

## 3. Resultate

### 3.1 Immunantworten gegen Mucin

#### 3.1.1 Gesunde Probanden

Die Messung der Antigenität von MUC1 erfolgte mittels des Tetramer-Tests, die Auswertung war durchflusszytometrisch. Bei Mehrfachmessungen von Proben, die von einer Person stammten, wurden die Mittelwerte in den Ergebnistabellen dargestellt. Eine Immunantwort galt als eindeutig vorhanden, wenn das Ergebnis (nach Abzug des Hintergrundes aus der negativen Kontrolle, in der optimalerweise identische Zahl der Zellen analysiert wurde) oberhalb der Sensitivitätsgrenze des Tetramer-Tests lag (1:10000, entspricht 0,01% der CD8<sup>+</sup> T-Zellen) und mehr als 20 CD8<sup>+</sup> T-Zellen, die das Epitop gebunden haben, in der durchflußzytometrischen Auswertung zu sehen waren.

Die gesunden **HLA A2+** Probanden wurden primär zum Zweck der negativen Kontrolle untersucht. Da es aber für das Telomerase Antigen nachgewiesen wurde, dass die hTERT-spezifischen Zellen auch bei gesunden Probanden nachweisbar sind und somit nicht aus dem T-Zell Repertoire im Laufe der Selektion eliminiert werden (Vonderheide, 2001), wurde der Versuch unternommen auch in unserem Probandenkollektiv nach MUC1- spezifischen CTLs zu suchen.

Bei den gesunden **HLA A2-** Probanden, auf deren Zellen die Expressierung des HLA A2+ restringierten Epitops STAPPVHNV nicht stattfindet, wurde die Anzahl der MUC1 bindenden T-Zellen ausschließlich zur Quantifizierung des Hintergrundes benutzt.

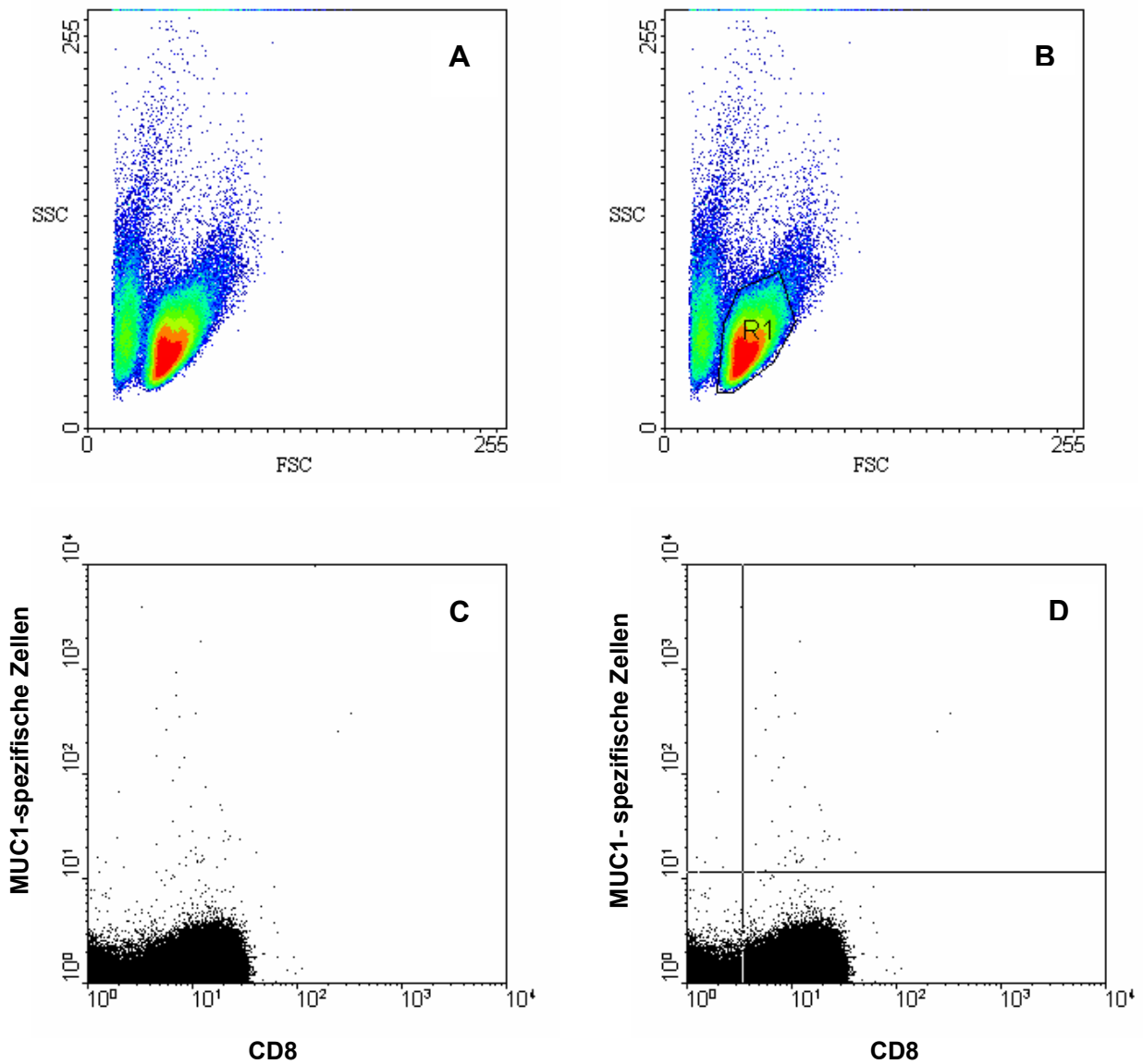
Als zusätzliche Negativkontrolle wurden für die beiden Gruppen die Frequenzen der CD8<sup>+</sup> Zellen gegen ein HIV-Epitop (SLYNTVATL) ermittelt.

Es wurden 4 männliche gesunde Probanden im Alter von 24 bis 28 Jahren analysiert (Tab. 3.1).

Tab. 3.1 Frequenzen der MUC1-reaktiven T-Zellen bei gesunden Probanden

Proband	HLA Typ	Frequenz Tetramer-bindener CD8 <sup>+</sup> PBMC (%)	
		MUC1	HIV (Hintergrund)
31	A2+	0,009	0,006
32	A2+	0,003	0,002
33	A2-	0,008	0,004
34	A2-	0,004	0,001

Alle acht Ergebnisse liegen unterhalb der Sensitivitätsgrenze des Tests (0,01%). Für die Frequenz der Mucin-reaktiven T-Zellen gleicht der Mittelwert für HLA2+ Probanden dem von den HLA A2- Probanden und beträgt 0,006%. Somit wurden in keiner Gruppe Mucin-spezifische CTLs gefunden. Die HIV Kontrolle ergibt einen Mittelwert von 0,004% für HLA A2+ und 0,0025% für HLA A2- Probanden.



**Abb. 3.1 Durchflusszytometrische Daten eines gesunden HLA A2+ Spender.**

Es sind die Resultate des Tetramer-Tests gezeigt. Die Abbildung präsentiert das Vorgehen bei der Auswertung der Experimente im Programm Cell Quest. Im FSC-SSC Diagramm (A) wurde die Lymphozytenpopulation eingegrenzt (B). Die Lymphozyten wurden in einem CD8-MUC1 plot dargestellt (C), die gesuchte Population der MUC1-spezifischen Zellen befindet sich in oberem rechtem Quadranten, ein Punkt entspricht einer Tetramer-bindenden CD8<sup>+</sup> T-Zelle (D).

### 3.1.2 Patienten mit Mammakarzinom

Die Immunantwort gegen Muzin im Kollektiv der unter Mammakarzinom leidenden, HLA A2+ positiven Patientinnen wurde mit Hilfe des Tetramer-Tests untersucht. Als Negativkontrolle wurde die Immunantwort gegen ein HIV-gag Epitop herangezogen. Folgende Tabelle stellt die Ergebnisse der Untersuchung dar. Bei den Werten in der Spalte „MUC1“ wurde der Hintergrund aus der HIV-Negativkontrolle bereits abgezogen.

Tab. 3.2 Tetramer-Test für Muzin bei HLA A2+ Mammakarzinompatientinnen

Patient	HLA Typ	Frequenz Tetramer-bindener CD8 <sup>+</sup> PBMC (%)	
		MUC1	HIV
1	A2+	<b>0,026</b>	0,004
2	A2+	0,006	0,004
3	A2+	<b>0,015</b>	<b>0,01</b>
4	A2+	<b>0,04</b>	0
5	A2+	0,005	0,005
6	A2+	0,007	<b>0,01</b>
7	A2+	0,004	-
8	A2+	<b>0,01</b>	<b>0,013</b>
9	A2+	<b>0,01</b>	0
10	A2+	0	0
11	A2+	<b>0,03</b>	0,002
12	A2+	0,004	0,007
13	A2+	0,006	0,003
14	A2+	<b>0,082</b>	<b>0,016</b>
15	A2+	0,001	0,001
16	A2+	<b>0,029</b>	0,002
17	A2+	0,003	0
18	A2+	0,003	0,007
19	A2+	<b>0,015</b>	0,007

**Fettgedruckt** sind die Werte, die nach den im Kapitel 3.1.1 genannten Kriterien auf die präsenste Immunantwort hinweisen.

Parallel wurden auch die CD8<sup>+</sup> Lymphozyten der 5 HLA A2- Patientinnen untersucht. Da die Exprimierung des analysierten Muzin-Epitops der HLA-A2 Restriktion unterliegt, wurde a priori angenommen, dass es keine Antigenität hervorruft. Somit konnten die Ergebnisse dieses Kollektivs als Negativkontrolle benutzt werden, die HIV-Negativkontrolle war nicht erforderlich.

Tab. 3.3 **Frequenzen der MUC1-reaktiven T-Zellen bei HLA A2-Mammakarzinompatientinnen**

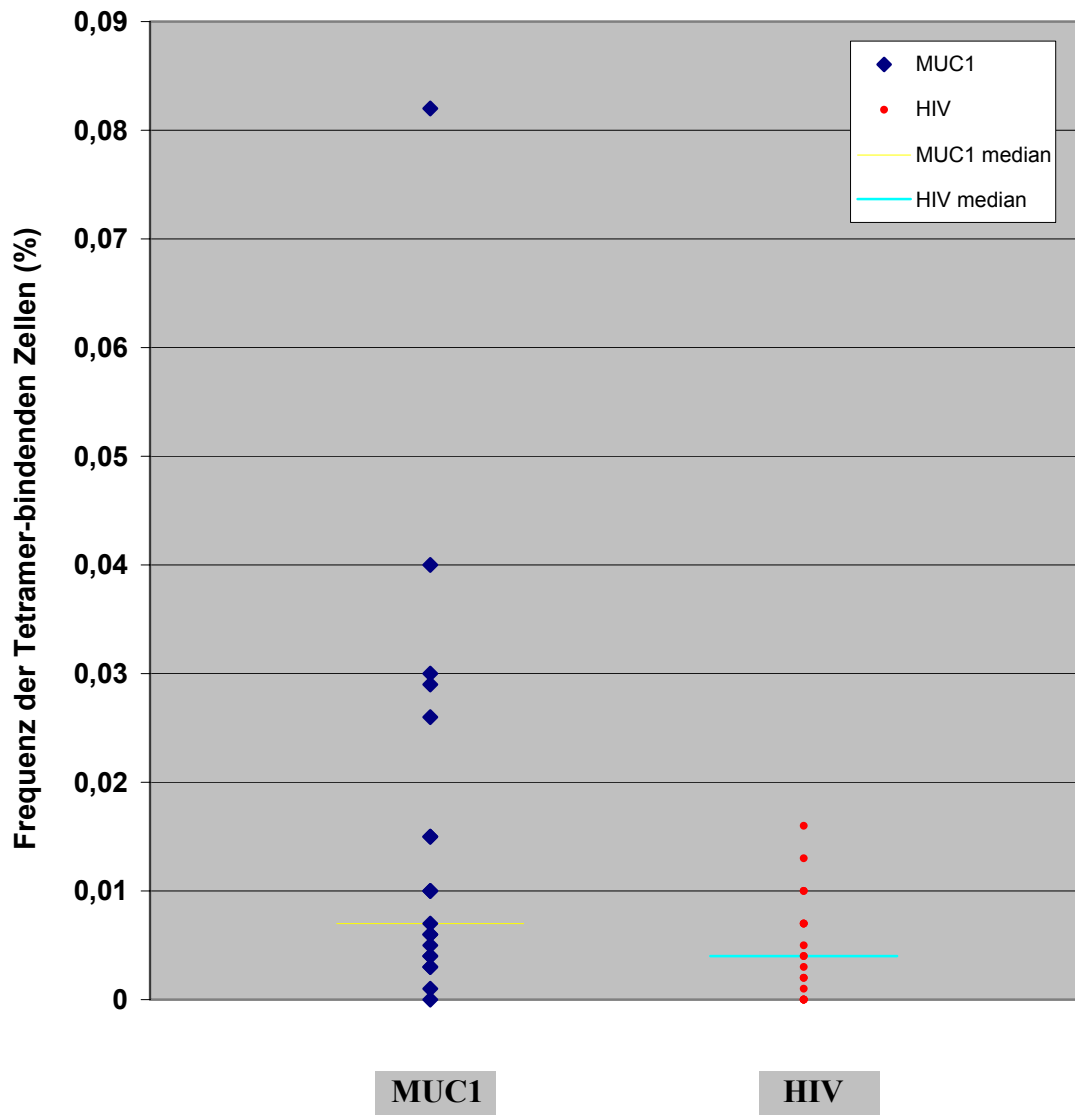
Patientin	HLA Typ	Frequenz Tetramer-bindener CD8 <sup>+</sup> PBMC (%)	
		MUC1	HIV
20	A2-	0,002	-
21	A2-	0	-
22	A2-	0,001	-
23	A2-	0,001	-
24	A2-	0,002	-

Bei den **HLA A2+** Patienten liegt die Frequenz zwischen 0% und 0,082%. Der Mittelwert beträgt 0,015%, die Standardabweichung des Mittelwertes 0,019% (n=19). Bei den Patienten, die **HLA A2-** sind, liegen die Frequenzen zwischen 0% und 0,002%. Der Mittelwert beträgt 0,001%, die Standardabweichung des Mittelwertes 0,0008% (n=5). Für die HIV Kontrolle beträgt der Mittelwert 0,005%, die Standardabweichung des Mittelwertes 0,004 (n=18, für eine Patientin wurde keine HIV Kontrolle durchgeführt).

9 von 19 untersuchten HLA A2+ Patienten, weisen Frequenzen auf, die auf präsenste Immunantwort gegen Muzin hinweisen. Die 5 analysierten HLA A2- Patientinnen haben sehr niedrige Frequenzen gegen beide Epitope, die alle unterhalb der Sensitivitätsgrenze liegen.

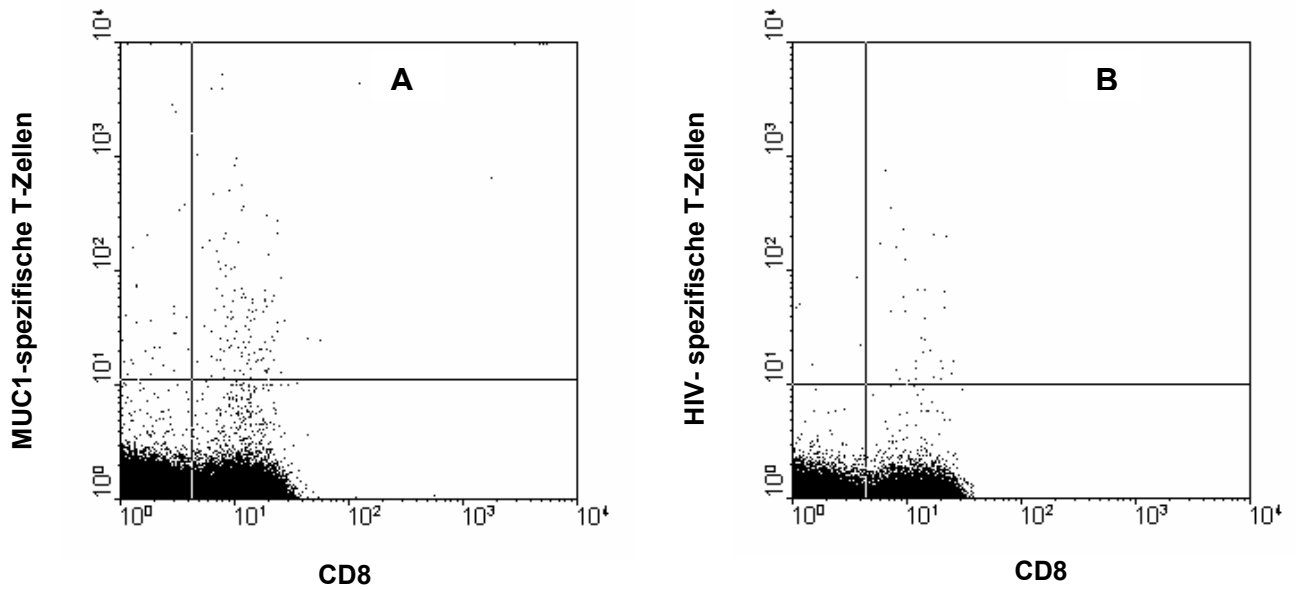
Mit dem Mann-Whitney-Test wurden die Frequenzen der MUC1-bindenden CD8<sup>+</sup> Zellen zwischen den HLA A2- und den HLA A2+ Mammakarzinompatienten verglichen. Der Test liefert einen signifikanten Unterschied (p=0,005). Der Vergleich zwischen den HLA A2+ Mamakarzinompatienten und den HLA A2+ gesunden Probanden ergibt dagegen keinen

signifikanten Unterschied (Mann-Whitney-Test,  $p > 0,05$ ). Bei dem letzten ist die niedrige Zahl der an den Untersuchungen beteiligten gesunden Probanden zu beachten.



**Abb. 3.2 Vergleich der HIV- mit Muzin-spezifischen Frequenzen bei 19 HLA A2+ Patienten mit Mamma-Ca.**

Die isolierten PBMCs wurden mit den Tetrameren und den CD8-Ak gefärbt. Gezeigt sind die Frequenzen der spezifischen CTLs gegen MUC1 und HIV (Negativkontrolle).



**Abb. 3.3 Ergebnisse des Tetramer-Assays.**

Abgebildet sind Daten einer HLA A2+ Mamma-Ca Patientin (Nr.14), die die größte Frequenz (0,082%) gegen MUC1 unter aller Patientinnen aufwies (A). Rechts Vergleich mit der HIV-Kontrolle derselben Patientin (Frequenz 0,016%) (B).

### 3.1.3 Patienten mit anderen Karzinomen

a) Da sich in der Literatur keine Hinweise auf die Quantifizierung der Immunantwort gegen MUC1 beim Bronchialkarzinom finden lassen, wurde die Immunantwort bei 3 HLA A2+ Patienten untersucht (Tab. 3.4).

**Tab. 3.4 Frequenzen der MUC1-reaktiven T-Zellen bei HLA A2+ Bronchial-Ca Patienten**

Patient	HLA Typ	Frequenz Tetramer-bindener CD8 <sup>+</sup> PBMC (%)	
		MUC1	HIV
25	A2+	0,015	0,01
26	A2+	0,006	-
27	A2+	0	0,006

Der Mittelwert für diese 3 Patienten beträgt 0,007%. Nur die Lymphozyten des Patienten 2 zeigen eine Reaktivität gegen das untersuchte Epitop, auffällig bei ihm ist das im „positiven“ Bereich liegende Ergebnis der Negativkontrolle. Die beiden übrigen Patienten haben niedrige, unterhalb dem Detektionslimit des Assays liegende Frequenzen.

b) Zum Zweck der zusätzlichen Kontrolle und Quantifizierung des Hintergrundes wurden auch 2 unter Kolonkarzinom leidende HLA A2- Patienten sowie eine HLA A2+ Patientin mit Merkel-Zellkarzinom untersucht.

**Tab. 3.5 Frequenzen der MUC1-reaktiven T-Zellen bei zwei Patienten mit Kolonkarzinom und einer Patientin mit Merkel-Zellkarzinom**

<b>Patient</b>	<b>HLA Typ</b>	<b>Karzinom</b>	<b>Frequenz der CD8<sup>+</sup> gegen MUC1 (%)</b>
28	A2-	Colon-Ca	0,001
29	A2-	Colon-Ca	0,001
30	A2+	Merkel-Zellkarzinom	0

Bei diesen Patienten wurde keine spezifische Immunantwort gegen MUC1 detektiert.



### 3.2 Immunantworten gegen Telomerase

#### 3.2.1 Gesunden Probanden

Für dieselben gesunden Probanden, für die bereits Tetramer-Test gegen MUC1 durchgeführt wurde, wurden die hTERT-reaktiven CD8<sup>+</sup> T-Zellen quantifiziert.

Als Negativkontrolle fungierten die bereits bestimmten Frequenzen gegen das HIV gag – Epitop.

Tab. 3.6 Frequenzen der hTERT-reaktiven T-Zellen bei gesunden Probanden

Proband	HLA Typ	Frequenz Tetramer-bindener CD8 <sup>+</sup> PBMC (%)	
		hTERT	HIV
31	A2+	0,003	0,006
32	A2+	0,003	0,002
33	A2-	0,002	0,004
34	A2-	0,001	0,001

Alle Ergebnisse liegen unterhalb der Sensitivitätsgrenze des Tests (0,01). Der Mittelwert beträgt 0,003% für HLA2+ Probanden und 0,0015% für HLA A2-.

#### 3.2.2 Patienten mit Mammakarzinom

Analog zur Verfahrensweise bei dem MUC1-Epitop wurden für die HLA A2+ und HLA A2- Mammakarzinompatienten die Frequenzen gegen Telomerase bestimmt. Da sich die Sensitivität des Tests für unterschiedliche Epitope nicht ändert, galten dieselben Kriterien für die Anerkennung einer Antigenität als „vorhanden“ wie bei den vorherigen Versuchen.

Tab 3.7 **Frequenzen der hTERT-reaktiven T-Zellen bei HLA A2+ Mammakarzinompatienten**

Patient	HLA Typ	Frequenz Tetramer-bindener CD8 <sup>+</sup> PBMC (%)	
		hTERT	HIV
1	A2+	0,004	0,004
2	A2+	0,002	0,004
3	A2+	<b>0,023</b>	<b>0,01</b>
4	A2+	0	0
5	A2+	0,001	0,005
6	A2+	0,008	<b>0,01</b>
7	A2+	0,005	-
8	A2+	0,004	<b>0,013</b>
9	A2+	<b>0,01</b>	0
10	A2+	0	0
11	A2+	0,002	0,002
12	A2+	0,004	0,007
13	A2+	0,001	0,003
14	A2+	0,003	<b>0,016</b>
15	A2+	0,001	0,001
16	A2+	0	0,002
17	A2+	<b>0,013</b>	0
18	A2+	0,006	0,007
19	A2+	<b>0,03</b>	0,007

**Fettgedruckt** sind die Werte, die nach den oben genannten Kriterien auf die präsenste Immunantwort hinweisen.

Tab. 3.8 **Frequenzen der hTERT-reaktiven T-Zellen bei HLA-A2-Mammakarzinompatientinnen**

Patient	HLA Typ	Frequenz Tetramer-bindener CD8 <sup>+</sup> PBMC (%)	
		hTERT	HIV
20	A2-	0	-
21	A2-	0,003	-
22	A2-	0,002	-
23	A2-	0	-
24	A2-	0,002	-

Bei den **HLA A2+** Patienten liegt die Frequenz zwischen 0% und 0,03%. Der Mittelwert beträgt 0,006%, die Standardabweichung des Mittelwertes 0,008% (n=19). Bei den Patienten, die **HLA A2-** sind, liegen die Frequenzen zwischen 0% und 0,003%. Der Mittelwert beträgt 0,0014%, die Standardabweichung des Mittelwertes 0,0013% (n=5). Da die Frequenzen gegen Telomerase und MUC1 für den jeweiligen Patienten im Zuge eines Versuchs bestimmt wurden, gilt die in der Tab. 3.2 angegebene Kontrollfrequenz gegen HIV auch für hTERT-Antigen (der Mittelwert der Frequenz gegen das HIV Epitop beträgt 0,005%, die Standardabweichung 0,004%).

Nur bei 4 HLA A2+ Patienten wurde eine Antigenität des Telomerase Epitops gemessen, die oberhalb der Sensitivitätsgrenze lag. Mit dem Mann-Whitney-Test wurden die Frequenzen der hTERT-bindenden CD8<sup>+</sup> Zellen zwischen den HLA A2- und den HLA A2+ Mammakarzinompatienten verglichen. Der Test ergab keinen signifikanten Unterschied (p=0.12). Der Vergleich des Kollektivs der HLA A2+ Mammakarzinompatienten mit den gesunden HLA A2+ Probanden ergibt den p-Wert von 0.46 und somit keinen signifikanten Unterschied der Mittelwerte.

### 3.2.3 Patienten mit anderen Karzinomen

a) Bronchialkarzinom: Dieselben Bronchialkarzinompatienten, für die bereits die Frequenz der MUC1-spezifischen T-Zellen bestimmt wurde, untersuchten wir in Hinblick auf die Immunantwort gegen das hTERT-Epitop, I540.

Tab. 3.9 Frequenzen der hTERT-reaktiven T-Zellen bei drei Patienten, die unter Bronchialkarzinom leiden.

Patient	HLA Typ	Frequenz Tetramer-bindener CD8 <sup>+</sup> PBMC (%)	
		hTERT	HIV
25	A2+	0,013	0,01
26	A2+	0	-
27	A2+	0	0,006

Nur bei dem Patienten 25 liegt die untersuchte Frequenz oberhalb der Sensitivitätsgrenze, wie es auch bei der Frequenz gegen MUC1 der Fall war (s. Tab.3.4)

b) Andere Karzinome: Auch die CTLs dieser 3 Patienten wurden benutzt, um das Ausmaß der unspezifischen Interaktionen zwischen den CD8<sup>+</sup> T-Zellen und den Tetramer-Komplexen zu quantifizieren.

Tab. 3.10 Frequenzen der hTERT-reaktiven T-Zellen bei zwei Patienten mit Kolonkarzinom und einer Patientin mit Merkel-Zellkarzinom

Patient	HLA Typ	Karzinom	Frequenz der CD8 <sup>+</sup> PBMCs gegen hTERT (%)
28	A2-	Colon-Ca	0
29	A2-	Colon-Ca	0
30	A2+	Merkel-Zellkarzinom	0

Obwohl bei allen 3 Patienten keine Frequenzen nachzuweisen sind, ist das Fehlen jeglicher Hintergrundsignale im Vergleich zu der HIV Negativkontrolle auffallend.

### 3.3 Verlaufsanalyse der zellulären Immunantwort

Für 7 HLA A2+ Mammakarzinompatienten wurde nach einem Abstand von 1,5 bis 5 Monaten das Blut erneut abgenommen und die Frequenz der T-Zellen gegen die beiden Tumorantigene erneut quantifiziert. Dies sollte den natürlichen Verlauf der Immunantwort während des Krankheitsverlaufes zeigen.

#### 3.3.1 Verlauf der Immunantwort gegen Muzin

Tab. 3.11 **Änderung der Frequenzen der Muzin-reaktiven T-Zellen im zeitlichen Verlauf bei 7 Patientinnen.**

Die Tetramer-Assays wurden für jede Patientin an zwei unterschiedlichen Zeitpunkten durchgeführt und die CD8-Frequenzen gegen MUC1 verglichen. In der mittleren Spalte wurde der zeitliche Abstand zwischen den Messungen angegeben. Alle Patientinnen sind HLA A2+.

Pat. Nr.	Ergebnis der ersten Messung (%)	zeitlicher Abstand (in Monaten)	Ergebnis der zweiten Messung (%)
1	<b>0,026</b>	5	<b>0,02</b>
2	<b>0,006</b>	1,5	<b>0</b>
4	<b>0,04</b>	5	<b>0,012</b>
6	<b>0,007</b>	4	<b>0,009</b>
8	<b>0,01</b>	3	<b>0,028</b>
11	<b>0,03</b>	2	<b>0,005</b>
12	<b>0,004</b>	1	<b>0,029</b>

Der Mittelwert der wiederholten Messungen beträgt 0,014% (bei n=7) und gleicht somit der im Kapitel 3.1.2 basal errechneten Mittelwert der Frequenzen gegen MUC1 ( $\bar{x}$ =0,015% bei n=19). Trotz dieser Übereinstimmung der Mittelwerte gibt es besonders bei den Patienten 11 und 12 erhebliche Abweichungen: der 6-fache Abfall der Frequenz auf einen Wert unterhalb der Sensitivitätsgrenze bei der Patientin 11 und der 7-fache Anstieg bei der Patientin 12. Der Wilcoxon Test liefert keinen signifikanten Unterschied zwischen beiden Ergebnisgruppen.

### 3.3.2 Verlauf der Immunantwort gegen Telomerase

Tab. 3.12 **Änderung der Frequenzen der Telomerase-reaktiven T-Zellen im zeitlichen Verlauf bei 7 Patientinnen.**

Die Tetramer-Assays wurden für jede Patientin an zwei unterschiedlichen Zeitpunkten durchgeführt und die CD8-Frequenzen gegen hTERT verglichen. In der mittleren Spalte wurde der zeitliche Abstand zwischen den Messungen angegeben. Alle Patientinnen sind HLA A2+.

Pat .Nr.	Ergebnis der ersten Messung (%)	zeitlicher Abstand (in Monaten)	Ergebnis der zweiten Messung (%)
1	<b>0,004</b>	5	<b>0,009</b>
2	<b>0,002</b>	1,5	<b>0</b>
4	<b>0</b>	5	<b>0</b>
6	<b>0,008</b>	4	<b>0,002</b>
8	<b>0,004</b>	3	<b>0,024</b>
11	<b>0,002</b>	2	<b>0,004</b>
12	<b>0,004</b>	1	<b>0,002</b>

Der Mittelwert der wiederholten Messungen beträgt 0,0058% (n=7) und gleicht ebenfalls der im Kapitel 3.2.2 basal errechneten Mittelwert der Frequenzen gegen hTERT ( $x=0,006$  bei n=19). Bei der Patientin 8 ist der 6-fache Anstieg der Frequenz bemerkenswert.

### 3.4 Immunogenität der Tumorantigene gemessen mit Interferon-gamma Assay

Die Untersuchung mit Hilfe eines anderen Assays sollte zeigen, ob bei eventuell vorhandener Erkennungsfähigkeit der Tumorantigene durch die CTLs auch eine funktionelle Antwort seitens der T-Zellen stattfindet. Es wurden 4 HLA A2+ Mamma-Ca Patienten analysiert, bei denen an gleichem Tag sowohl Tetramer-Test als auch Interferon-gamma Assay durchgeführt wurden. Die isolierten PBMCs wurden in drei Gruppen geteilt und mit MUC1-Epitop oder mit hTERT-Epitop stimuliert. Als negative Kontrolle (dritte Gruppe) diente eine mit Peptiden nicht stimulierte Probe. Auch hier war es wichtig, dass bei der Kontrolle möglichst gleiche Zahl der Zellen

stimuliert wird, da der Hintergrund von dieser Zahl abhängt und er in die Auswertung einbezogen wird. Für die durchflusszytometrische Auswertung wurden identische Kriterien wie beim Tetramer-Test angenommen: nach Abzug des Hintergrundes aus der unstimulierten Probe sollte das Ergebnis oberhalb der Sensitivitätsgrenze (1:10 000) liegen, mehr als 20 Zellen sollten sich in der das Zytokin sezernierenden Fraktion befinden.

### 3.4.1 Immunogenität des Tumorantigens Muzin

Tab. 3.13 **Frequenz der Interferon- $\gamma$  sezernierenden CD8<sup>+</sup> Zellen gegen Muzin gemessen mit dem Interferon- $\gamma$ -Assay.**

Dargestellt sind die Ergebnisse der Negativkontrolle (unstimulierte Probe) sowie die Resultate aus dem IFN- $\gamma$ -Assay (3.Spalte). Bei letzterem wurden die T-Zellen über 5 Stunden mit dem Peptid STAPPVHNV stimuliert. Zum Vergleich der Immunogenität mit der Antigenität wurden die Werte aus dem Tetramer-Assay herangezogen (letzte Spalte).

Pat. Nr.	Negativkontrolle	IFN-gamma Assay	Tetramer Assay
		% der IFN- $\gamma$ freisetzenden Zellen in der CD8 <sup>+</sup> Population	% der MUC1- Epitop bindenden Zellen in der CD8 <sup>+</sup> Population
8	0	0	0,01
16	0,002	0,002	0,029
17	0,001	0,001	0,003
18	0	0	0,003

Es lässt sich bei keiner der vier Patientinnen eine Reaktion im Sinne einer Sekretion des Interferon- $\gamma$  nachweisen. Bei allen vier Patienten waren weniger als 10 Zellen in der CD8-IFN $\gamma$ -Fraktion zu sehen, was nach den Validitätskriterien für das Assay als negatives Ergebnis gewertet werden muss. Die Korrelation mit dem Ergebnis des Tetramer-Assays ist ebenfalls nicht vorhanden. Die T-Zellen der Patientinnen 8 und 16, bei denen das MUC1-Epitop in Tetramer Assay erkannt wurde, waren unfähig auf die Stimulation mit diesem Epitop mit der Sekretion des IFN- $\gamma$  zu reagieren.

### 3.4.2 Immunogenität des Tumorantigens Telomerase

Tab. 3.14 **Frequenz der Interferon- $\gamma$  sezenerenden CD8<sup>+</sup> Zellen gegen Telomerase (hTERT) gemessen mit dem Interferon- $\gamma$ -Assay.**

Dargestellt sind die Ergebnisse der Negativkontrolle (unstimulierte Probe) sowie die Resultate aus dem IFN- $\gamma$ -Assay (3.Spalte). Bei dem letzten wurden die T-Zellen über 5 Stunden mit dem Peptid ILAKFLHWL stimuliert. Zum Vergleich der Immunogenität mit der Antigenität wurden die Werte aus dem Tetramer-Assay für Telomerase herangezogen (letzte Spalte).

Pat. Nr.	Negativkontrolle	IFN-gamma Assay	Tetramer Assay
		% der IFN- $\gamma$ freisetzenden Zellen in der CD8 <sup>+</sup> Population	% der hTERT- Epitop bindenden Zellen in der CD8 <sup>+</sup> Population
8	0	0	0,004
16	0,002	0,002	0
17	0,001	0,002	0,013
18	0	0	0,006

Auch in dieser Untersuchung ist es nicht gelungen, die Präsenz der IFN- $\gamma$  sezenerenden CD8<sup>+</sup> T-Zellen nachzuweisen. Die Korrelation mit dem Tetramer-Assay besteht insofern, dass bereits Ergebnisse dieser Methode bei Patientinnen 8,16 und 18 auf mangelnde Erkennung und Bindung durch die T-Zellen hinwiesen. Die CD8<sup>+</sup> T-Zellen der Patientin 17, bei der eine präsenete Antigenität der Telomerase gefunden wurde, setzten nach der Konfrontation mit dem ILAKFLHWL- Epitop kein IFN- $\gamma$  frei.

### 3.5 Klinischer Verlauf ausgewählter Patienten

Zwei Jahre nach der Bestimmung des Immunstatus wurde der aktuelle klinische Zustand der Patienten anhand der Akten recherchiert. Die Recherche beschränkte sich auf die HLA A2+ Mammakarzinompatienten, für die zuvor die Frequenzen der antigenspezifischen Zellen ermittelt wurden. Das Ziel war es, zu untersuchen, ob ein Zusammenhang zwischen diesen Frequenzen und dem klinischen Verlauf besteht.



Tab. 3.15 **Darstellung des klinischen Verlaufs der HLA-A2+ Mammakarzinompatienten**

Zusammengestellt sind die im Tetramer-Assay ermittelten Frequenzen und der klinische Verlauf nach 2 Jahren. Unter „Bemerkungen“ werden die den Verlauf am meisten beeinflussenden Faktoren sowie die aktuelle Therapie zusammengefasst.

	Frequenz der spezifischen CTL		Tumorstatus	Klinischer Verlauf
	MUC1	hTERT		
1	<b>0,026</b>	0,004	PD †	Tod infolge der Leber- und Knochenmetastasen
2	0,006	0,002	NED	Kein Tumornachweis nach adjuvanter Chemotherapie und OP
3	<b>0,015</b>	<b>0,023</b>	SD	Stabilisierung der Lebermetastasen durch palliative Therapie nach dem CMF Schema
4	<b>0,04</b>	0	SD	Knochenmetastasierung, unter Bisphosphonattherapie nicht progredient
5	0,005	0,001	PD †	Tod infolge der pulmonalen und mediastinalen Metastasen
6	0,007	0,008	PD	Progrediente, therapieresistente Lebermetastasierung
7	0,004	0,005	PD †	Tod infolge der Gehirnmastasen
8	<b>0,01</b>	0,004	SD	Pulmonale Metastasierung, stabilisiert durch antihormonelle Therapie
9	<b>0,01</b>	<b>0,01</b>	PD	Progredienz der LK Metastasen trotz palliativer Vinorelbin -Therapie
10	0	0	n.a.	Patientin wechselte die behandelnde Klinik
11	<b>0,03</b>	0,002	NED	Kein weiterer Tumornachweis nach Lumpektomie
12	0,004	0,004	PD †	Tod infolge der Leber- und Knochenmetastasen
13	0,006	0,001	PD	Progredienz der pulmonalen Metastasen
14	<b>0,082</b>	0,003	SD	Stabilisierung der ossären Metastasen durch antihormonelle- und Bisphosphonattherapie
15	0,001	0,001	PD †	Tod infolge der gastralen Metastasen
16	<b>0,029</b>	0	PD	Progredienz der hepatischen, pulmonalen und ossären Metastasierung

	MUC1	hTERT	Tumorstatus	Klinischer Verlauf
17	0,003	<b>0,013</b>	NED	Erfolg der neoadjuvanten und operativen Behandlung
18	0,003	0,006	NED	Kein Rezidiv nach Ablatio mammae
19	<b>0,015</b>	<b>0,03</b>	PD	Progredienz der pulmonalen und ossären Metastasierung, palliative Vinorelbin - Behandlung

PD – Progredienz der Erkrankung, SD – stabiler Verlauf, NED – kein Nachweis der Erkrankung, n.a. – keine Angabe möglich, † - Tod des Patienten

Da für Muzin antigenspezifische Zellen gefunden wurden, konnte die Korrelation zwischen der vorhandenen Immunantwort gegen dieses Antigen und dem klinischem Status der Patienten durchgeführt werden. Teilt man die Patienten in 2 Gruppen ein und schließt in die Gruppe 1 die Individuen mit nachweisbaren Frequenzen gegen MUC1 ein, und die restlichen Patienten in die Gruppe 2 (Patientin 10 wird ausgeschlossen), dann ergibt sich folgende Zusammenstellung:

Tab. 3.16 **Klinischer Verlauf innerhalb der Gruppen, die sich aus der Frequenzbestimmung der MUC1-spezifischen CD8<sup>+</sup> Zellen ergeben**

Verlauf	MUC1+ Gruppe (n=9)	MUC1– Gruppe (n=9)
Progredienz	4	6
Stabiler Verlauf	4	0
Kein Nachweis der Erkrankung	1	3

Die Progredienz des Tumorwachstums ist von der Präsenz der Muzin-spezifischen Immunantwort unabhängig. Alle Patienten, deren Krankheit stabil verläuft, haben nachweisbare MUC1-reaktive CTLs. Drei Patientinnen, bei denen vor der operativen Behandlung eines nicht-metastasierten Tumors keine Frequenzen nachgewiesen wurden, zeigten nach 2 Jahren kein Rezidiv.