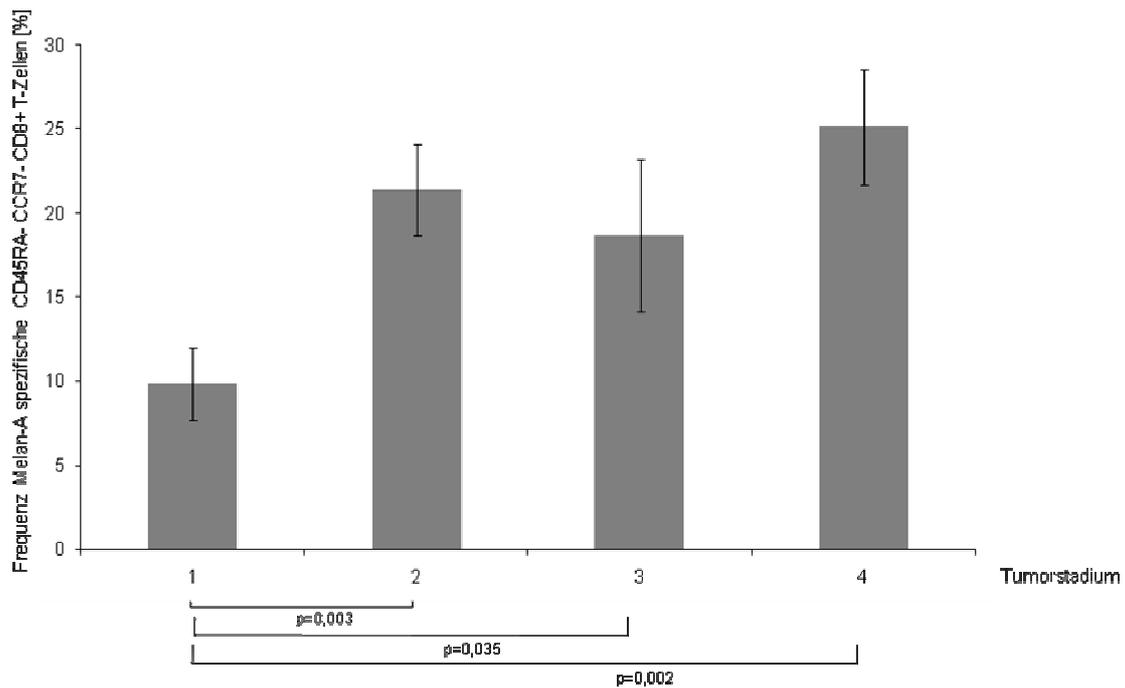


Abb. 4: Analyse der Frequenz der Melan-A spezifischen Effektor-Gedächtnis CD8⁺ T-Zellen in den Tumorstadien 1 bis 4 Statistisch signifikant erniedrigte Frequenz der Melan-A spezifischen Effektor-Gedächtnis CD8⁺ T-Zellen im Tumorstadium 1; statistisches Signifikanzniveau $p \leq 0,05$

	<i>Untersuchungs-kollektiv (n)</i>	<i>Mittelwert (%)</i>	<i>Standardfehler</i>
<i>Tumorstadium 1</i>	42	9,824	2,122
<i>Tumorstadium 2</i>	24	21,370	2,712
<i>Tumorstadium 3</i>	18	18,642	4,515
<i>Tumorstadium 4</i>	12	25,110	3,450

Tabelle 4: Analyse der Melan-A spezifischen Effektor-Gedächtnis CD8⁺ T-Zellen in den Tumorstadien 1 bis 4 Tabellarische Auflistung von Anzahl der untersuchten Patienten, Mittelwert und Standardfehler

2.1.5 Die Frequenz der Melan-A spezifischen Effektor-Gedächtnis-RA⁺ CD8⁺ T-Zellen zeigt keine statistisch signifikante Korrelation mit dem Tumorstadium

Analog zu oben aufgeführten Experimenten wurde auch der Phänotyp der Effektor-Gedächtnis-RA⁺ T-Zellen (CD45RA⁺ CCR7⁻) durchflusszytometrisch analysiert. (Abbildung 5 und Tabelle 5). Hierbei zeigten sich in allen 4 Tumorstadien vergleichsweise hohe mittlere Zellfrequenzen der Melan-A spezifischen Effektor-

Gedächtnis-RA⁺ CD8⁺ T-Zellen. Der höchste Mittelwert wurde mit 39,466 % im Tumorstadium 4 ermittelt, der niedrigste Wert zeigte sich mit 29,721 % bei den Melanompatienten im Tumorstadium 3. Die statistische Auswertung für diese Subpopulation ergab keine signifikanten Unterschiede.

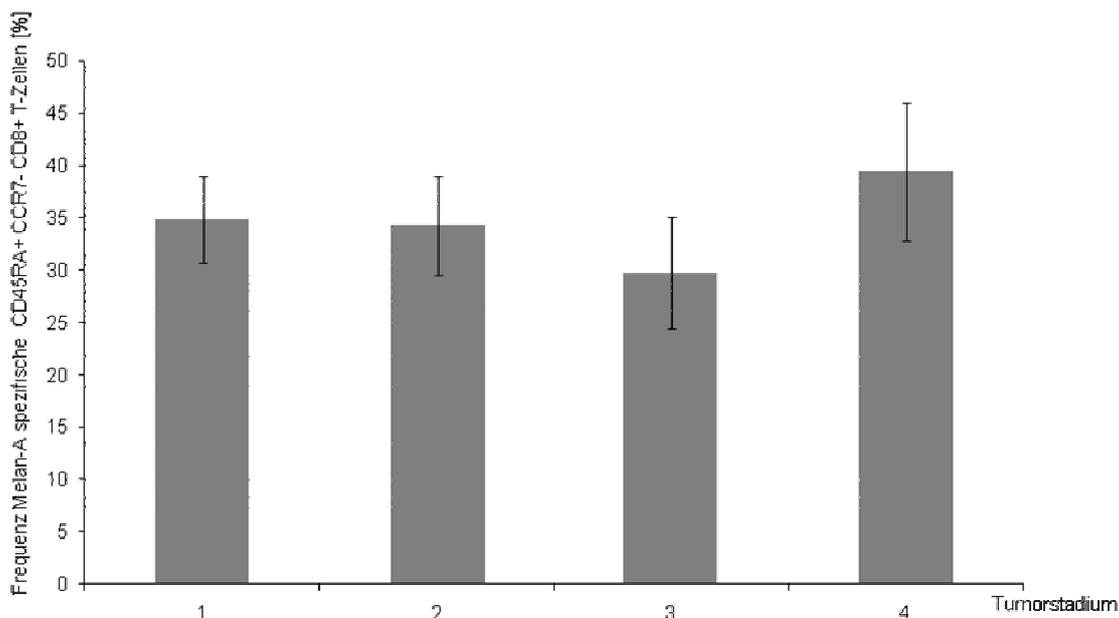


Abb. 5: Analyse der Frequenz der Melan-A spezifischen Effektor-Gedächtnis-RA⁺ CD8⁺ T-Zellen in den Tumorstadien 1 bis 4 Keine statistisch nachweisbare Korrelation zwischen mittleren Zellfrequenzen und Tumorstadium; statistisches Signifikanzniveau $p \leq 0,05$

	<i>Untersuchungs-kollektiv (n)</i>	<i>Mittelwert (%)</i>	<i>Standardfehler</i>
<i>Tumorstadium 1</i>	42	34,889	4,150
<i>Tumorstadium 2</i>	24	34,312	4,703
<i>Tumorstadium 3</i>	18	29,712	5,328
<i>Tumorstadium 4</i>	12	39,466	6,586

Tabelle 5: Analyse der Melan-A spezifischen Effektor-Gedächtnis-RA⁺ CD8⁺ T-Zellen in den Tumorstadien 1 bis 4 Tabellarische Auflistung von Anzahl der untersuchten Patienten, Mittelwert und Standardfehler

2.2 Charakterisierung der PD-1⁺ Melan-A spezifischen CD8⁺ T-Zellen in Abhängigkeit vom Tumorstadium

Der Rezeptor Programmed-death-factor 1 (PD-1) scheint als negativ regulatorischer Mechanismus der T-Zellfunktion in der Immunreaktion des Körpers gegen das maligne Melanom von entscheidender Bedeutung zu sein. Aus diesem Grund wurden sowohl die CD8⁺ als auch die Melan-A spezifischen CD8⁺ T-Zellen und deren jeweilige Subpopulationen auf die Expression von PD-1 untersucht.

2.2.1 Die Frequenz der PD-1⁺ Melan-A spezifischen CD8⁺ T-Zellen ist in den Tumorstadien 3 und 4 statistisch signifikant erhöht

Die Abbildung 6 und Tabelle 6 zeigen die Ergebnisse der Analyse der PD-1 Expression für die Zellpopulation der Melan-A spezifischen CD8⁺ T-Zellen. Da diese zytotoxischen T-Zellen spezifisch gegen das von den Tumorzellen exprimierte Melanozytendifferenzierungsantigen Melan-A gerichtet sind, könnte eine PD-1 Expression dieser Zellen eine bedeutende Rolle im Rahmen der körpereigenen Immunabwehr des Tumors spielen. Wie den folgenden Abbildungen zu entnehmen ist, zeigte sich ein deutlicher Frequenzunterschied der PD-1 exprimierenden Melan-A spezifischen CD8⁺ T-Zellen zwischen den frühen Tumorstadien 1 und 2 und den fortgeschrittenen Krankheitsstadien 3 und 4. So ergaben sich im Stadienvergleich niedrige mittlere Zellfrequenzen Melan-A spezifischer PD-1⁺ CD8⁺ T-Zellen in den Tumorstadien 1 und 2. Der niedrigste Mittelwert der Zellpopulation wurde mit 18,88 % im Tumorstadium 2 ermittelt. Die Tumorstadien 3 und 4 zeichneten sich durch vergleichsweise höhere Mittelwerte aus. So war die PD-1 Expressionsrate mit 36,702 % aller Melan-A spezifischen CD8⁺ T-Zellen im Tumorstadium 4 am höchsten. Als statistisch signifikant konnten die Unterschiede der prozentualen PD-1 Expression der analysierten Zellpopulation zwischen den Tumorstadien 2 und 3 ($p=0,054$) sowie 2 und 4 ($p=0,029$) gewertet werden. Desweiteren erwies sich der Frequenzunterschied zwischen Tumorstadium 1 und 4 mit einem p-Wert von 0,049 als statistisch signifikant.

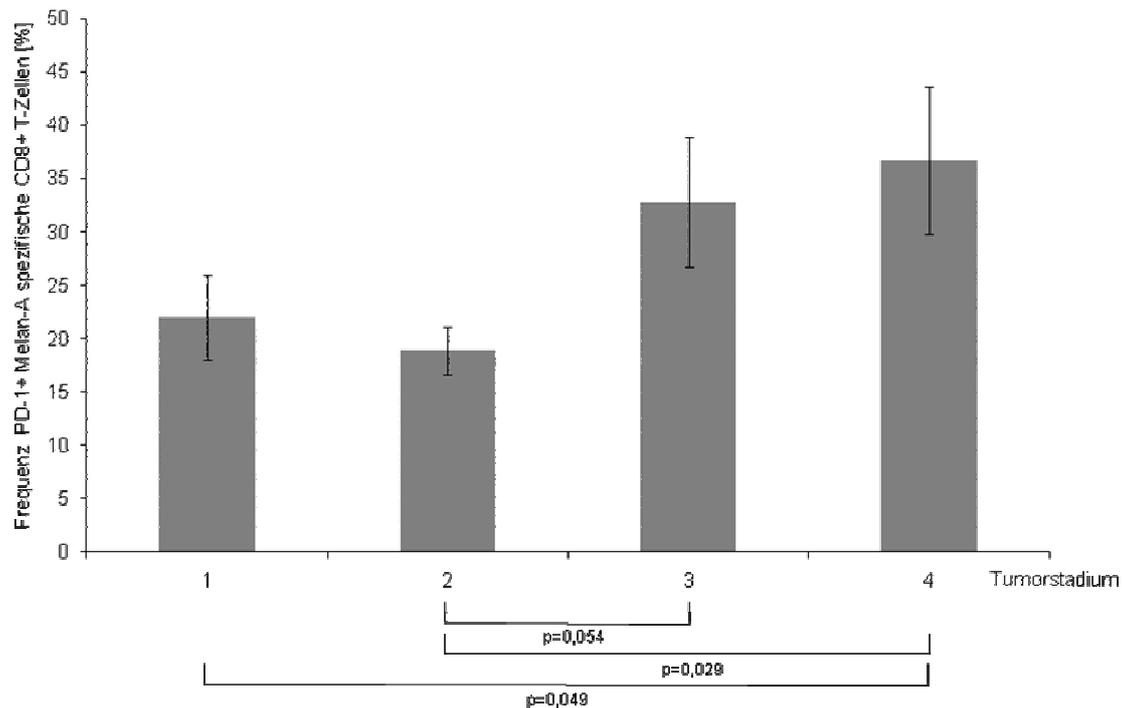


Abb. 6: Analyse der Frequenz der PD-1⁺ Melan-A spezifischen CD8⁺ T-Zellen in den Tumorstadien 1 bis 4 Statistisch signifikant erhöhte Frequenz der PD-1⁺ Melan-A spezifischen CD8⁺T-Zellen in den Tumorstadien 3 und 4; statistisches Signifikanzniveau $p \leq 0,05$

	<i>Untersuchungs-kollektiv (n)</i>	<i>Mittelwert (%)</i>	<i>Standardfehler</i>
<i>Tumorstadium 1</i>	41	21,952	3,953
<i>Tumorstadium 2</i>	23	18,880	2,278
<i>Tumorstadium 3</i>	18	32,763	6,102
<i>Tumorstadium 4</i>	12	36,702	6,864

Tabelle 6: Analyse der PD-1⁺ Melan-A spezifischen CD8⁺ T-Zellen in den Tumorstadien 1 bis 4
Tabellarische Auflistung von Anzahl der untersuchten Patienten, Mittelwert und Standardfehler

2.3 Gegenüberstellung der Analyseergebnisse der PD-1⁺ CD8⁺ T-Zellen und der PD-1⁺ Melan-A spezifischen CD8⁺ T-Zellen

Um mögliche Unterschiede der PD-1 Expression zwischen allen CD8⁺ T-Zellen und den Melan-A spezifischen CD8⁺ T-Zellen ermitteln zu können, wurden die Analyseergebnisse dieser beiden Populationen sowie deren Subgruppen gegenübergestellt und statistisch ausgewertet.

2.3.1 Der prozentuale Anteil der PD-1⁺ T-Zellen ist in der Population der Melan-A spezifischen CD8⁺ T-Zellen im Vergleich zu der Population der CD8⁺ T-Zellen in den Tumorstadien 1, 3 und 4 statistisch signifikant erhöht

In einem ersten Ansatz wurde der prozentuale Anteil PD-1 exprimierender CD8⁺ T-Zellen mit dem prozentualen Anteil PD-1 exprimierender Melan-A spezifischer CD8⁺ T-Zellen verglichen. Unterschiede in dem prozentualen Anteil PD-1⁺ T-Zellen dieser Populationen könnten Erklärungen für eine mangelnde Immunantwort des Körper gegen das maligne Melanom liefern.

Wie in Abbildung 7 und Tabelle 7 dargestellt, war der Anteil an PD-1⁺ CD8⁺ T-Zellen mit einem Mittelwert von 18,306% im Tumorstadium 2 am höchsten. Der geringste prozentuale Anteil PD-1 exprimierender CD8⁺ T-Zellen wurde im Stadium 4 ermittelt (Mittelwert 12,134 %). Wie in Abschnitt 2.2.1 bereits ausführlich beschrieben, zeigte sich unter den Melan-A spezifischen CD8⁺ T-Zellen eine geringe prozentuale PD-1 Expression in den Tumorstadien 1 und 2, während die Stadien 3 und 4 deutlich höhere Frequenzen an PD-1 exprimierenden Zellen aufwiesen.

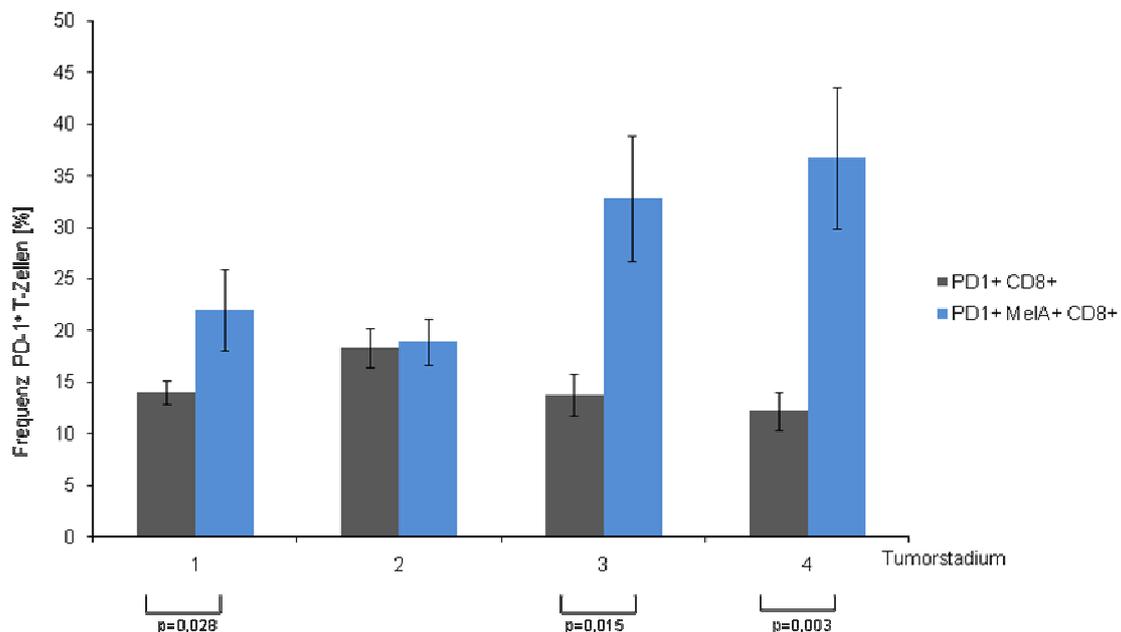


Abb. 7: Vergleich der Frequenz der PD-1⁺ CD8⁺ T-Zellen und PD-1⁺ Melan-A spezifischen CD8⁺ T-Zellen in den Tumorstadien 1 bis 4 Statistisch signifikant erhöhter Anteil PD-1⁺ T-Zellen unter den Melan-A spezifischen CD8⁺ T-Zellen im Vergleich mit allen CD8⁺ T-Zellen in den Tumorstadien 1,3 und 4; statistisches Signifikanzniveau $p \leq 0,05$

	<i>Untersuchungs- kollektiv (n)</i>	<i>Mittelwert (%)</i>	<i>Standardfehler</i>
<i>Tumorstadium 1</i>			
•PD-1 ⁺ CD8 ⁺	44	14,022	1,129
•PD-1 ⁺ MelA ⁺ CD8 ⁺	41	21,951	3,953
<i>Tumorstadium 2</i>			
•PD-1 ⁺ CD8 ⁺	25	18,306	1,944
•PD-1 ⁺ MelA ⁺ CD8 ⁺	23	18,880	2,278
<i>Tumorstadium 3</i>			
•PD-1 ⁺ CD8 ⁺	19	13,712	2,021
•PD-1 ⁺ MelA ⁺ CD8 ⁺	18	32,763	6,102
<i>Tumorstadium 4</i>			
•PD-1 ⁺ CD8 ⁺	12	12,134	1,844
•PD-1 ⁺ MelA ⁺ CD8 ⁺	12	36,702	6,864

Tabelle 7: Gegenüberstellung der Analyseergebnisse der PD-1⁺ CD8⁺ T-Zellen und der PD-1⁺ Melan-A spezifischen CD8⁺T-Zellen in den Tumorstadien 1 bis 4 Tabellarische Auflistung von Anzahl der untersuchten Patienten, Mittelwert und Standardfehler

In der Gegenüberstellung der Zellpopulationen zeigten die Melan-A spezifischen CD8⁺ T-Zellen in allen Tumorstadien einen deutlich höheren prozentualen Anteil an PD-1⁺ Zellen im Vergleich mit allen CD8⁺ T-Zellen. Die statistische Auswertung der Ergebnisse ergab diesbezüglich signifikante Frequenzunterschiede für die Tumorstadien 1 (p=0,028), 3 (p=0,015) und 4 (p=0,003).

2.3.2 Der prozentuale Anteil der PD-1⁺ T-Zellen ist in der Population der naiven CD8⁺ T-Zellen im Vergleich zu der Population der Melan-A spezifischen naiven CD8⁺ T-Zellen in den Tumorstadien 1 und 4 statistisch signifikant erniedrigt

Abbildung 8 und Tabelle 8 sind die Ergebnisse der Gegenüberstellung der PD-1⁺ naiven CD8⁺ T-Zellen und der PD-1⁺ Melan-A spezifischen naiven CD8⁺ T-Zellen zu entnehmen. Die Population der naiven T-Zellen ist durch die Expression der Oberflächenmarker CCR7 und CD45RA charakterisiert. Für die Population der PD-1⁺ naiven CD8⁺ T-Zellen ergaben sich ähnliche Mittelwerte in allen Tumorstadien, es zeigte sich eine Tendenz erhöhter mittlerer Frequenzen in den Tumorstadien 1 und 2 (Mittelwerte 5,076 % und 4,125 %) im Vergleich zu den Tumorstadien 3 und 4 (Mittelwerte 2,679 % und 2,485 %). Die Analyse der PD-1⁺ Melan-A spezifischen naiven CD8⁺ T-Zellen ergab erhöhte Zellfrequenzen in den Tumorstadien 1 (Mittelwert

21,138 %) und 4 (Mittelwert 27,775 %), die Tumorstadien 2 und 3 wiesen vergleichsweise geringe mittlere T-Zellfrequenzen auf (Mittelwerte 10,75 % und 9,0 %). In der Gegenüberstellung der beiden Populationen ergaben sich signifikante p-Werte für die Tumorstadien 1 (p=0,001) und 4 (p=0,044).

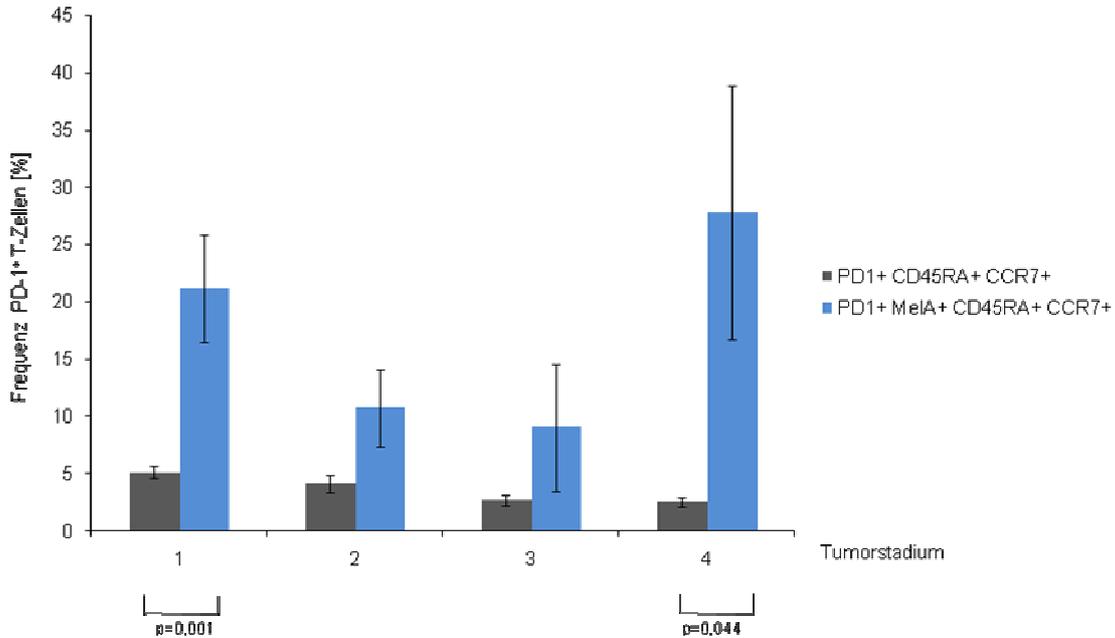


Abb. 8: Vergleich der Frequenz der PD-1⁺ naiven CD8⁺ T-Zellen und der PD-1⁺ Melan-A spezifischen naiven CD8⁺ T-Zellen in den Tumorstadien 1 bis 4 Statistisch signifikant erhöhte Frequenz der PD-1⁺ T-Zellen unter den Melan-A spezifischen naiven CD8⁺ T-Zellen im Vergleich mit allen naiven CD8⁺ T-Zellen in den Tumorstadien 1 und 4; statistisches Signifikanzniveau $p \leq 0,05$

	<i>Untersuchungs-kollektiv (n)</i>	<i>Mittelwert (%)</i>	<i>Standardfehler</i>
<i>Tumorstadium 1</i>			
•PD-1 ⁺ CD45RA ⁺ CCR7 ⁺	44	5,076	0,512
•PD-1 ⁺ MelA ⁺ CD45RA ⁺ CCR7 ⁺	39	21,138	4,652
<i>Tumorstadium 2</i>			
•PD-1 ⁺ CD45RA ⁺ CCR7 ⁺	25	4,125	0,740
•PD-1 ⁺ MelA ⁺ CD45RA ⁺ CCR7 ⁺	20	10,75	3,361
<i>Tumorstadium 3</i>			
•PD-1 ⁺ CD45RA ⁺ CCR7 ⁺	19	2,679	0,472
•PD-1 ⁺ MelA ⁺ CD45RA ⁺ CCR7 ⁺	18	9,0	6,0
<i>Tumorstadium 4</i>			
•PD-1 ⁺ CD45RA ⁺ CCR7 ⁺	12	2,485	0,404
•PD-1 ⁺ MelA ⁺ CD45RA ⁺ CCR7 ⁺	12	27,775	11,027

Tabelle 8: Gegenüberstellung Analyseergebnisse PD-1⁺ naive CD8⁺ T-Zellen und PD-1⁺ Melan-A spezifische naive CD8⁺ T-Zellen in den Tumorstadien 1 bis 4 Tabellarische Auflistung von Anzahl der untersuchten Patienten, Mittelwert und Standardfehler

2.3.3 In der Gegenüberstellung der PD-1⁺ Zentral-Gedächtnis CD8⁺ T-Zellen und der PD-1⁺ Melan-A spezifischen Zentral-Gedächtnis CD8⁺ T-Zellen zeigten sich keine statistisch signifikanten Unterschiede in den Tumorstadien 1 bis 4

In Abbildung 9 und Tabelle 9 sind die Resultate der Gegenüberstellung der Subpopulation der PD-1⁺ Zentral-Gedächtnis CD8⁺ T-Zellen (CD45RA⁻ CCR7⁺) sowie der PD-1⁺ Melan-A spezifischen Zentral-Gedächtnis CD8⁺ T-Zellen (CD45RA⁻ CCR7⁺) aufgeführt.

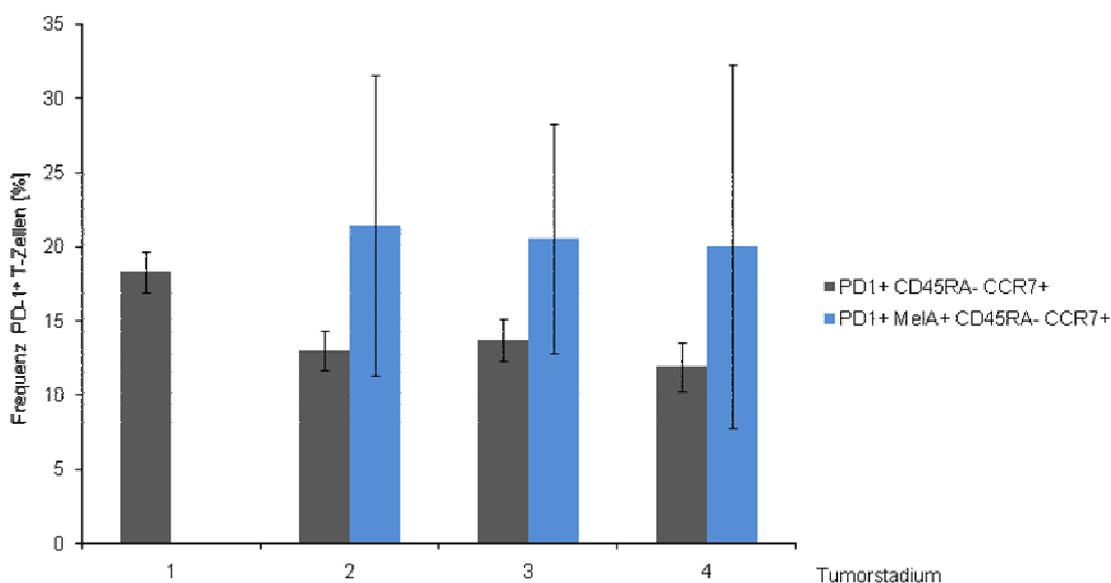


Abb. 9: Vergleich der Frequenz der PD-1⁺ Zentral-Gedächtnis CD8⁺ T-Zellen und der PD-1⁺ Melan-A spezifischen Zentral-Gedächtnis CD8⁺ T-Zellen in den Tumorstadien 1 bis 4 keine statistisch signifikanten Frequenzunterschiede nachweisbar, statistisches Signifikanzniveau $p \leq 0,05$

	<i>Untersuchungs-kollektiv (n)</i>	<i>Mittelwert (%)</i>	<i>Standardfehler</i>
<i>Tumorstadium 1</i>			
•PD-1 ⁺ CD45RA ⁻ CCR7 ⁺	44	18,269	1,358
•PD-1 ⁺ MelA ⁺ CD45RA ⁻ CCR7 ⁺	3	0	0
<i>Tumorstadium 2</i>			
•PD-1 ⁺ CD45RA ⁻ CCR7 ⁺	25	13,014	1,356
•PD-1 ⁺ MelA ⁺ CD45RA ⁻ CCR7 ⁺	14	21,429	10,102
<i>Tumorstadium 3</i>			
•PD-1 ⁺ CD45RA ⁻ CCR7 ⁺	19	13,701	1,440
•PD-1 ⁺ MelA ⁺ CD45RA ⁻ CCR7 ⁺	7	20,557	7,723

<i>Tumorstadium 4</i>			
•PD-1 ⁺ CD45RA ⁻ CCR7 ⁺	12	11,910	1,633
•PD-1 ⁺ MelA ⁺ CD45RA ⁻ CCR7 ⁺	5	20	12,250

Tabelle 9: Gegenüberstellung der Analyseergebnisse der PD-1⁺ Zentral-Gedächtnis CD8⁺ T-Zellen und der PD-1⁺ Melan-A spezifische Zentral-Gedächtnis CD8⁺ T-Zellen in den Tumorstadien 1 bis 4
Tabellarische Auflistung von Anzahl der untersuchten Patienten, Mittelwert und Standardfehler

Die Frequenz der PD-1⁺ Zentral-Gedächtnis CD8⁺ T-Zellen war im Stadium 1 mit einem Mittelwert von 18,269 % am höchsten. Die Tumorstadien 2 bis 4 zeigten vergleichsweise niedrigere mittlere Zellfrequenzen, wobei die Mittelwerte alle im Bereich von 11 % bis 14 % lagen. Die Analyse der PD-1⁺ Melan-A spezifischen Zentral-Gedächtnis CD8⁺ T-Zellen ergab ein unterschiedliches Verteilungsmuster. So fanden sich keine PD-1⁺ Melan-A spezifischen Zentral-Gedächtnis CD8⁺ T-Zellen im Tumorstadium 1. Die Tumorstadien 2 bis 4 wiesen mit Mittelwerten um 20% deutlich höhere Frequenzen der PD-1⁺ Melan-A spezifischen Zentral-Gedächtnis CD8⁺ T-Zellen auf. Trotz deutlicher Frequenzunterschiede zwischen den beiden Populationen waren in der statistischen Auswertung keine signifikanten Ergebnisse nachweisbar.

2.3.4 In der Gegenüberstellung der PD-1⁺ Effektor-Gedächtnis CD8⁺ T-Zellen und der PD-1⁺ Melan-A spezifischen Effektor-Gedächtnis CD8⁺ T-Zellen zeigten sich keine statistisch signifikanten Unterschiede in den Tumorstadien 1 bis 4

Die Analyse der Subpopulation der PD-1⁺ Effektor-Gedächtnis CD8⁺ T-Zellen (CD45RA⁻CCR7⁻) ergab folgende Ergebnisse (Abbildung 10 und Tabelle 10):

Die Frequenz der PD-1⁺ Effektor-Gedächtnis CD8⁺ T-Zellen war mit Mittelwerten zwischen 32% und 33% in den Tumorstadien 1 bis 3 sehr ähnlich. Im Tumorstadium 4 zeigte sich mit einem Mittelwert von 28,446 % ein vergleichsweise geringerer prozentualer Anteil von PD-1⁺ Effektor-Gedächtnis CD8⁺ T-Zellen. Der Anteil der PD-1⁺ Melan-A spezifischen Effektor-Gedächtnis CD8⁺ T-Zellen war hingegen im Tumorstadium 2 am höchsten (Mittelwert 46,314 %). Die geringste Frequenz dieser Subpopulation wurde im Tumorstadium 3 ermittelt (Mittelwert 24,155 %). Die statistische Auswertung zeigte keine signifikanten Frequenzunterschiede im Vergleich der Population der PD-1⁺ Effektor-Gedächtnis CD8⁺ T-Zellen und der PD-1⁺ Melan-A spezifischen Effektor-Gedächtnis CD8⁺ T-Zellen in allen Tumorstadien.

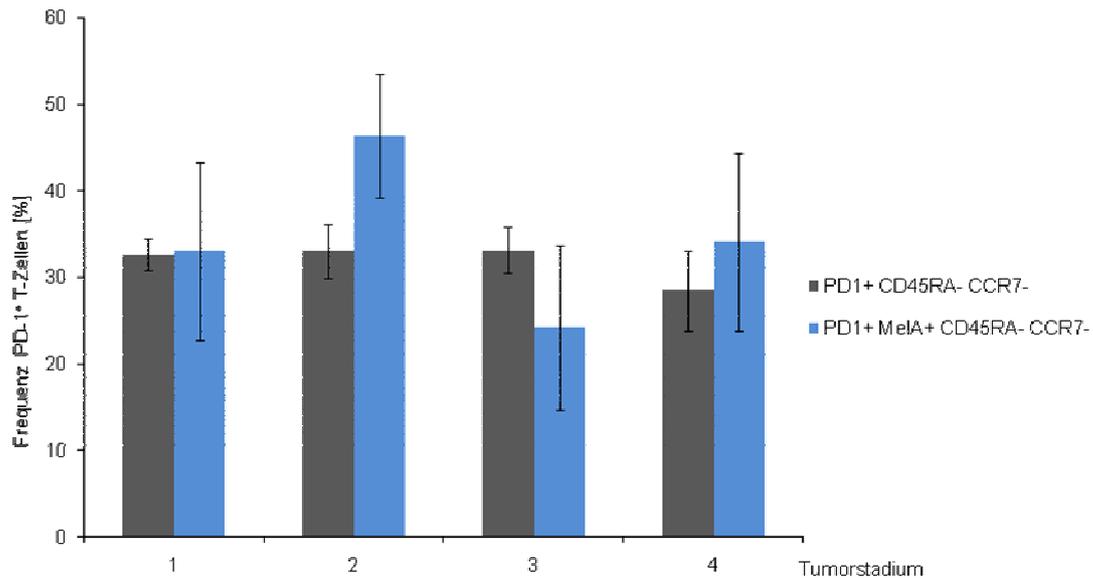


Abb. 10: Vergleich der Frequenz der PD-1⁺ Effektor-Gedächtnis CD8⁺ T-Zellen und der PD-1⁺ Melan-A spezifischen Effektor-Gedächtnis CD8⁺ T-Zellen in den Tumorstadien 1 bis 4 keine statistisch signifikanten Frequenzunterschiede nachweisbar, statistisches Signifikanzniveau $p \leq 0,05$

	<i>Untersuchungs-kollektiv (n)</i>	<i>Mittelwert (%)</i>	<i>Standardfehler</i>
<i>Tumorstadium 1</i>			
•PD-1 ⁺ CD45RA ⁻ CCR7 ⁻	44	32,61	1,88
•PD-1 ⁺ MelA ⁺ CD45RA ⁻ CCR7 ⁻	20	33,03	10,264
<i>Tumorstadium 2</i>			
•PD-1 ⁺ CD45RA ⁻ CCR7 ⁻	25	32,993	3,056
•PD-1 ⁺ MelA ⁺ CD45RA ⁻ CCR7 ⁻	21	46,314	7,115
<i>Tumorstadium 3</i>			
•PD-1 ⁺ CD45RA ⁻ CCR7 ⁻	19	33,111	2,655
•PD-1 ⁺ MelA ⁺ CD45RA ⁻ CCR7 ⁻	11	24,155	9,541
<i>Tumorstadium 4</i>			
•PD-1 ⁺ CD45RA ⁻ CCR7 ⁻	12	28,446	4,613
•PD-1 ⁺ MelA ⁺ CD45RA ⁻ CCR7 ⁻	11	34,064	10,260

Tabelle 10: Gegenüberstellung der Analyseergebnisse der PD-1⁺ Effektor-Gedächtnis CD8⁺ T-Zellen und der PD-1⁺ Melan-A spezifische Effektor-Gedächtnis CD8⁺ T-Zellen in den Tumorstadien 1 bis 4 Tabellarische Auflistung von Anzahl der untersuchten Patienten, Mittelwert und Standardfehler

2.3.5 In der Gegenüberstellung der PD-1⁺ Effektor-Gedächtnis-RA⁺ CD8⁺ T-Zellen und der PD-1⁺ Melan-A spezifischen Effektor-Gedächtnis-RA⁺ CD8⁺ T-Zellen zeigten sich keine statistisch signifikanten Unterschiede in den Tumorstadien 1 bis 4

Abbildung 11 und Tabelle 11 geben die Ergebnisse der Analyse der PD-1⁺ Effektor-Gedächtnis-RA⁺ CD8⁺ T-Zellen und der PD-1⁺ Melan-A spezifischen Effektor-Gedächtnis-RA⁺ CD8⁺ T-Zellen wieder.

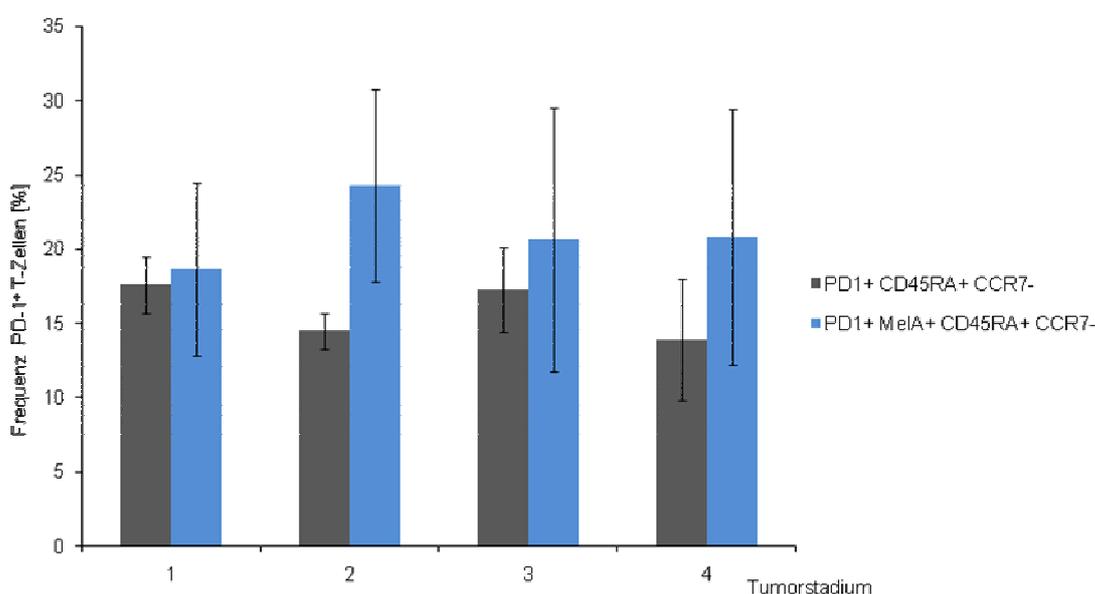


Abb. 11: Vergleich der Frequenz der PD-1⁺ Effektor-Gedächtnis-RA⁺ CD8⁺ T-Zellen und der PD-1⁺ Melan-A spezifischen Effektor-Gedächtnis-RA⁺ CD8⁺ T-Zellen in den Tumorstadien 1 bis 4 keine statistisch signifikanten Frequenzunterschiede nachweisbar, statistisches Signifikanzniveau $p \leq 0,05$

	<i>Untersuchungs-kollektiv (n)</i>	<i>Mittelwert (%)</i>	<i>Standardfehler</i>
<i>Tumorstadium 1</i>			
•PD-1 ⁺ CD45RA ⁺ CCR7 ⁻	44	17,603	1,915
•PD-1 ⁺ MelA ⁺ CD45RA ⁺ CCR7 ⁻	34	18,626	5,806
<i>Tumorstadium 2</i>			
•PD-1 ⁺ CD45RA ⁺ CCR7 ⁻	25	14,462	1,219
•PD-1 ⁺ MelA ⁺ CD45RA ⁺ CCR7 ⁻	21	24,234	6,484
<i>Tumorstadium 3</i>			
•PD-1 ⁺ CD45RA ⁺ CCR7 ⁻	19	17,249	2,821
•PD-1 ⁺ MelA ⁺ CD45RA ⁺ CCR7 ⁻	16	20,653	8,858

<i>Tumorstadium 4</i>			
•PD-1 ⁺ CD45RA ⁺ CCR7 ⁻	12	13,866	4,060
•PD-1 ⁺ MelA ⁺ CD45RA ⁺ CCR7 ⁻	11	20,809	8,630

Tabelle 11: Gegenüberstellung der Analyseergebnisse der PD-1⁺ Effektor-Gedächtnis-RA⁺ CD8⁺ T-Zellen und der PD-1⁺ Melan-A spezifischen Effektor-Gedächtnis-RA⁺ CD8⁺ T-Zellen in den Tumorstadien 1 bis 4 Tabellarische Auflistung von Anzahl der untersuchten Patienten, Mittelwert und Standardfehler

Die Frequenz PD-1⁺ Effektor-Gedächtnis-RA⁺ CD8⁺ T-Zellen war im Tumorstadium 1 mit einem Mittelwert von 17,603 % am höchsten. Das Minimum an PD-1⁺ Effektor-Gedächtnis-RA⁺ CD8⁺ T-Zellen wurde im Tumorstadium 4 ermittelt (Mittelwert 13,866 %). Die Analyse der Population der PD-1⁺ Melan-A spezifischen Effektor-Gedächtnis-RA⁺ CD8⁺ T-Zellen zeigte folgende Resultate: Die niedrigste Frequenz der PD-1⁺ Melan-A spezifischen Effektor-Gedächtnis-RA⁺ CD8⁺ T-Zellen wurde im Tumorstadium 1 ermittelt (Mittelwert 18,626 %), die maximale mittlere Zellfrequenz der Population mit einem Mittelwert von 24,234 % zeigte sich im Tumorstadium 2. Die statistische Auswertung zeigte keine signifikanten Frequenzunterschiede im Vergleich der Population der PD-1⁺ Effektor-Gedächtnis-RA⁺ CD8⁺ T-Zellen und der PD-1⁺ Melan-A spezifischen Effektor-Gedächtnis-RA⁺ CD8⁺ T-Zellen in allen Tumorstadien.

3. Diskussion

3.1 Analyse der peripheren Melan-A spezifischen CD8⁺ T-Zellen von Melanompatienten in Abhängigkeit vom Tumorstadium

Die Identifizierung von tumorassoziierten Antigenen beim malignen Melanom hat zur Entwicklung verschiedener immuntherapeutischer Behandlungsstrategien geführt, deren Ziel es ist, die körpereigene Antigen spezifische zelluläre Immunreaktion gegen den Tumor zu verstärken und somit eine Tumorregression zu erreichen. Eines dieser humanen Melanomantigene stellt das HLA-A2 bindende Melanozytendifferenzierungsantigen Melan-A/MART-1 dar, welches hauptsächlich auf Melanomzellen exprimiert wird, darüberhinaus jedoch auch auf normalen melanozytären Zellen zu finden ist.^{13,53} Verschiedene Arbeitsgruppen konnten bereits die Präsenz von Melan-A spezifischen CD8⁺ T-Zellen im peripheren Blut von Melanompatienten nachweisen. Hierbei konzentrierte sich die Analyse bislang auf Patienten in den fortgeschrittenen Tumorstadien 3 und 4 des malignen Melanoms.^{4,25,33,52,63} In dieser Arbeit wurde der Schwerpunkt nun erstmals auf die Analyse der peripheren Melan-A spezifischen CD8⁺ T-Zellen in Abhängigkeit vom Tumorstadium gelegt. Hierbei wurden durchflusszytometrische Analysen an einem Patientenkollektiv von 100 HLA-A2⁺ Melanompatienten in den Tumorstadien 1 bis 4 durchgeführt. Hier zeigte sich eine statistisch signifikante Zunahme der Frequenz der Melan-A spezifischen CD8⁺ T-Zellen in den Tumorstadien 3 und 4 im Vergleich zu den Tumorstadien 1 und 2. Dieses Ergebnis weist auf eine spezifische, Tumorantigen vermittelte Aktivierung des Immunsystems beim Übergang von den lokalen Tumorstadien 1 und 2 zu den metastasierten Stadien 3 und 4 hin. Ursache hierfür könnte die steigende Dichte an präsentierten Tumorantigenen mit zunehmender Ausbreitung des Tumors sein, welche zu einer verstärkten Rekrutierung der spezifischen T-Zellen führt. Der Nachweis von Melan-A spezifischen CD8⁺ T-Zellen in den frühen Krankheitsstadien 1 und 2 spricht für eine Aktivierung des Immunsystems gegen den Tumor bereits von Krankheitsbeginn an. Es muss jedoch berücksichtigt werden, dass auch bei gesunden HLA-A2⁺ Personen teilweise Frequenzen Melan-A spezifischer CD8⁺ T-Zellen gemessen wurden^{33,51,52} und somit möglicherweise nicht der gesamte Anteil der detektierten Melan-A spezifischen T-Zellen der Melanompatienten auf eine

Tumorantigen assoziierte Induktion zurückzuführen ist. Ursache für eine Tumorantigen unabhängige Aktivierung der spezifischen T-Zellen könnte, neben der Anreicherung Melan-A spezifischer T-Zellen im Rahmen von subklinischen Hautverletzungen⁵¹, auch die Aktivierung Melan-A kreuzreaktiver T-Zellen durch virale, bakterielle oder humane Proteine sein.⁴² Die ausgeprägten, statistisch signifikanten Frequenzunterschiede zwischen den Tumorstadien sprechen jedoch für eine größtenteils Tumorantigen assoziierte Rekrutierung der detektierten Melan-A spezifischen T-Zellen.

3.2 Phänotypische Charakterisierung der Melan-A spezifischen CD8⁺ T-Zellen in Abhängigkeit vom Tumorstadium

Nachdem ein Tumorstadien assoziierter Frequenzanstieg der Melan-A spezifischen CD8⁺ T-Zellen gezeigt werden konnte, sollte nun geklärt werden, ob Unterschiede im Differenzierungs- und Aktivitätsgrad der Antigen spezifischen zytotoxischen T-Zellen in Abhängigkeit vom Tumorstadium zu erkennen sind. Grundsätzlich lassen sich zytotoxische T-Zellen in vier Subpopulationen unterteilen, welche durch die unterschiedliche Expression der Oberflächenmoleküle CCR7 und CD45RA charakterisiert werden können. Infolge eines Antigenkontaktes der primär naiven, CD45RA⁺ CCR7⁺ CD8⁺ T-Zellen kommt es zu einer Änderung der Expression der Oberflächenmoleküle verbunden mit Änderungen der Migrations- und Proliferationseigenschaften der zytotoxischen T-Zellen. Auf diesem Weg erfolgt die Entwicklung in Effektor- und Gedächtnis T-Zellen.^{35,57}

In früheren Studien wurden bereits unterschiedlich hohe Frequenzen naiver Melan-A spezifischer T-Zellen bei Melanompatienten in fortgeschrittenen Tumorstadien nachgewiesen.^{20,51} In dieser Arbeit konnte nun erstmals der prozentuale Anteil dieser T-Zellsubpopulation im Stadienvergleich gezeigt werden.

So war der höchste prozentuale Anteil Melan-A spezifischer naiver CD8⁺ T-Zellen im Tumorstadium 1 nachweisbar, mit einem signifikanten Frequenzunterschied zum Stadium 2. Eine mögliche Erklärung der hohen Frequenz Melan-A spezifischer naiver CD8⁺ T-Zellen im Stadium 1 wäre, dass im Anfangsstadium der Erkrankung aufgrund der rein lokalen Ausbreitung des Tumors eine vergleichsweise niedrige Antigendichte herrscht und somit nur ein geringer Anteil der naiven Tumorantigen spezifischen T-Zellen in einen Effektor- oder Gedächtnisphänotyp übergeht. Im Tumorstadium 2 kann

aufgrund der längeren Krankheitsperiode sowie der bereits fortgeschrittenen Tumorgröße eine erhöhte Antigenexposition über einen längeren Zeitraum angenommen werden, welche zu einer zunehmenden Verlagerung der naiven T-Zellen zu Effektor- und Gedächtnis T-Zellen führen könnte. Sallusto und Lanzavecchia stellten bereits die Hypothese auf, dass die Dauer und Stärke der Antigenstimulation sowie Art und Menge der während dieser Phase zur Verfügung stehenden Zytokine einen wichtigen Einfluss auf die Differenzierung der naiven T-Zellen in Effektor- und Gedächtnis-T-Zellen haben.³⁸ Auch in den Tumorstadien 3 und 4 waren vergleichsweise hohe Frequenzen der Melan-A spezifischen naiven CD8⁺ T-Zellen nachweisbar. Untersuchungen an Mäusen haben gezeigt, dass naive T-Zellen teilweise nicht effizient auf die Stimulation mit Tumorantigenen reagieren und somit nicht aktiviert werden, was eine mögliche Erklärung der vergleichsweise hohen naiven T-Zellfrequenzen liefern könnte.⁶² Darüberhinaus wurde nach verlängerter in vitro Kultivierung eine Reexpression von CD45RA auf zuvor CD45RA⁻ Gedächtnis- T-Zellen beobachtet.⁵⁶

Im Weiteren wurde die prozentuale Verteilung der Effektor- und Gedächtnis T-Zellen in Abhängigkeit vom Tumorstadium untersucht. Man kann zwei Gruppen von CD8⁺ Gedächtnis T-Zellen unterscheiden: Effektor-Gedächtnis T-Zellen (CD45RA⁻ CCR7⁻) und Zentral-Gedächtnis T-Zellen (CD45RA⁻ CCR7⁺). Effektor-Gedächtnis T-Zellen besitzen die Fähigkeit in peripheres Gewebe einzuwandern und dort, durch die Produktion von Zytokinen wie IFN- γ und die Ausschüttung von Perforin, eine rasche Immunreaktion auszulösen. Ein gewisser Anteil der Effektor-Gedächtnis CD8⁺ T-Zellen exprimiert das Oberflächenmolekül CD45RA. Diese Effektor-Gedächtnis-RA⁺ T-Zellen (CD45RA⁺ CCR7⁻) zeigen die höchste Perforinproduktion. Zentral-Gedächtnis T-Zellen besitzen durch die Expression des Oberflächenmoleküles CCR7 die Fähigkeit in Lymphknoten einzuwandern. Im Vergleich zu naiven T-Zellen gewährleisteten sie eine schnellere Immunantwort bei erneuter Antigenpräsentation, da sie sensitiver gegenüber einer Antigenstimulation und unabhängiger von kostimulatorischen Faktoren sind.^{51,59}

Die durchflusszytometrische Analyse der Zentral-Gedächtnis CD8⁺ T-Zellen ergab einen relativ geringen Prozentsatz dieser Subpopulation in allen Tumorstadien. Dieses Ergebnis wäre mit der Annahme eines linearen Entwicklungs- und Differenzierungsweges der CD8⁺ zytotoxischen T-Zellen vereinbar. Nach diesem Ansatz entwickeln sich aus naiven T-Zellen infolge einer Antigenexposition Effektor T-

Zellen, welche erst nach erfolgter Abwehrreaktion mit Rückgang der Antigenpräsentation in lang lebende Gedächtniszellen übergehen.⁴⁸

Die Analyse der Population der Melan-A spezifischen CD45RA⁻ CCR7⁻ CD8⁺ T-Zellen zeigte vergleichsweise hohe Frequenzen in den Tumorstadien 2, 3 und 4. Die Frequenz der Population war im Tumorstadium 1 gegenüber allen anderen Stadien statistisch signifikant erniedrigt. Hier könnte als mögliche Ursache wiederum angeführt werden, dass im Tumorstadium 1 aufgrund einer ineffektiveren Antigenstimulation und geringeren Expositionsdauer gegenüber dem Tumorantigen in Verbindung mit einer defizitären Zytokinstimulation erst ein geringerer Anteil der naiven T-Zellen in einen Effektorphänotyp übergegangen ist.³⁸ Die Detektion vergleichsweise hoher Frequenzen Melan-A spezifischer Effektor-Gedächtnis T-Zellen in den fortgeschrittenen Tumorstadien stimmt mit den Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen überein, welche bei Melanompatienten im Tumorstadium 3 und 4 einen hohen Anteil Melan-A spezifischer Effektor-Gedächtnis T-Zellen nachgewiesen haben.^{19,20}

Die FACS-Analyse der Effektor Gedächtnis RA⁺ T-Zellen ergab in allen Tumorstadien vergleichsweise sehr hohe Zellfrequenzen, ohne Nachweis eines statistisch signifikanten Unterschieds im Bezug auf die Tumorstadien. Dieses Ergebnis spricht für ein effektives Priming durch das Tumorantigen mit dem Ziel einer körpereigenen Tumorabwehr von Beginn der Erkrankung an. Die Detektion hoher Frequenzen Melan-A spezifischer CD45RA⁺ CCR7⁻ CD8⁺ T-Zellen bei Melanompatienten deckt sich mit den Ergebnissen einer anderen Arbeitsgruppe, welche bei der Untersuchung von Melanompatienten in den fortgeschrittenen Tumorstadien 3 und 4 einen hohen Anteil Melan-A spezifischer CD45RA⁺ CCR7⁻ CD8⁺ T-Zellen nachgewiesen haben. Diese Zellen zeigten *ex vivo* als Reaktion auf Antigen präsentierende Tumorzellen eine ausgeprägte IFN- γ Produktion, welche im Sinne einer tumorspezifischen Immunreaktion zu werten ist.⁷⁰ Ein interessanter Aspekt wäre es, die Fähigkeit der IFN- γ Produktion der Effektor-Gedächtnis-RA⁺ T-Zellen tumorstadienassoziiert zu untersuchen, um festzustellen, ob bei vergleichbarer Frequenz in den Tumorstadien ein stadienabhängiger Unterschied in der Aktivität und Effektivität der Effektorzellen zu erkennen ist.

3.3 Charakterisierung der peripheren PD-1⁺ Melan-A spezifischen CD8⁺ T-Zellen von Melanompatienten in Abhängigkeit vom Tumorstadium

Die Diskrepanz zwischen nachweisbar erhöhten Frequenzen Melan-A spezifischer T-Zellen bei Patienten mit malignem Melanom^{4,25,63} und der geringen klinischen Ansprechrate der Tumorpatienten^{28,54,77} wird auf verschiedene, die T-Zell Funktion inhibierende Mechanismen zurückgeführt. Von besonderer Bedeutung für die Entstehung einer Tumormunität bei Patienten mit malignem Melanom scheint hierbei der PD-1/PD-L1 Signalweg zu sein.^{11,29,31,74} Aus diesem Grund wurde der prozentuale Anteil PD-1 exprimierender Melan-A spezifischer CD8⁺ T-Zellen und deren Subtypen tumorstadienabhängig bestimmt und mit dem prozentualen Anteil PD-1 exprimierender CD8⁺ T-Zellen und deren Subtypen korreliert. In dieser Gegenüberstellung zeigte die Population der tumorantigenspezifischen CD8⁺ T-Zellen in allen Tumorstadien eine deutlich höhere, teilweise statistisch signifikante, prozentuale PD-1 Expressionsrate. Auch die Korrelation der Phänotypen ergab fast durchwegs höhere PD-1 Expressionsraten der Melan-A spezifischen CD8⁺ T-Zellen im Vergleich zu den CD8⁺ T-Zellen. Von besonderer Bedeutung ist, dass ein statistisch signifikant höherer prozentualer Anteil PD-1 exprimierender Melan-A spezifischer CD8⁺ T-Zellen in den fortgeschrittenen Tumorstadien 3 und 4 im Vergleich zu den Tumorstadien 1 und 2 nachgewiesen wurde. Unter Berücksichtigung des bereits nachgewiesenen Frequenzanstiegs von Melan-A spezifischen zytotoxischen T-Zellen in den fortgeschrittenen Tumorstadien deutet dieses Ergebnis darauf hin, dass eine verstärkte tumorspezifische Immunreaktion auch zu einer verstärkten Rekrutierung des T-Zell inhibierenden Rezeptors PD-1 der tumorantigenspezifischen T-Zellen führt. Die These wird dadurch gestützt, dass im Gegenteil zur Population der tumorantigenspezifischen PD-1⁺ CD8⁺ T-Zellen die Population aller CD8⁺ T-Zellen keine tumorstadienabhängige Veränderung der PD-1 Expressionsrate zeigte.

Ahmdamazeh et al. haben ebenfalls bei Patienten mit metastasiertem Melanom ex vivo PD-1⁺ Melan-A spezifische CD8⁺ T-Zellen nachgewiesen, der Mittelwert lag hier jedoch deutlich unter dem in dieser Arbeit ermittelten Mittelwert für diese Zellpopulation.² Es gilt hierbei zu beachten, dass sich deren Ergebnisse auf ein Patientenkollektiv von lediglich 3 Patienten stützen, während in dieser Arbeit periphere Zellen von 31 Patienten mit malignem Melanom im metastasierten Stadium analysiert

wurden. Darüberhinaus hat diese Arbeitsgruppe eine deutlich höhere prozentuale PD-1 Expression der tumorinfiltrierenden Melan-A spezifischen CD8⁺ T-Zellen im Vergleich zu den peripheren Melan-A spezifischen CD8⁺ T-Zellen nachgewiesen. Beide Zellpopulationen zeigten starke Einschränkungen in der Fähigkeit der IFN- γ Produktion, wobei das Funktionsdefizit der tumorinfiltrierenden Zellen korrespondierend zu der höheren PD-1 Expression stärker ausgeprägt war. In Übertragung auf die Ergebnisse dieser Arbeit wäre, dem Ausmaß der PD-1 Expression folgend, in den fortgeschrittenen Tumorstadien 3 und 4 somit eine deutlich stärkere Funktionseinschränkung der PD-1⁺ Melan-A spezifischen CD8⁺ T-Zellen als in den frühen Tumorstadien 1 und 2 zu erwarten. Dies wäre auch mit der schlechten Prognose in den metastasierten Tumorstadien des malignen Melanoms vereinbar. Desweiteren haben Ahmdamazeh et al., analog zu dieser Arbeit, bei 14 Patienten mit metastasiertem Melanom vergleichbar niedrige Frequenzen PD-1⁺ CD8⁺ T-Zellen nachgewiesen, was nochmals die These unterstützt, dass es gezielt auf den tumorantigen-spezifischen T-Zellen zu einer PD-1 Hochregulierung kommt.²

4. Zusammenfassung

Die Diskrepanz zwischen nachweisbar erhöhten Frequenzen Melan-A spezifischer T-Zellen bei Patienten mit malignem Melanom^{4,25,63} und der geringen klinischen Ansprechrate der Tumorpatienten^{28,54,77} wird auf verschiedene, die T-Zell Funktion inhibierende Mechanismen zurückgeführt. Von besonderer Bedeutung für die Entstehung einer Tumormunität bei Patienten mit malignem Melanom scheint hierbei der PD-1/PD-L1 Signalweg zu sein.^{11,29,31,74}

Vor diesem Hintergrund wurden in dieser Arbeit, die peripheren mononukleären Zellen von 100 HLA-A2⁺ Melanompatienten in allen 4 Tumorstadien *ex vivo* durchflusszytometrisch auf die Expression von Melan-A untersucht und mit Hilfe der Oberflächenmarker CCR7 und CD45RA phänotypisiert. Darüberhinaus erfolgte eine durchflusszytometrische Analyse der Melan-A spezifischen CD8⁺ T-Zellen und deren Subtypen hinsichtlich ihrer prozentualen PD-1 Expression. Alle Ergebnisse wurden mit den ermittelten Frequenzen für die Population der PD-1⁺ CD8⁺ T-Zellen verglichen und mit dem Tumorstadium korreliert.

Die Analysen zeigten einen statistisch signifikanten Frequenzanstieg der Melan-A spezifischen CD8⁺ T-Zellen in den Tumorstadien 3 und 4 im Vergleich zu den Tumorstadien 1 und 2, was für eine verstärkte antigenspezifische Immunantwort bei Übergang von den lokalen zu den metastasierten Tumorstadien spricht. Ein sehr großer Anteil der Melan-A spezifischen CD8⁺ T-Zellen war hierbei in allen Tumorstadien dem Phänotyp der aktivierten Effektor-Gedächtnis RA⁺ T-Zellen zuzuordnen. Darüberhinaus wurde bei den Melan-A spezifischen CD8⁺ T-Zellen in den metastasierten Tumorstadien 3 und 4 im Vergleich zu den lokalen Stadien 1 und 2 eine statistisch signifikant höhere prozentuale PD-1 Expressionsrate nachgewiesen. Von besonderem Interesse ist in diesem Zusammenhang, dass die Population aller CD8⁺ T-Zellen im Vergleich zur Population der tumorantigenspezifischen CD8⁺ T-Zellen keine tumorstadienabhängige Veränderung der PD-1 Expressionsrate zeigte. Diese Ergebnisse sprechen dafür, dass eine verstärkte tumorspezifische Immunreaktion auch zu einer verstärkten Rekrutierung des T-Zell inhibierenden Rezeptors PD-1 der tumorantigenspezifischen T-Zellen führt, was eine der Ursachen für die Diskrepanz zwischen nachweisbar erhöhten Frequenzen Melan-A spezifischer T-Zellen und der geringen klinischen Ansprechrate bei Patienten mit malignem Melanom darstellen

könnte^{4,25,28,54,63,77} und somit einen wichtigen Hinweis für zukünftige immuntherapeutische Strategien liefert.

5. Material und Methoden

5.1. Patientenkollektiv

In dieser Arbeit wurden PBMCs (peripheral blood mononuclear cells) von insgesamt 100 HLA-A2⁺ Patienten mit unterschiedlichen histopathologischen Subtypen des malignen Melanoms der Haut in unterschiedlichen Tumorstadien untersucht, die sich im Zeitraum von 2001 bis 2007 an der Klinik für Dermatologie und Allergologie am Biederstein und der III. Medizinischen Klinik des Klinikum rechts der Isar München in Behandlung befanden. Mit Einwilligung der Patienten wurde diesen jeweils 50 ml peripheres Blut entnommen. Aus diesem Blut wurden die mononukleären Zellen isoliert, eingefroren und später analysiert.

Die histopathologische Klassifizierung der Melanome der 100 Patienten basiert auf den von Clark et al. sowie Arrington et al. etablierten Subtypen des kutanen malignen Melanoms.^{6,16} Die Zuteilung der Patienten zu den Tumorstadien erfolgte nach der Tabelle 12 und 13 zu entnehmenden TNM-Klassifikation und Stadieneinteilung für das maligne Melanom des American Joint Committee on Cancer (AJCC).^{7,8}

<i>T-</i> <i>Klassifikation</i>	<i>Tumordicke</i>	<i>Ulzerationsstatus</i>
T1	≤ 1,0 mm	a: Ohne Ulzeration und Level II/III b: Mit Ulzeration oder Level IV/V
T2	1,01-2,0 mm	a: Ohne Ulzeration b: Mit Ulzeration
T3	2,01-4,0 mm	a: Ohne Ulzeration b: Mit Ulzeration
T4	> 4,0 mm	a: Ohne Ulzeration b: Mit Ulzeration
<i>N-</i> <i>Klassifikation</i>	<i>Anzahl metastasierter Lymphknoten</i>	<i>Art der LK-Metastasen</i>
N1	1 Knoten	a: Mikrometastase(n)* b: Makrometastase(n)**
N2	2-3 Knoten	a: Mikrometastase(n)* b: Makrometastase(n)** c: In-transit-Metastase(n)/Satellitenmetastase(n) ohne metastasierte Knoten

N3	4 oder mehrere Knoten oder zusammen- gewachsene Knoten oder In-transit- Metastase(n)/Satellitenmetastase(n) mit metastasierten Knoten	
M- Klassifikation	Lokalisation	Serum Laktatdehydrogenase
M1a	Entfernte Hautlokalisation, subkutan oder knotige Metastase(n)	Normal
M1b	Lungenmetastase(n)	Normal
M1c	Alle anderen viszerale Metastasen Jede Fernmetastase	Normal Erhöht

* Mikrometastasen: nach elektiver oder Sentinel-LK-Biopsie

** Makrometastasen: klinisch festgestellte LK-Metastasen durch therapeutische Lymphadenektomie bestätigt oder LK-Metastasen mit großer extrakapsulärer Ausdehnung

Tabelle 12: TNM-Klassifikation des malignen Melanoms [AJCC 2002]

Stadium	Klinische Stadieneinteilung			Pathologische Stadieneinteilung		
	T	N	M	T	N	M
0	Tis	N0	M0	Tis	N0	M0
IA	T1a	N0	M0	T1a	N0	M0
IB	T1b	N0	M0	T1b	N0	M0
	T2a	N0	M0	T2a	N0	M0
IIA	T2b	N0	M0	T2b	N0	M0
	T3a	N0	M0	T3a	N0	M0
IIB	T3b	N0	M0	T3b	N0	M0
	T4a	N0	M0	T4a	N0	M0
IIC	T4b	N0	M0	T4b	N0	M0
III*	Jedes T	N1 N2 N3	M0			
IIIA				T1-4a	N1a	M0
				T1-4a	N2a	M0
IIIB				T1-4b	N1a	M0
				T1-4b	N2a	M0
				T1-4a	N1b	M0
				T1-4a	N2b	M0
				T1-4a/b	N2c	M0
IIIC				T1-4b	N1b	M0
				T1-4b	N2b	M0
				Jedes T	N3	M0

IV	Jedes T	Jedes N	Jedes M1	Jedes T	Jedes N	Jedes M1
----	---------	---------	----------	---------	---------	----------

* bei der klinischen Stadieneinteilung gibt es keine Subgruppen für das Stadium III

Tabelle 13: Stadieneinteilung beim malignen Melanom [AJCC 2002]

Die Anzahl der Patientenproben in den einzelnen Tumorstadien verteilte sich wie folgt:

<i>Tumorstadium</i>	<i>Anzahl der untersuchten Patienten</i>
Stadium 1	44
Stadium 2	25
Stadium 3	19
Stadium 4	12
Gesamt	100

Tabelle 14: Verteilung der untersuchten Patienten auf die verschiedenen Tumorstadien

5.2 Material

5.2.1 Chemikalien und biogene Substanzen

AB-Serum	Valley Biomedical, Winchester, VA,
Ammoniumchlorid	Fluka, Deisenhofen
BSA, Fraktion V	Roth, Karlsruhe
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-AldrichChemie, Deisenhofen
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Fluka, Deisenhofen
Ficoll	Biochrom GmbH, Berlin
Glucose 40%	Braun, Maria Enzersdorf, Österreich
Heparin, Liquemin®	Roche, Grenzach-Whylen
Humanalbumin, 20% octalbin	Octapharma, Langenfeld
Kaliumbicarbonat	Sigma-AldrichChemie, Deisenhofen
Phosphat buffered saline (PBS), 10-fach, steril	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Propidiumiodid	Sigma-AldrichChemie, Deisenhofen
Trypanblau	Invitrogen GmbH, Karlsruhe

5.2.2 Standardlösungen und -puffer

Erythrozyten-Lyse-Puffer	8,3 g Ammoniumchlorid 1,0 g Kaliumbicarbonat 37 mg EDTA
Einfrier-Medium	20% DMSO 6% Glucose 20% HSA
FACS-Puffer	1% BSA in PBS
Phosphat buffered saline (PBS), 10-fach, steril	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
RPMI 1640, Zellkulturmedium	Invitrogen GmbH, Karlsruhe

5.2.3 Antikörper

Anti-human CD3 Pacific Blue (CD3-PB)	Dako, Glostrup, Dänemark
Anti-human CD8 APC	Dako, Glostrup, Dänemark
Anti-human CD8 PE A610	Caltag/Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Anti-human CD8 PE	Caltag/Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Anti-human CD8 PerCP	BDPharmingen, Franklin Lakes, USA
Anti-human CD45RA PE Cy7	BDPharmingen, Franklin Lakes, USA
Anti-human CCR7(CD197) Fitc	R&D Systems, Minneapolis, USA
Anti-human PD-1 APC	eBioscience, San Diego, USA
MelanAp26-35-Tetramer-PE	Prof. Dirk Busch, Mikrobiologie Klinikum rechts der Isar, München

5.2.4 Standardgeräte

Durchflusszytometer (CyAn ADP)	Dako, Glostrup, Dänemark
Kühlzentrifuge J2-HS	Beckman, Fullerton, USA
Kühlzentrifugen 5417R, 5810R	Eppendorf, Hamburg
Lichtmikroskop Axiovert 25	Zeiss, Jena
Neubauer-Zählkammer	Reichert, New York, USA
Sterile Werkbank, Hera safe KS15	Kendro, Langenselbold

Titertubes	BioRad, München
Vortex REAX-Top	Heidolph, Nürnberg
Wasserbad 1083	GFL, Burgwedel
Zentrifuge 5819R	Eppendorf AG, Hamburg
96-well-platten	TPP, St. Louis

5.3 Methoden

5.3.1 Isolierung von mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMCs)

Mononukleäre Zellen aus peripherem Blut wurden mittels einer Zwei-Phasen-Dichtegradientenzentrifugation mit Ficoll-Hypaque von den dichteren Granulozyten, Erythrozyten und toten Zellen getrennt.

15 ml heparinisiertes Spenderblut wurden hierfür in einem 50 ml Röhrchen 1:1 mit 1x PBS verdünnt und mit 15 ml Ficoll unterschichtet. Anschließend folgte eine Zentrifugation bei 887 x g (15 min, RT), die ungebremst auslief. Die Monozyten befanden sich mit den Lymphozyten in einem Interphasering zwischen den sedimentierten dichteren Zellen und einem Gemisch aus Plasma und PBS. Diese wurden vorsichtig mittels einer Pipette abgenommen und daraufhin zweimal mit 1x PBS gewaschen. Zum Entfernen eventuell noch vorhandener Erythrozyten erfolgte eine Inkubation in 5–10 ml Erythrozyten-Lyse-Puffer für 5 min. Zuletzt wurden die Zellen nochmals in 1x PBS gewaschen.

5.3.1.1 Bestimmung der Zellzahl

Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte in einer Neubauer-Zählkammer (Reichert, New York, USA). Dazu wurden 50 µl einer Zellsuspension im Verhältnis 1:2 mit einer 0,5%-igen Trypanlösung versetzt und im Mikroskop im von der Zählkammer vorgegebenen Raster gezählt. Da Trypanblau nur tote Zellen und Zelltrümmer anfärbt, können diese von intakten, vitalen Zellen unterschieden werden. Die Zellen in den vier vorgegebenen Quadranten wurden ausgezählt und die Zellkonzentration pro Millimeter ermittelt, indem die durchschnittliche Zellzahl pro Quadrat mit dem Verdünnungsfaktor 2 und dem Faktor 10^4 multipliziert wurde.

5.3.1.2 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Nach Bestimmung der Zellzahl wurden diese abzentrifugiert. Anschließend wurden bis zu 1×10^7 Zellen in 1 ml Einfriermedium aufgenommen und in Kryoröhrchen überführt. Die Kryoröhrchen wurden sofort in eine stufenweise abkühlende Einfrierbox gestellt und bei -80°C über Nacht eingefroren. Am nächsten Tag wurden sie in flüssigen Stickstoff überführt. Aufgetaut wurden die Zellen im 37°C Wasserbad. Nach dem Auftauen wurden die Zellen in 20 ml RPMI Medium plus 10% Serum aufgenommen und vor der durchflusszytometrischen Analyse nochmals gewaschen.

5.3.2 Durchflusszytometrische Zellanalysen („FACS-Analysen“)

Die FACS („fluorescence-activated cell sorting“)-Analyse bzw. Durchflusszytometrie ermöglicht die Analyse von Einzelzellen auf Grund ihrer Fluoreszenzeigenschaften bzw. ihrer Eigenschaft, Licht auf bestimmte Art zu streuen. Dabei passieren die in einer Lösung befindlichen, mit fluoreszenzkonjugierten Antikörpern gefärbten Zellen hydrodynamisch fokussiert nacheinander bzw. einzeln in einer lichtdurchlässigen Messzelle verschiedene analysierende Laserstrahlen. Der für die Analysen dieser Arbeit verwendete Durchflusszytometer CyAn ADP (Dako, Dänemark) verfügt über 3 unterschiedliche Laser, welche Laserstrahlen im Wellenlängenbereich von 405 nm, 488 nm sowie 635 nm erzeugen. Die Streuung des Laserlichtes und das von den Fluoreszenzmolekülen emittierte Licht wird von photosensitiven Detektoren, sog. Photomultipliern, empfangen und somit Größe, Granularität und Fluoreszenz der Zellen quantifiziert und analysiert. Hierbei wird das in geringerem Winkel gestreute Licht ($3-10^\circ$) als Vorwärtsstreulicht (FCS) bezeichnet, das um 90° reflektierte Licht wird als Seitwärtsstreulicht gemessen. Während das Vorwärtsstreulicht mit der Zellgröße korreliert, lassen sich mittels des Seitwärtsstreulichtes Rückschlüsse auf die Granularität und Membranfaltung der Zelle ziehen. Durch Messung des Fluoreszenzlichtes können die Zellen auf eine Vielzahl von Merkmalen untersucht werden. Auf diese Weise können innerhalb kürzester Zeit Tausende von Zellen einer Zellpopulation auf die Expression bestimmter Oberflächenmoleküle untersucht werden.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden durchflusszytometrische Messungen auf verschiedene T-Zell-Oberflächenmoleküle sowie Analysen mit Multimerfärbungen („Tetramere“) zur

Bestimmung der Spezifität von CD8⁺ T-Zellen durchgeführt. Die zu untersuchenden Oberflächenantigene wurden direkt mit an entsprechende Antikörper gebundenen Fluoreszenzfarbstoffen markiert. Durch die Verwendung von in verschiedenen Wellenlängen fluoreszierenden Farbstoffen konnten mehrere verschiedene Oberflächenmarker gleichzeitig analysiert werden. Da die erfasste Fluoreszenzintensität der analysierten Zelle mit der Menge des gebundenen Fluorochroms korreliert, lassen sich auch Rückschlüsse auf die relative Expressionsstärke des zu untersuchenden Antigens ziehen.

Die verwendeten Fluorochrome sowie deren Emissionsspektren sind Tabelle 15 zu entnehmen. Bei jeder Analyse wurden so 5×10^5 – 1×10^6 Zellen auf 7 fluoreszente Parameter und 2 Streulichtparameter vermessen.

<i>Fluorochrome</i>	<i>Anregungsmaximum (nm)</i>	<i>Emissionsmaximum (nm)</i>
FITC (Fluoreszein Isothiocyanat)	495	520
PE (Phycoerythrin)	565	578
PE-A610 (Phycoerythrin Alexa 610)	565	627
PI (Propidiumjodid)	536	617
PerCP (Peridinin Chlorophyll Protein)	490	675
PE-Cy7 (Phycoerythrin-Cy7)	565	767
APC (Allophycocyanin)	650	660
PB (Pacific Blue)	400	447

Tabelle 15: Fluorochrome und deren Anregungs- und Emissionsmaxima

5.3.2.1 Durchflusszytometrischer Nachweis von Oberflächenmolekülen und MHC: Peptid-Multimerkomplexen

Für die FACS-Analysen wurden die zu analysierenden Zellen aufgetaut, zweimal mit FACS-Puffer gewaschen, gezählt und in einer Menge von 50µl FACS-Puffer pro 2×10^6 Zellen aufgenommen. Zur Tetramerfärbung wurden die Zellen mit dem relevanten Phycoerythrin(PE)-markierten MHC:Peptid-Tetramer im Verhältnis 1:25 in 50µl FACS-Puffer 20 min in einer 96-Loch-Rundbodenplatte auf Eis im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurden nochmals 50µl FACS-Puffer pro 2×10^6 Zellen hinzugefügt und

die Fluorochrom-gekoppelten Antikörper hinzugegeben (Antikörper und Konzentrationen siehe Tabelle 16). Nach einer nochmaligen Inkubationszeit von 25 min bei 4°C im Dunkeln, wurden die Zellen einmal mit 100µl FACS-Puffer gewaschen und hierauf in 100µl FACS-Puffer plus 2µg/ml Propidiumjodid aufgenommen. Die Färbung mit dem rotfluoreszierenden Propidiumjodid dient der Markierung der toten Zellen. Der Farbstoff dringt durch die defekte Zellmembran der toten Zellen ein und lagert sich in der DNA ein. Dadurch können in der darauffolgenden durchflusszytometrischen Messung die lebenden von den toten Zellen differenziert werden. Nach einer Inkubationszeit von 5 min auf Eis im Dunkeln wurden die Zellen nochmals zweimal mit FACS-Puffer gewaschen, in 300 µl FACS-Puffer aufgenommen und im Durchflusszytometer analysiert. Der eingesetzte multimere MHC:Peptid-Komplex (MelanAp26-35-Tetramer-PE) besteht aus je vier Einheiten von löslichen, Fluorochrom-gekoppelten MHC-Komplexen, an die jeweils ein immunogenes Peptid gebunden ist. T-Zellen lassen sich mit solchen Multimeren anfärben, wenn deren T-Zellrezeptor spezifisch gegen die Multimer-gebundenen Peptide gerichtet ist.

Antikörper	Konzentrationen
CD3 Pacific Blue	1 : 20
CD8 APC	1 : 50
CD8 PE A610	1: 50
CD8 PE	1 : 200
CD8 PerCP	1 : 20
CD45RA PE Cy7	1 : 50
CCR7 FITC	1 : 10
PD-1 APC	1 : 5
MelanAp26-35-Tetramer-PE	1 : 50

Tabelle 16: Verwendete Antikörper und eingesetzte Konzentration

5.3.2.2 Untersuchungsablauf und Kontrollen

Die durchflusszytometrischen Analysen der PBMC Patientenproben wurden alle nach einem festen Untersuchungsprotokoll durchgeführt.

5.3.2.2.1 Einzelfärbungen und Kompensation

Die Emissionsspektren der verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffe zeigen zum Teil starke Überschneidungen. Die Färbung von PBMCs mit jeweils nur einem der für die Analyse des Patientenmaterials verwendeten fluoreszenten Farbstoffe ermöglichte eine Determinierung der spektralen Überlappungen und somit eine Kompensation der Überschneidungen. Mit Hilfe einer ungefärbten Probe wurden die Detektoren entsprechend der Eigenfluoreszenz der Zellen angepasst. Alle Einzelfärbungen wurden mit PBMCs eines gesunden Spenders vor jeder Analyse von Patientenmaterial durchgeführt. Die verwendeten Einzelfarben sind Tabelle 17 zu entnehmen. Um eine exakte Kompensation der Überlappungen gewährleisten zu können, müssen die fluoreszenten Antikörper eine ausreichend große Zellpopulation markieren. Aus diesem Grund wurden als Kompensationskontrolle bei den Einzelfärbungen im Vergleich zu der Patientenanalyse zum Teil unterschiedliche Antikörper, jedoch identische Fluorochrome eingesetzt.

ungefärbt	CCR7 Fitc	CD8 PE	CD8 PE A610	CD8 PerCP	CD3 PB	CD45RAP ECy7	CD8 APC
-----------	--------------	-----------	----------------	--------------	-----------	-----------------	------------

Tabelle 17: Einzelfärbungen: Fluorochrome und Antikörper

5.3.2.2.2 FMO-Kontrollen

Um die Grenze zwischen Positivität und Negativität eines bestimmten fluoreszenten Antikörpers genau festlegen zu können, wurden vor jeder Analyse von Patientenmaterial mittels PBMCs des gesunden Donors FMO (Fluorescence minus one) Kontrollen durchgeführt. Bei dieser Spezifitätskontrolle werden die Zellen mit allen außer einem der für die Patientenanalyse relevanten Antikörper angefärbt. Durch den Vergleich der Färbung mit dem bzw. ohne den relevanten Antikörper können unspezifische Hintergrundfärbungen erkannt werden und die Analysefenster dementsprechend angepasst werden. In Tabelle 18 sind alle eingesetzten FMO-Kontrollen aufgeführt.

Aufgrund der begrenzten Menge an zur Verfügung stehenden Patienten PBMCs, wurde bei der Analyse des Patientenmaterials nur eine FMO-Kontrolle mit bzw. ohne Melan-A durchgeführt (Tabelle 19).

alle* außer CCR7 Fitc	alle* außer MelanAp26-35- Tetramer-PE	alle* außer CD45RA PE Cy7	alle* außer PD-1 APC
--------------------------	---	------------------------------	-------------------------

*alle = CCR7 Fitc, MelanAp26-35-Tetramer PE, CD8 PerCP, CD3 PB, CD45RA PE Cy7, PD-1 APC

Tabelle 18: FMO-Kontrollen gesunder Donor

Alle	alle* außer MelanAp26-35- Tetramer-PE
------	---

*alle = CCR7 Fitc, MelanAp26-35-Tetramer PE, CD8 PerCP, CD3 PB, CD45RA PE Cy7, PD-1 APC

Tabelle 19: FMO-Kontrollen Patientenmaterial

5.3.2.2.4 Kontrolle Melan-A Tetramer

Um die Funktionsfähigkeit des verwendeten PE gekoppelten MelanAp26-35-Tetramer sicherzustellen, wurde vor jeder Analyse von Patientenmaterial eine Melan-A Testfärbung mit Hilfe eines Melan-A spezifischen T-Zellklons durchgeführt. Dieser Klon wurde zuvor mit Melan-A negativen PBMCs des gesunden Donors gemischt, so dass er eine Melan-A Spezifität von 5% aufwies. Auf diese Weise konnte jeglicher Funktionsverlust des MelanAp26-35-Tetramer-PE erkannt werden und falsch negative Ergebnissen der Melan-A Spezifität der Patientenzellen vorgebeugt werden.

5.3.3 Auswertung der durchflusszytometrischen Daten

Die Messergebnisse der Durchflusszytometrie wurden mittels des *Flowjo 6.4.7* Programmes ausgewertet. Hierbei wurden die Messereignisse der einzelnen Proben in zweidimensionalen Punktfeld-Analyse-Graphen, sog. „DotPlots“, gegeneinander

aufgetragen und die Frequenzen der einzelnen Zellpopulationen einer Probe mit Hilfe von Analysefenstern bestimmt.

Abbildung 12 zeigt schematisch die für diese Arbeit etablierte Auswertungsstrategie der durchflusszytometrischen Daten.

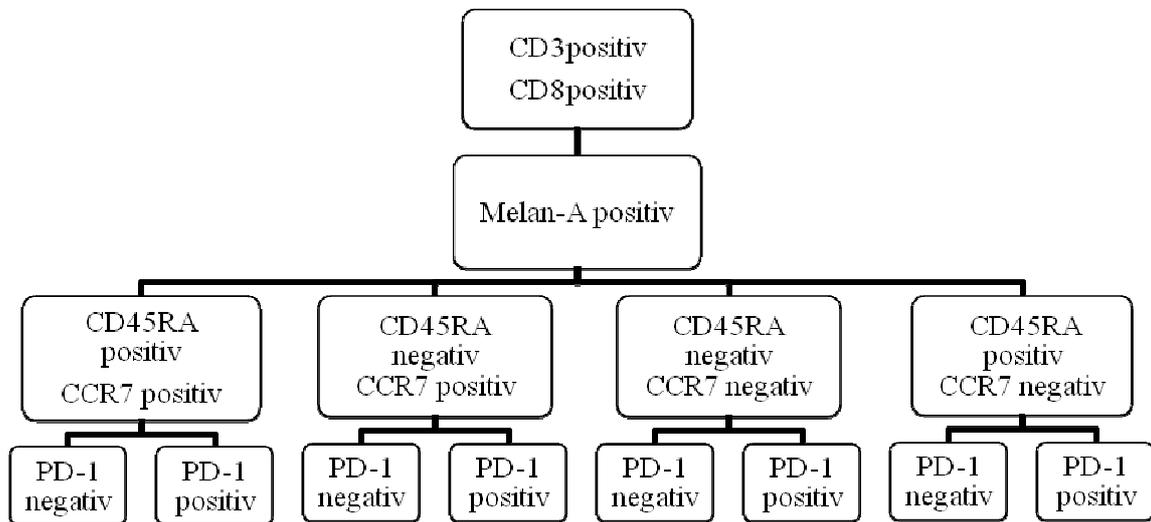


Abb. 12: Schematische Darstellung der Analyse der durchflusszytometrischen Daten

Analog zu der Auswertung der Melan-A spezifischen CD8⁺ T-Zellen wurde die Analyse auch auf Ebene aller CD8⁺ T-Zellen durchgeführt. Grundsätzlich wurden auf jeder Analyseebene alle Patienten eines Tumorstadiums analysiert und ausgewertet. Patienten, die auf einer Analyseebene das untersuchte Merkmal jedoch nicht aufwiesen, wurden in der darauffolgenden Ebene nicht mehr in die statistische Datenauswertung mit einbezogen, um eine Verfälschung der Ergebnisse zu vermeiden. Dadurch können zwischen den verschiedenen Zellpopulationen Differenzen in der Anzahl der analysierten Patienten in den einzelnen Tumorstadien resultieren.

In Abbildung 13 wird das entwickelte Auswertungsschema nochmals an den Ergebnissen eines analysierten Patienten im Tumorstadium 4 verdeutlicht.

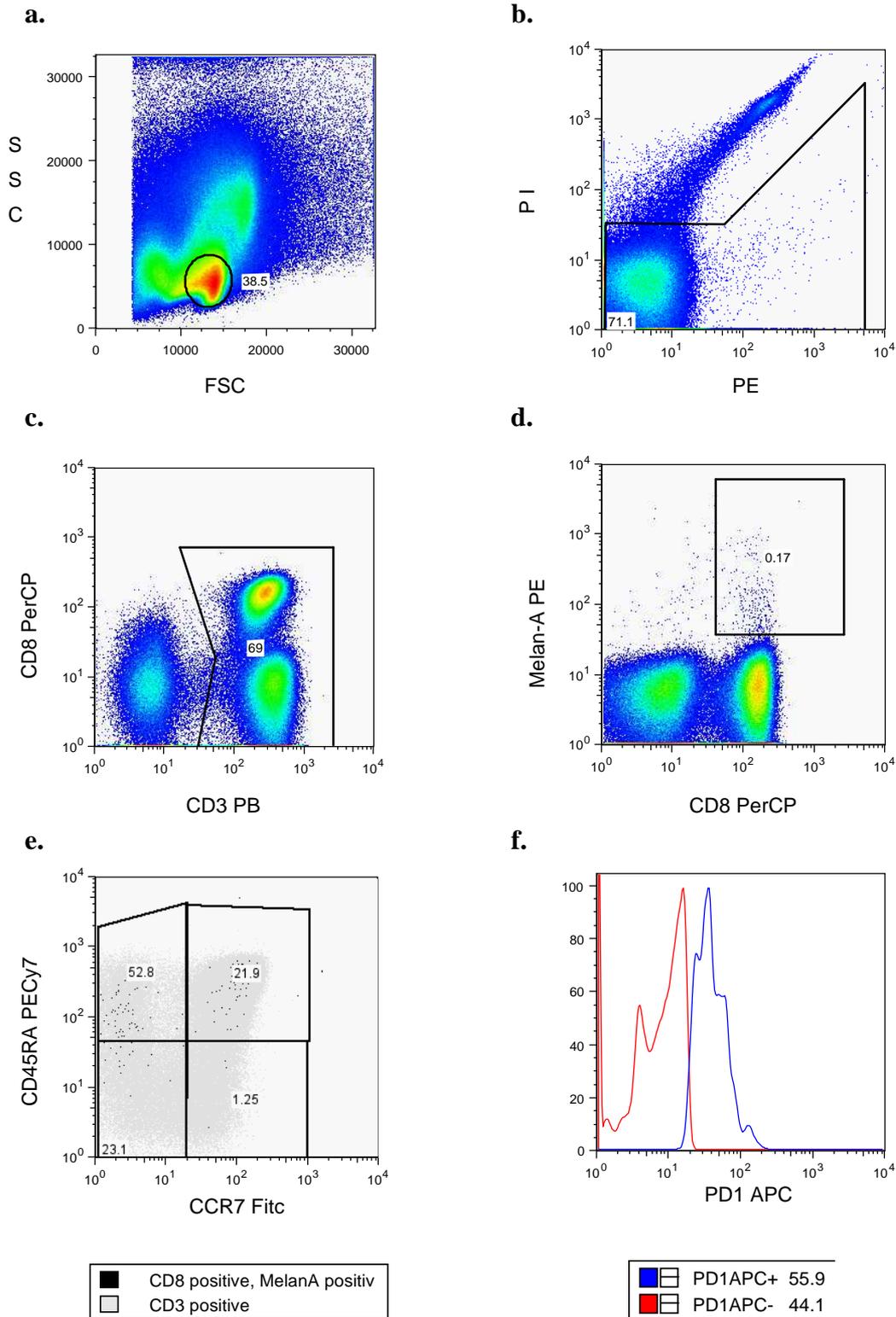


Abb. 13: Graphische Darstellung der Analyse der durchflusszytometrischen Daten. a Lymphozyten (38,3%). b lebende Lymphozyten (71,1%). c CD3⁺ Lymphozyten (69%). d Melan –A spezifische CD8⁺ T-Zellen (0.17%). e Phänotypen der Melan-A spezifischen CD8⁺ T-Zellen: naive (21,9%), Zentral-Gedächtnis (1,25%), Effektor-Gedächtnis (23,1%) und Effektor Gedächtnis-RA⁺ (52,8%). f PD-1 Positivität der Melan-A spezifischen CD8⁺ T-Zellen: PD-1 positiv (55,9%), PD-1 negativ (44,1%).

Nachdem anhand von Größe- und Granularitätseigenschaften der Zellen die Lymphozyten markiert wurden (Abb. 13 a), konnten mit Hilfe der Propidiumjodid Färbung die lebenden von den toten Lymphozyten getrennt werden (Abb. 13 b). Anschließend wurden die zytotoxischen T-Zellen innerhalb der Lymphozytenpopulation durch ihre Expression von CD3 und CD8 identifiziert (Abb. 13 c). Innerhalb dieser Subpopulation wurden die Melan-A spezifischen zytotoxischen T-Zellen ausgewählt (Abb. 13 d) und darauffolgend bezüglich der Expression von CCR7, CD45RA sowie PD-1 analysiert (Abb. 13 e und f). Somit konnte die prozentuale Verteilung der Melan-A spezifischen zytotoxischen T-Zellen auf die verschiedenen T-Zell Subpopulationen gezeigt werden: naive T-Zellen ($CCR7^+ CD45RA^+$), Zentral-Gedächtnis-T-Zellen ($CCR7^+ CD45RA^-$), Effektor- Gedächtnis-T-Zellen ($CCR7^- CD45RA^-$) sowie Effektor-Gedächtnis- RA^+ T-Zellen ($CCR7^- CD45RA^+$). Desweiteren wurden sowohl die Population der Melan-A spezifischen $CD3^+ CD8^+$ T-Zellen als auch deren Untergruppen auf PD-1 Expression hin bestimmt. Das Auswertungsschema wurde analog auf Ebene der $CD8^+$ T-Zellen angewandt.

5.3.4 Statistische Analyse

Die statistische Analyse der Daten erfolgte mit Hilfe von *SPSS 15.0 für Windows*. Hierbei wurde mit dem Kolmogorow-Smirnow Test mit Lilliefors-Korrektur auf Normalverteilung getestet. Da die Daten größtenteils keine Abweichung der Normalverteilung zeigten, wurde eine einfaktorielle Varianzanalyse durchgeführt. P-Werte unter 5% wurden als statistisch signifikant beurteilt. Als Post-hoc Test wurde der Fisher's LSD-Test angewendet. Die Abbildungen wurden mittels Mittelwert \pm 1 Standardfehler erstellt.

Literaturverzeichnis

1. Aarntzen EHJG, Figdor CG, Adema GJ, Punt CJA, de Vries IJM. Dendritic cell vaccination and immune monitoring. 2008; *Cancer Immunol Immunother* 57: 1559-1568
2. Ahmadzadeh M., Johnson LA, Heemskerk B, Wunderlich JR, Dudley ME, White DE, Rosenberg SA. Tumor antigen-specific CD8 T cells infiltrating the tumor express high levels of PD-1 and are functionally impaired. 2009; *Blood* 114: 1537-1544
3. Allison JP. CD28-B7 interactions in T-cell activation. 1994; *Curr Opin Immunol* 6:414-419
4. Anichini A, Molla A, Mortarini R, Tragni G, Bersani I, Di Nicola M, Gianni AM, Pilotti S, Dunbar R, Cerundolo V, Parmiani G. An expanded peripheral T cell population to a cytotoxic T lymphocyte (CTL)-defined, melanocyte-specific antigen in metastatic melanoma patients impacts on generation of peptide-specific CTLs but does not overcome tumor escape from immune surveillance in metastatic lesions. 1999; *J Exp Med* 190: 651-667
5. Appay V, Jandus C, Voelter V, Reynard S, Coupland SE, Rimoldi D, Lienard D, Guillaume P, Krieg AM, Cerottini JC, Romero P, Leyvraz S, Rufer N, Speiser DE. New generation vaccine induces effective melanoma-specific CD8+ T cells in the circulation but not in the tumor site. 2006; *J Immunol* 177:1670-1678
6. Arrington JH, Reed RJ, Ichinose H, Kremenz ET. Plantar lentiginous melanoma: A distinctive variant of human cutaneous malignant melanoma 1977; *J Am Surg Pathol* 1(2):131-143
7. Balch CM, Buzaid AC, Soong SJ, Atkins MB, Cascinelli N, Coit DG, Fleming ID, Gershenwald JE, Houghton AJ, Kirkwood JM, McMasters KM, Mihm MF, Morton DL, Reintgen DS, Ross MI, Sober A, Thompson JA, Thompson JF. Final version of the American Joint Committee on Cancer staging system for cutaneous melanoma. 2001a; *J Clin Oncol* 19: 3635-3648
8. Balch CM, Soong SJ, Gershenwald JE, Thompson JF, Reintgen DS, Cascinelli N, Urist M, McMasters KM, Ross MI, Kirkwood JM, Atkins MB, Thompson JA, Coit DG, Byrd D, Desmond R, Zhang Y, Liu PY, Lyman GH, Morabito A. Prognostic factors analysis of 17,600 melanoma patients: validation of the American Joint

- Committee on Cancer melanoma staging system. 2001b; *J Clin Oncol* 19: 3622-3634
9. Banchereau J, Steinmann RM. Dendritic cells and the control of immunity. 1998; *Nature* 392: 245-252
 10. Barber DL, Wherry EJ, Masopust D, Zhu B, Allison JP, Sharpe AH, Freeman GJ, Ahmed R. Restoring function in exhausted CD-8 T-cells during chronic viral infection. 2006; *Nature* 439: 682-687
 11. Blank C, Kuball J, Voelkl S, Wiendl H, Becker B, Walter B, Majdic O, Gajewski TF, Theobald M, Andreesen R, Mackensen A. Blockade of PD-L1 (B7-H1) augments human tumor-specific T cell responses in vitro. 2006; *Int J Cancer* 119: 317-327
 12. Boni C, Fusicaro P, Valdatta C, Amadei B, Di Vincenzo P, Giuberti T, Laccabue D, Zerbini A, Cavalli A, Missale G, Bertoletti A, Ferrari C. Characterization of Hepatitis B Virus (HBV)- specific T-cell dysfunction in chronic HBV infection. 2007; *J Virol* 81: 4215-4225
 13. Boon T, Coulie PG, Van den Eynde B. Tumor antigens recognized by T cells. 1997; *Immunol Today* 18:267-268
 14. Brown IE, Blank C, Kine J, Kacha AK, Gajewski TF. Homeostatic proliferation as an isolated variable reverses CD8⁺ T cell anergy and promotes tumor rejection. 2006; *J Immunol* 177:4521-4529
 15. Clark R, Kupper T. Old meets new: The interaction between innate and adaptive immune system. 2005; *J Invest Dermatol* 125: 629-637
 16. Clark WH, From L, Bernardino EA, Mihm MC. The histogenesis and biologic behavior of primary human malignant melanoma of the skin. 1969; *Cancer Res* 29: 705-726
 17. Denfeld RW, Dietrich A, Wuttig C, Tanczos E, Weiss JM, Vanscheidt W, Schopf E, Simon JC. In situ expression of B7 and CD28 receptor families in human malignant melanoma: relevance for T-cell-mediated anti-tumor immunity. 1995; *Int J Cancer* 62:259-265
 18. Dong H, Strome SE, Salomao DR, Tamura H, Hirano F, Flies DB, Roche PC, Lu J, Zhu G, Tamada K, Lennon VA, Celis E, Chen L. Tumor-associated B7-H1 promotes T-cell apoptosis: a potential mechanism of immune evasion. 2002; *Nature Med* 8: 793-800

19. D'Souza S, Rimoldi D, Liénard D, Lejeune F, Cerottini JC, Romero P. Circulating Melan-A/Mart-1 specific cytolytic T lymphocyte precursors in HLA-A2+ melanoma patients have a memory phenotype. 1998; *Int J Cancer* 78: 699-706
20. Dunbar PR, Smith CL, Chao D, Salio M, Shepherd D, Mirza F, Lipp M, Lanzavecchia A, Sallusto F, Evans A, Russell-Jones R, Harris AL, Cerundolo V. A shift in the phenotype of melan-A-specific CTL identifies melanoma patients with an active tumor-specific immune response. 2000; *J Immunol* 165: 6644-6652
21. Fang L, Lonsdorf AS, Hwang ST. Immunotherapy for advanced Melanoma. 2008; *J Invest Dermatol* 128:2596-2605
22. Fields P, Fitch FW, Gajewski TF. Control of T lymphocyte signal transduction through clonal anergy. 1996; *J Mol Med* 74:673-683
23. Freeman GJ, Long AJ, Iwai Y, Bourque K, Chernova T, Nishimura H, Fitz LJ, Malenkovich N, Okazaki T, Byrne MC, Horton HF, Fouser L, Carter L, Ling V, Bowman MR, Carreno BM, Collins M, Wood CR, Honjo T. Engagement of the PD-1 immunoinhibitory receptor by a novel B7 family member leads to negative regulation of lymphocyte activation. 2000; *J Exp Med* 192: 1027-1034
24. Ghebeh H, Mohammed S, Al-Omair A, Qattan A, Lehe C, Al-Qudaihi G, Elkum N, Alshabanah M, Bin Amer S, Tulbah A, Ajarim D, Al-Tweigeri T, Dermime S. 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. 2006; *Neoplasia* 8: 190-198
25. Griffioen M, Borghi M, Schrier PI, Osanto S. Detection and Quantification of CD8+ T cells specific for HLA-A*0201-binding melanoma and viral peptides by the IFN γ Ellispot. 2001; *Int J Cancer* 93: 549-555
26. Guleria I, Khosroshahi A, Ansari MJ, Habicht A, Azuma M, Yagita H, Noelle RJ, Coyle A, Mellor AL, Khoury SJ, Sayegh MH. A critical role for the programmed death ligand 1 in fetomaternal tolerance. 2005; *J Exp Med* 202: 231-237
27. Hamanishi J, Mandai M, Iwasaki M, Okazaki T, Tanaka Y, Yamaguchi K, Higuchi T, Yagi H, Takakura K, Minato N, Honjo T, Fujii S. Programmed cell death 1 ligand 1 and tumor-infiltrating CD8+ T lymphocytes are prognostic factors of human ovarian cancer. 2007; *PNAS* 104: 3360-3365

28. Harlin H, Kuna TV, Peterson AC, Meng Y, Gajewski TF. Tumor progression despite massive influx of activated CD8(+) T cells in a patient with malignant melanoma ascites. 2006; *Cancer Immunol Immunother* 55:1185
29. Hirano F, Kaneko K, Tamura H, Dong H, Wang S, Ichikawa M, Rietz C, Flies DB, Lau JS, Zhu G, Tamada K, Chen L. Blockade of B7-H1 and PD-1 by monoclonal antibodies potentiates cancer therapeutic immunity. 2005; *Cancer Res* 65: 1089-1096
30. Ito T, Ueno T, Clarkson MR, Yuan X, Jurewicz MM, Yagita H, Azuma M, Sharpe AH, Auchincloss H Jr, Sayegh MH, Najafian N. Analysis of the role of negative T cell costimulatory pathways in CD4 and CD8 T cell-mediated alloimmune responses in vivo. 2005; *J Immunol* 174: 6648-6656
31. Iwai Y, Ishida M, Tanaka Y, Okazaki T, Honjo T, Minato N. Involvement of PD-L1 on tumor cells in the escape from host immune system and tumor immunotherapy by PD-L1 blockade. 2002; *PNAS* 99: 12293-12297
32. Iwai Y, Terawaki S, Ikegawa M, Okazaki T, Honjo T. PD-1 inhibits antiviral immunity at the effector phase in the liver. 2003; *J Exp Med* 198: 39-50
33. Jaeger E, Bernhard H, Romero P, Ringhoffer M, Arand M, Karbach J, Ilsemann C, Hagedorn M, Knuth A. Generation of cytotoxic T-cell responses with synthetic melanoma-associated peptides in vivo: implications for tumor vaccines with melanoma-associated antigens. 1996; *Int J Cancer* 66: 162-169
34. Jones E, Dahm-Vicker M, Simon AK, Green A, Powrie F, Cerundolo V, Gallimore A. Depletion of CD25+ regulatory cells results in suppression of melanoma growth and induction of autoreactivity in mice. 2002; *Cancer Immun* 2:2:1
35. Kaech SM, Wherry EJ, Ahmed R. Effector and memory T-cell differentiation: implications for vaccine development. 2002; *Nat Rev Immunol* 2: 251-262
36. Keilholz U. CTLA-4: Negative regulator of the immune response and a target of cancer therapy. 2008; *J Immunother* 31:431-439
37. Keir ME, Butte MJ, Freeman GJ, Sharpe AH. PD-1 and its ligands in tolerance and immunity. 2008; *Annu Rev Immunol* 26: 677-704
38. Lanzavecchia A, Sallusto F. Progressive differentiation and selection of the fittest in the immune response. 2002; *Nature Rev Immunol* 2: 982-987
39. Leach DR, Krummel MF, Allison JP. Enhancement of antitumor immunity by CTLA-4 blockade. 1996; *Science* 271:1734-1736

40. Lee PP, Yee C, Savage PA, Fong L, Brockstedt D, Weber JS, Johnson D, Swetter S, Thompson J, Greenberg PD, Roederer M, Davis MM. Characterization of circulating T cells specific for tumor-associated antigens in melanoma patients. 1999; *Nature Med* 5: 677-685
41. Li B, VanRoey M, Wang C, Chen TH, Korman A, Jooss K. Anti-programmed death-1 synergizes with granulocyte macrophage colony-stimulating factor--secreting tumor cell immunotherapy providing therapeutic benefit to mice with established tumors. 2009; *Clin Cancer Res* 15: 1623-1634
42. Loftus DJ, Squarcina P, Nielsen MB, Geisler C, Castelli C, Ødum N, Appella E, Parmiani G, Rivoltini L. Peptides Derived from Self-Proteins as Partial Agonists and Antagonists of Human CD8⁺ T-Cell Clones Reactive to Melanoma/Melanocyte Epitope MART1₂₇₋₃₅. 1998; *Cancer Res* 58: 2433-2439
43. Meidenbauer N, Marienhagen J, Laumer M, Vogl S, Heymann J, Andreesen R, Mackensen A. Survival and tumor localization of adoptively transferred Melan-A-specific T cells in melanoma patients. 2003; *J Immunol* 170:2161-2169
44. Munn DH, Sharma MD, Hou D, Baban B, Lee JR, Antonia SJ, Messina JL, Chandler P, Koni PA, Mellor AL. Expression of indoleamine 2,3-dioxygenase by plasmacytoid dendritic cells in tumor-draining lymph nodes. 2004; *J Clin Invest* 114:280-290
45. Nishimura H, Okazaki T, Tanaka Y, Nakatani K, Hara M, Matsumori A, Sasayama S, Mizoguchi A, Hiai H, Minato N, Honjo T. Autoimmune dilated cardiomyopathy in PD-1-receptor deficient mice. 2001; *Science* 291: 319-322
46. Ohigashi Y, Sho M, Yamada Y, Tsurui Y, Hamada K, Ikeda N, Mizuno T, Yoriki R, Kashizuka H, Yane K, Tsushima F, Otsuki N, Yagita H, Azuma M, Nakajima Y. Clinical significance of programmed death-1 ligand-1 and programmed death-1 ligand-2 expression in human esophageal cancer. 2005; *Clin Cancer Res* 11: 2947-2953
47. Okazaki T, Honjo T. PD-1 and PD-1 ligands: from discovery to clinical application. 2007; *Int Immunol* 19: 813-824
48. Opferman JT, Ober BT, Ashton-Rickardt PG. Linear differentiation of cytotoxic effectors into memory T lymphocytes. 1999; *Science* 283: 1745-1748

49. Ozkaynak E, Wang L, Goodearl A, McDonald K, Qin S, O'Keefe T, Duong T, Smith T, Gutierrez-Ramos JC, Rottman JB, Coyle AJ, Hancock WW. Programmed death-1 targeting can promote allograft survival. 2002; *J Immunol* 169: 6546-6553
50. Peterson AC, Harlin H, Gajewski TF. Immunization with Melan-A peptide- pulsed peripheral blood mononuclear cells plus recombinant human interleukin-12 induces clinical activity and T-cell responses in advanced melanoma. 2003; *J Clin Oncol* 21:2342-2348
51. Pittet MJ, Valmori D, Dunbar PR, Speiser DE, Lienard D, Lejeune F, Fleischhauer K, Cerundolo V, Cerottini JC, Romero P. High frequencies of naïve Melan-A/MART-1-specific CD8⁺ T cells in a large proportion of human histocompatibility leukocyte Antigen (HLA)-A2 individuals. 1999; *J Exp Med* 190:705-715
52. Rivoltini L, Kawakami Y, Sakaguchi K, Southwood S, Sette A, Robbins PF, Marincola FM, Salgaller ML, Yannelli JR, Appella E. Induction of tumor-reactive CTL from peripheral blood and tumor- infiltrating lymphocytes of melanoma patients by in vitro stimulation with an immunodominant peptide of the human melanoma antigen MART-1. 1995; *J Immunol* 154: 2257-2265
53. Robbins PF, Kawakami Y. Human tumor antigens recognized by T cells. 1996; *Curr Opin Immunol* 8: 628-636
54. Rosenberg SA, Sherry RM, Morton KE, Scharfman WJ, Yang JC, Topalian SL, FvRoyal RE, Kammula U, Restifo NP, Hughes MS, Schwartzentruber D, Berman DM, Schwarz SL, Ngo LT, Mavroukakis SA, White DE, Steinberg SM. Tumor progression can occur despite the induction of very high levels of self/tumor antigen-specific CD8⁺ T cells in patients with melanoma. 2005; *J Immunol* 175: 6169-6176
55. Rosenberg SA, Yang JC, Schwartzentruber DJ, Hwu, P, Marincola FM, Topalian SL, Restifo NP, Dudley ME, Schwarz SL, Spiess PJ, Wunderlich JR, Parkhurst MR, Kawakami Y, Seipp CA, Einhorn JA, White DE. Immunologic and therapeutic evaluation of a synthetic peptide vaccine for the treatment of patients with metastatic melanoma. 1998; *Nat Med* 4:321-327
56. Rothstein DM, Yamada A, Schlossman SF, Morimoto C. Cyclic regulation of CD45 isoform expression in a long term human CD4⁺CD45RA⁺ T cell line. 1991; *J Immunol* 146: 1175-1183

57. Rufer N, Zippelius A, Batard P, Pittet MJ, Kurth I, Corthesy P, Cerottini JC, Leyvraz S, Roosnek E, Nabholz M, Romero P. Ex vivo characterization of human CD8⁺ T subsets with distinct replicative history and partial effector functions. 2003; *Blood* 102: 1779-1787
58. Sakaguchi S. Naturally arising Foxp3-expressing CD25⁺CD4⁺ regulatory T cells in immunological tolerance to self and non-self. 2005; *Nat Immunol* 6:345-352
59. Sallusto F, Geginat J, Lanzavecchia A. Central memory and effector memory T-cell subsets: Function, generation and maintenance. 2004; *Annu Rev Immunol* 22: 745-763
60. Sallusto F, Lenig D, Förster R, Lipp M, Lanzavecchia A. Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions. 1999; *Nature* 401: 708-712
61. Sharpe AH, Wherry EJ, Ahmed R, Freeman GJ. The function of programmed cell death 1 and its ligands in regulating autoimmunity and infection. 2007; *Nature Immunol* 8: 239-245
62. Speiser DE, Miranda R, Zakarian A, Bachmann MF, McKall-Faienza K, Odermatt B, Hanahan D, Zinkernagel RM, Ohashi PS. Self antigens expressed by solid tumors do not efficiently stimulate naive or activated T-cells: implications for immunotherapy. 1997; *J Exp Med* 186: 645-653
63. Speiser DE, Pittet MJ, Guillaume P, Lubenow N, Hoffman E, Cerottini JC, Romero P. Ex vivo analysis of human antigen-specific CD8⁺ T-cell responses: quality assessment of fluorescent HLA-A2 multimer and interferon-gamma ELISPOT assays for patient immune monitoring. 2004; *J Immunother* 27: 298-308
64. Thompson RH, Dong H, Lohse CM, Leibovich BC, Blute ML, Cheville JC, Kwon ED. PD-1 is expressed by tumor-infiltrating immune cells and is associated with poor outcome for patients with renal cell carcinoma. 2007; *Clin Cancer Res* 13: 1757-1761
65. Thompson RH, Kuntz SM, Leibovich BC, Dong H, Lohse CM, Webster WS, Sengupta S, Frank I, Parker AS, Zincke H, Blute ML, Sebo TJ, Cheville JC, Kwon ED. Tumor B7-H1 is associated with poor prognosis in renal cell carcinoma patients with long-term follow-up. 2006; *Cancer Res* 66: 3381-3385
66. Townsend SE, Allison J.P. Tumor rejection after direct costimulation of CD8⁺ T cells by B7-transfected melanoma cells. 1993; *Science* 259:368-370

67. Trautmann L, Janbazian L, Chomont N, Said EA, Gimmig S, Bessette B, Boulassel MR, Delwart E, Sepulveda H, Balderas RS, Routy JP, Haddad EK, Sekaly RP. Upregulation of PD-1 expression on HIV-specific CD8⁺ T cells leads to reversible immune dysfunction. 2006; *Nat Med* 12: 1198-1202
68. Urbani S, Amadei B, Tola D, Massari M, Schivazappa S, Missale G, Ferrari C. PD-1 expression in acute hepatitis C virus (HCV) infection is associated with HCV-specific CD8 exhaustion. 2006; *J Virol* 80: 11398-11403
69. Uyttenhove C, Pilotte L, Theate I, Stroobant V, Colau D, Parmentier N, Boon T, Van den Eynde BJ. Evidence for a tumoral immune resistance mechanism based on tryptophan degradation by indoleamine 2,3-dioxygenase. 2003; *Nat Med* 10:1269-127
70. Valmori D, Scheibenbogen C, Dutoit V, Nagorsen D, Asemissen AM, Rubio-Godoy V, Rimoldi D, Guillaume P, Romero P, Schadendorf D, Lipp M, Dietrich PY, Thiel E, Cerottini JC, Lienard D, Keilholz U. Circulating tumor-reactive CD8⁺ T cells in melanoma patients contain a CD45RA⁺ CCR7⁻ effector subset exerting ex vivo tumor-specific cytolytic activity. 2002; *Cancer Res* 62: 1743-1750
71. Viguier M, Lemaitre F, Verola O, Cho MS, Gorochov G, Dubertret L, Bachelez H, Kourilsky P, Ferradini L. Foxp3 expressing CD4⁺CD25^(high) regulatory T cells are overrepresented in human metastatic melanoma lymph nodes and inhibit the function of infiltrating T cells. 2004; *J Immunol* 173:1444-1453
72. Wang J, Yoshida T, Nakaki F, Hiai H, Okazaki T, Honjo T. Establishment of NOD-Pdcd1^{-/-} mice as an efficient animal model of type I diabetes. 2005; *PNAS* 102: 11823-11828
73. Wolchok JD, Saenger Y. The mechanism of anti-CTLA-4 activity and the negative regulation of t-cell activation. 2008; *The Oncologist* 13: 2-9
74. Wong RM, Scotland RR, Lau RL, Wang C, Korman AJ, Kast WM, Weber JS. Programmed death-1 blockade enhances expansion and functional capacity of human melanoma antigen-specific CTLs. 2007; *Int Immunol* 19: 1223-1234
75. Woo EY, Chu CS, Goletz TJ, Schlienger K, Yeh H, Coukos G, Rubin SC, Kaiser LR, June CH. Regulatory CD4⁺CD25⁺T cells in tumors from patients with early-stage non-small cell lung cancer and late-stage ovarian cancer. 2001; *Cancer Res* 61:4766-4772

76. Yee C, Thompson JA, Byrd D, Riddell SR, Roche P, Celis E, Greenberg PD. Adoptive T cell therapy using antigen-specific CD8+ T cell clones for the treatment of patients with malignant melanoma: In vivo persistence, migration and antitumor effect of transferred T cells. 2002; *Proc Natl Acad Sci USA* 99:16168-16173
77. Zippelius A, Batard P, Rubio-Godoy V, Bioley G, Lienard D, Lejeune F, Rimoldi D, Guillaume P, Meidenbauer N, Mackensen A, Rufer N, Lubenow N, Speiser D, Cerottini JC, Romero P, Pittet MJ. Effector function of human tumor-specific CD8 T cells in melanoma lesions: a state of local functional tolerance. 2004; *Cancer Res* 64:2865-2873

Abkürzungsverzeichnis

α	alpha
β	beta
γ	gamma
μg	10^{-6} Gramm
μl	10^{-6} Liter
Abb.	Abbildung
AJCC	American Joint Committee on cancer
APC	Allophycocyanin
CTLA-4	zytotoxisches T-Lymphozyten Antigen 4 („Cytotoxic T-lymphocyte antigen 4“)
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure („desoxyribonucleic acid“)
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FACS	“Fluorescence activated cell sorter”
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FMO	“ Fluorescence minus one”
GM-CSF	Granulozyten-Makrophagen-Kolonie stimulierender Faktor (“ granulocyte macrophage colony stimulating factor“)
gp	Glykoprotein
HLA-A2	humanes Leukozyten Antigen A2 („human leukocyte antigen A2“)
IDO	Indolamin-2,3-Dioxygenase
IFN α	Interferon alpha
IFN γ	Interferon gamma
Ig	Immunglobulin
IL-2	Interleukin 2
LCMV	lymphozitäre Choriomeningitisvirus
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex („major histocompatibility complex“)
nm	nanometer
PB	Pacific Blue
PBMCs	mononukleäre Zellen des peripheren Blutes (“peripheral blood mononuclear cells“)
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung („phosphate buffered saline“)

PD-1	„Programmed-death-1“
PD-L1	„Programmed-death-ligand-1“
PD-L2	“Programmed-death-ligand-2”
PE	Phycoerythrin
PE-A610	Phycoerythrin Alexa 610
PE-Cy7	Phycoerythrin-Cy7
PerCP	Peridinin Chlorophyll Protein
PI	Propidiumjodid
RPMI	“Roswell Park Memorial Institute medium“
TNF α	Tumornekrosefaktor alpha

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich all denen herzlich danken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben:

Mein besonderer Dank gilt Frau apl. Prof. Dr. Helga Bernhard, in deren Arbeitsgruppe diese Arbeit angefertigt wurde, für das interessante Projekt, die ausgezeichnete wissenschaftliche Betreuung und die Unterstützung bei der Verfassung dieser Arbeit.

Herrn Prof. Dr. Christian Peschel danke ich für die Möglichkeit, diese Dissertation im hämatologischen Forschungslabor am Klinikum rechts der Isar der Technischen Universität München anzufertigen.

Meinem Betreuer Herrn Dr. Holger Krönig sowie Herrn Dr. Marcus Odendahl danke ich für die umfassende Unterstützung bei dieser Arbeit.

Herzlich bedanken möchte ich mich bei Frau Kathrin Hofer, Frau Dr. Heinke Konrad, Frau Julia Müller, Frau Barbara Kast, Frau Maria Salvador, Frau Kerstin Gebhard und Frau Bettina Brackertz für die tatkräftige Unterstützung und das angenehme Arbeitsklima.

Ganz besonders danke ich Stefan für seine unermüdliche Unterstützung, seine aufmunternden Worte und für vieles mehr.

Mein größter Dank gilt von Herzen meinen Eltern und meinem Bruder Sebastian, die mich zu jedem Zeitpunkt in jeglicher Hinsicht voll unterstützt haben und ohne die dies alles nicht möglich gewesen wäre. Danke für Alles.

Publikationen

PD-1 expression on MelanA-reactive T cells increases during progression to metastatic disease.

Krönig H, **Falchner KJ**, Odendahl M, Brackertz B, Conrad H, Muck D, Hein R, Blank C, Peschel C, Haller B, Schulz S, Bernhard H.

Int J Cancer, 2011 Jun 29 [Epub ahead of print]