

4. Diskussion

4.1 Diskussion der für die Quantifizierung der Immunantwort verwendeten Methoden

4.1.1 Tetramer-Assay

In der vorliegenden Arbeit wurde die Frequenz der Muzin-spezifischen CD8⁺ Zellen mittels des Tetramer-Tests ermittelt. Zahlreiche technische und biologische Faktoren beeinflussen die mit dieser Methode gewonnenen Ergebnisse. Variablen wie die Dauer der Färbung, die Menge der eingesetzten Tetramere oder die Temperatur in der die Färbung durchgeführt wird, müssen in jedem Labor je nach Zweck angepasst werden. Des Weiteren gibt es keinen Konsensus in der wichtigen Frage, ab welcher Nachweisgrenze die gemessenen Frequenzen als antigenspezifische T-Zellantwort zu bewerten sind – es existieren verschiedene Definitionen dieses so genannten „cut off points“ (Meidenbauer, 2003). Am häufigsten wird er anhand des 99-ten Perzentils der Messwerte von den HLA A2 negativen Patienten (deren CTLs per Definition das HLA*A0201-restingierte Peptid nicht erkennen können) ermittelt.

Der Tetramer-Test basiert auf strukturellen Interaktionen zwischen den T-Zellen und den Tumor-assoziierten Antigenen und ist somit funktionsunabhängig - es werden mit dieser Methode auch die naiven, anergen und hyporeaktiven Zellen erfasst. Als Resultat liegen die gemessenen tumorspezifischen Frequenzen höher als es bisher anhand der Ergebnisse anderer Techniken (ELISPOT) ermittelt wurde (Rubio-Godoy, 2001).

Die untere Sensitivitätsgrenze des Assays beträgt je nach Autor zwischen 1:50000 und 1:8000 (Überblick in Meidenbauer, 2003). Diese Grenze wird vom Ausmaß der unspezifischen Bindungen determiniert, die aus den Interaktionen zwischen den nichtspezifischen T-Zellen (Monozyten, nekrotischen oder apoptotischen Zellen) und den Tetrameren resultieren (Pittet, 2001). Die nicht zu verhindernde Beimischung der anderen Zellpopulationen trägt ebenfalls zur Abnahme der Sensitivität bei. Pittet beschrieb das Ausmaß der unspezifischen Bindungen als zwischen 0.01% und 0.04% liegend. Dieses Ausmaß konnte in dieser Arbeit anhand der negativen Kontrolle mit einem der Epitope des HIV-gag Antigens quantifiziert werden und betrug bis zu 0,016% (s. Tab. 3.2).

Die Interaktionen zwischen den MHC-Tetrameren und TCR im Laufe der Antigenpräsentation werden erheblich durch die Inkubationstemperatur moduliert (Whelan, 1999). Aus der immunologischen Forschung ist bekannt, dass auf Grund der Kreuzreaktivität

und Plastizität der Rezeptoren manche Peptide als Agonisten, partielle Agonisten oder gar als Antagonisten am gleichen TCR wirken können. Für die Tetramer Technologie wurde postuliert, dass bei der Inkubationstemperatur von 37° C bevorzugt die vollständigen Agonisten, die mit hoher Affinität an den TCR binden, erfasst werden – der Anteil der falsch positiven Zellen in der durchflusszytometrischen Auswertung wird damit reduziert. Dieses Phänomen bessert jedoch die Sensivität der Methode nicht, denn auch schwach affine Tumorepitope (gekennzeichnet durch hohe Dissoziationsrate vom Rezeptor) können die CD8⁺ Zellen stimulieren und diese würden bei der Inkubation bei 37° C nicht erfasst werden. In Rahmen der Etablierung dieser Methode in unserem Labor wurde dagegen keine Abhängigkeit zwischen der Inkubationstemperatur und der errechneten Frequenzen gesehen. Auf Grund der bestehenden Widersprüche ist es notwendig für jedes Epitop zusätzlich einen funktionellen Test durchzuführen.

Bei der Durchführung der durchflusszytometrischen Messung war es ersichtlich, dass sich der Hintergrund mit steigender Anzahl der analysierten Zellen reduzierte und sich die Sensivität des Assay gleichzeitig verbesserte, es empfahl sich somit mindestens zwei bis fünf Millionen PBMC mit den Tetrameren zu färben. Diese Anzahl war bei gleichzeitiger Färbung mit zwei verschiedenen Tetrameren, kombiniert mit der negativen Kontrolle, auf Grund der therapiebedingter Leukopenie der Patienten, praktisch nie zu erreichen.

Ein anderes Problem trat auf, wenn im Fall der niedrigen Frequenzen die gesuchten, spezifischen T-Zellen während der durchflußzytometrischen Auswertung sich nicht als deutliche, separate Fraktion von der restlichen CD8⁺ Population abhoben. Die Zellen reichten bandförmig in den „positiven“ Bereich der Signalintensität hinüber, die Grenze musste oft subjektiv gezogen werden und ließ sich nicht für alle Patienten standardisieren. Besonders schwer fiel die Differenzierung zwischen den Hintergrundsignalen und schwachen Signalen der zu den Tetramer-Komplexen niedrig affinen, aber doch spezifischen T-Zellen. Diese Tatsache bringt die Gefahr der Unter- oder Überschätzung der Frequenzen.

Zu beachten ist der Einfluss der Tumorerkrankung und der bisherigen Therapie auf die Vitalität der Zellen. Bereits bei der Isolierung der PBMC fiel auf, dass auf Grund der persistierenden Leukopenie der untersuchten Patienten, der Lymphozytenring schmal und mit aggregierten Erythrozyten durchflochten war. Es ergaben sich Schwierigkeiten die T-Zellen mit den monoklonalen Antikörpern wie CD8-mAb zu färben. Selbst die sechswöchigen Intervalle nach der letzten Therapie garantierten keine vollständige Erholung des Blutbildes und der Bluteigenschaften.

4.1.2 Interferon- γ -Sekretionstest

Das Interferon- γ -Sekretionsassay ergänzt den Tetramer-Test, weil es die funktionellen Eigenschaften der T-Zellen prüft. Die Kombination aus beiden ermöglicht somit die Ermittlung des Verhältnisses der tatsächlich effektiven CTLs zu der Gesamtheit der antigenerkennenden T-Zellen. Bei dieser Methode ist es notwendig, die isolierten PBMC vorerst mit einem Peptid zu stimulieren, da unstimulierte Zellen minimale basale Sekretion des Interferon- γ aufweisen. Die optimale Stimulationszeit ist etabliert und beträgt 5-6 Stunden, nach dieser Zeit erreicht die Kinetik des Tests das physiologische Äquivalent (Asemissen, 2001). Die Verlängerung der Stimulationszeit generiert keine neue, spezifische T-Zellen und ändert nicht das Ergebnis (Nagorsen, 2003a). Die Sensivität des Assays beträgt 1:10000 (0,01%) und gleicht somit anderen funktionellen Assays.

Zu den Faktoren, die diese Methode am meisten beeinflussen, gehört das Einfrieren und Auftauen von PBMC. Dies ermöglicht zwar die Durchführung der Tests in einer Sitzung und reduziert die Variabilität der Laborbedingungen, allerdings wurde nach dem Auftauen von Zellen eine Neigung der T-Zellen zur „spontanen Apoptose“ beobachtet. Darüber hinaus tendieren die aufgetauten Zellen zu verklumpen (Saito, 2000). Aus diesen Gründen wurde in Rahmen dieser Doktorarbeit das Interferon- γ -Sekretionsassay immer einen Tag nach der Isolierung der PBMC durchgeführt, die Zellen wurden nicht kryokonserviert.

4.2 Frequenz der antigenspezifischen T-Zellen

4.2.1 Muzin

Hypothetisch erwartete man bei den gesunden Probanden und den HLA A2- Patienten keine MUC1-spezifische CD8+ Zellen zu detektieren, da bei ihnen dieses Molekül entweder nicht exprimiert oder nicht präsentiert wird. Damit werden die T-Zellen nicht stimuliert und können nicht expandieren. Eventuelle Präsenz solcher Zellen im peripheren Blut gesunder Personen wäre durch eine nicht vollständige Eliminierung im Laufe der klonalen Selektion im Thymus begründbar. Die Ergebnisse zeigen ein eindeutiges Fehlen der MUC1-reaktiven Zellen. Zu ähnlichen Ergebnissen kam Correa, die 3 gesunde HLA A2+ Probanden untersuchte und ebenfalls keine STAPPVHNV-spezifische T-Zellen fand (Correa, 2004).

Die Quantifizierung solcher T-Zellen bei den HLA A2+ Mammakarzinompatientinnen war das Hauptziel der Experimente. Da das Peptid „STAPPVHNV“ von Brossart als immunogenes Epitop identifiziert wurde, erwartete man solche Zellen im peripheren Blut zu finden, der genaue prozentuelle Anteil wurde hypothetisch in einem Bereich zwischen 0 und 0,1% aller CD8⁺ Zellen eingeschätzt (Brossart, 1999). Die MUC1-spezifischen CD8⁺ T-Zellen wurden bei 9 von 19 HLA A2+ Mammakarzinompatientinnen gefunden.

Bei den Patienten, bei welchen die Immunantwort nachgewiesen wurde, liegen die Frequenzen zwischen 0,01% und 0,082% und somit deutlich unter der Größenordnung, die für virale Epitope oder Epitope des Melanoms bekannt ist (Dillner, 1987; He, 1999). Die Frequenzen liegen jedoch im Bereich oberhalb der Sensitivitätsgrenze des Assays und gleichen den Frequenzen, die für einige andere Epitope des MUC1-Moleküls bei Mammakarzinom bekannt sind (Correa, 2004; Brossart, 1999).

Eine mögliche Begründung für das Fehlen der spezifischen T-Zellen bei der Hälfte der Patienten wäre die gestörte Spaltung im Proteasom und damit die reduzierte Expressierung des MUC1-Antigens auf den malignen Zellen. Das ist ein häufiges Phänomen beim Mammakarzinom, welches für viele TAA zutrifft und zum Komplex der Mechanismen gehört, mit denen sich die Tumorzellen der immunologischen Kontrolle entziehen (Plunkett, 2001). Auch eine Herunterregulierung der Expression der MHC-Moleküle sowie die Reduktion der spezifischen T-Zellpopulation durch die von den Tumorzellen freigesetzten, immunsupprimierenden Zytokine konnten zu dem Ergebnis beitragen (Kaklamani, 1995; Gilboa, 1999).

Die Angaben über die Expressionsrate von MUC1 bei Mammakarzinom variieren zwischen 86% und 92% (McDermott, 2002; Croce, 2003; Girling, 1989). Möglicherweise haben aber die Mammakarzinomzellen einiger untersuchten Patienten das Antigen nur schwach exprimiert. Es wäre sinnvoll bei den Patientinnen, bei welchen der Tumor entfernt wurde, die Intensität der MUC1-Expression in den histologischen Präparaten zu evaluieren. Zu betonen ist, dass selbst bei Tumorantigenen, die eine Expressionsrate von über 90% aufweisen und als stark antigen gelten, sich nur bei einem Teil der Patienten die spezifischen T-Lymphozyten nachweisen lassen (Nagorsen, 2003b).

Diese Ergebnisse bestätigen die Hypothese der präsenten Antigenität des „STAPPVHNV“-Epitops beim Mammakarzinom und quantifizieren sie. Sie unterstreichen den Wert von MUC1 als Mammakarzinom-spezifisches Tumorantigen mit potentieller Anwendung in der Vakzin-basierten Immuntherapie.

Die Immunantwort gegen Muzin wurde auch bei 3 HLA A2+ Bronchialkarzinompatienten untersucht um ihr Ausmaß im Vergleich zum Mammakarzinom zu bestimmen. Der Grad der Expression von MUC1 beim Bronchialkarzinom wurde bisher nicht evaluiert, in der Literatur fehlen auch Angaben zum immunologischen Verhalten von MUC1 bei diesem Tumor. Die hier gewonnenen Ergebnisse liefern keine eindeutigen Erkenntnisse, bei dem Patienten 25 liegt die Frequenz in dem als „positiv“ anerkannten Bereich, bei beiden anderen Patienten sind dagegen die Frequenzen sehr niedrig. Da die geringe Anzahl der Patienten und die Spannweite der Ergebnisse keine definitiven Aussagen erlauben, wäre es sinnvoll ein größeres Kollektiv der Patienten zu untersuchen.

4.2.2 Telomerase

Zuerst wurden die gesunden Probanden und die HLA A2- Patienten analysiert. Erwartungsgemäß fanden wir bei den letzteren keine spezifischen CTLs – die Expression des untersuchten Telomerase-Epitops ist auf HLA A2+ Individuen beschränkt. Basierend auf den Veröffentlichungen von Amarnath stellten wir die Hypothese auf, bei den Gesunden eine niedrige aber detektierbare Frequenz im Bereich von bis zu 0,03% zu finden (Amarnath, 2004). Die gesammelten Daten unterstützen diese Hypothese nicht, die Telomerase-spezifischen T-Zellen wurden nicht detektiert (Tab. 3.6). Es wurden jedoch nur 2 HLA A2+ Probanden eingeschlossen, wohingegen Amarnath 20 gesunde Probanden mit Hilfe des ELISPOT-Assays analysierte und bei 6 von ihnen solche CTLs fand. Vonderheide untersuchte 10 gesunde Probanden mit Hilfe des Tetramer-Tests und bekam Frequenzen zwischen 0,01 und 0,03% aller CD8⁺ T-Zellen, er setzte aber das Sensitivitätslimit bei 0,03% und klassifizierte die Immunantwort bei gesunden Probanden als nicht präsent (Vonderheide, 2001). Keine spezifische Immunantwort ergab auch die von ihm durchgeführte Analyse der PBMC gleicher Probanden mit dem ELISPOT Assay. Die hier gewonnenen Resultate stimmen mit den von Vonderheide nicht in absoluten Frequenzzahlen, dagegen in der Erkenntnis, dass bei den Gesunden keine basale Immunantwort gegen Telomerase zu finden ist.

Es wurden anschließend 19 HLA A2+ Mammakarzinompatientinnen untersucht (Tab 3.7). Unerwartet wiesen nur 4 Patienten Frequenzen $\geq 0,01\%$ auf (2 davon genau an dem Grenzbereich der Sensitivität des Assays) - das entspricht einem Prozentsatz von 21%. Das vorliegende Ergebnis korreliert somit nicht hinsichtlich des prozentuellen Anteils mit dem von Amarnath, die mit dem sehr sensitiven ELISPOT Assay bei 11 von 14 Patienten (78%) hTERT-reaktive CTLs fand (Amarnath, 2004). Bei Amarnath's Patienten rangierte der Anteil

der hTERT- reaktiven CTLs zwischen 0,01 und 0,13% aller CD8⁺ T-Zellen. Der Unterschied zu den hier dargestellten Werten kann dadurch begründet werden, dass bei der Studie von Amarnath eine sechswöchige Pause zwischen Chemotherapie und der Untersuchung der PBMC angesetzt wurde. Dafür spricht die Tatsache, dass unser Patient 19, der die höchste Frequenz aufwies, nie chemotherapeutisch behandelt wurde.

Ergänzend evaluierte Vonderheide die basale Immunantwort gegen Telomerase in einer heterogenen Gruppe von 8 Patienten mit unterschiedlichen Karzinomen (darunter kein Mamma-Ca). Alle 8 Ergebnisse des Tetramer-Tests lagen initial im Bereich zwischen 0 und 0,02 % (Vonderheide, 2001). Die Frequenzen ließen sich jedoch durch eine *ex-vivo* Stimulation deutlich anheben.

Aus dieser Studie resultiert, dass die hTERT-reaktiven CD8⁺ T-Zellen bei der überwiegenden Mehrzahl der Mammakarzinompatientinnen in einer sehr niedrigen, für das Tetramer-Assay undetektierbaren Menge vorhanden sind, sie sind aber keinesfalls absolut abwesend. Es ist ebenfalls möglich, dass die gesuchten Zellen nicht in der Peripherie zirkulieren sondern sich in der Nähe des Tumors sammeln. Um das zu untersuchen wäre eine technisch schwierige Analyse des lymphozytären Infiltrats der Karzinome notwendig.

Die Quantifizierung der Frequenzen bei 3 HLA A2+ Bronchialkarzinompatienten (Tab. 3.9) erlaubt auf Grund der niedrigen Patientenzahl keine definitiven Schlussfolgerungen. Bisher wurde die Immunantwort gegen TAA dieses Tumors nicht untersucht. Obwohl das Bronchialkarzinom die Telomerase exprimiert (Shay und Bacchetti, 1997), hatte nur ein von drei Patienten detektierbare Frequenzen gegen dieses universelle Tumorantigen. Auch hier empfiehlt sich in der Zukunft ein größeres Kollektiv zu untersuchen.

4.3 Immunogenität von MUC1 und hTERT

4.3.1 Muzin

Die Immunogenität des Mammakarzinoms wurde mit Hilfe des funktionellen Interferon- γ -Tests untersucht. Tab. 3.13 zeigt, dass es nicht gelungen ist, nach der Konfrontation der von Patientinnen stammenden PBMC mit dem Antigen, eine Immunantwort im Sinne einer Zytokinsekretion nachzuweisen, obwohl es zuvor bei 2 von 4 untersuchten Patienten MUC1-reaktive T-Zellen gefunden wurden. Das lässt zuerst vermuten, dass die CTLs in ihrer Effektorfunktion kompromittiert sind. Zu ähnlichen Ergebnissen und Schlussfolgerung kam Correa, die für ein anderes, HLA A2+ restringiertes MUC1 Epitop (LLLTVLTV) zwar

reaktive T-Zellen im peripheren Blut fand, diese sich aber als unfähig erwiesen, mit den MUC1-exprimierenden Zelllinien zu reagieren (Correa, 2004). Als möglichen Grund nannte Correa niedrige Avidität des TCR zu dem präsentierten Peptid und daraus sich ergebende Toleranz gegenüber dem MUC1 Molekül.

Ergänzend postulierten Schirmacher und Nagorsen eine generelle Anergie der T-Zellen, die im peripheren Kreislauf der Mammakarzinompatientinnen zirkulieren (Schirmacher, 2002; Nagorsen, 2003 b). Diese Anergie führt u.a. zur herabgesetzten Induktion der Zytokinexpression. Dieses Phänomen ist nicht nur für das Mammakarzinom charakteristisch, so beobachtete Zanussi gestörte Freisetzung des Interferon- γ aus den CD8⁺ Lymphozyten bei HNO-Tumoren (Zanussi, 2003). Es wäre somit essentiell zu klären, ob die T-Zell Anergie sich auf bestimmte Peptide innerhalb eines Tumors beschränkt oder generell ein paraneoplastisches Merkmal mehrerer Karzinome ist.

Im Verlauf des Interferon-gamma-Assays kann jeder der viele Schritte, die am Ende zu Freisetzung des Zytokins führen, beeinträchtigt sein. Die Internalisierung des stimulierenden Peptids, seine Prozessierung im Proteasom und Präsentation durch die in den PBMC enthaltenen APC sowie die nachfolgenden Schritte, die zur Synthese des Effektorproteins führen, können defekt sein (Whiteside, 1999, Keilholz – persönliche Kommunikation). Um die Lokalisation der Störung zu präzisieren, ist es zu empfehlen, das intrazytoplasmatische Interferon- γ nach Stimulation mit dem Antigen zu quantifizieren.

Diese Ergebnisse bestätigen die Hypothese der gestörten Immunantwort gegen MUC1, die ihre Ursachen sowohl in der Störung der Antigenprozessierung und Antigenpräsentation durch APC als auch in der direkten Beeinträchtigung der Effektorzellen haben könnte. Die genaue Lokalisation muss noch geklärt werden; es besteht die Notwendigkeit der Entwicklung der Techniken, die erlauben, in kleinen Zellpopulationen die oben genannten Prozesse zu verfolgen. Des Weiteren ergeben sich aus diesen Resultaten Einschränkungen hinsichtlich der Anwendung des hier untersuchten Epitops in den Vakzinierungsstudien – man würde versuchen eine Population der immunologisch insuffizienten T-Zellen zu expandieren.

4.3.2 Telomerase

Identisch wie gegenüber dem Muzin verhielten sich die PBMC von Patienten nach Stimulation mit dem hTERT I540 Peptid - auch hier blieb jegliche Zytokinfreisetzung aus. Der Unterschied bestand darin, dass bereits im Tetramer-Test bei der Mehrzahl von untersuchten Personen keine reaktiven Zellen nachweisbar waren - das negative Ergebnis der funktionellen Analyse wurde somit hypothetisch erwartet. Auch die Tetramer-positiven Lymphozyten vom Patient 17 stellten sich als insuffizient heraus. Diese Ergebnisse übereinstimmen nicht mit den bereits erwähnten Resultaten von Amarnath (4.2.2), wo es im funktionellen ELISPOT-Assay eine Zytokinsekretion bei den Mammakarzinompatienten nach Stimulation mit gleichem Peptid nachgewiesen wurde (Amarnath, 2004). Andererseits wurde ein anerges Verhalten der T-Zellen gegenüber Telomerase in mehreren Studien nachgewiesen. Vonderheide untersuchte 6 Patienten mit unterschiedlichen Karzinomen und detektierte keine hTERT-spezifischen T-Zellen, obwohl er wie Amarnath das ELISPOT-Assay benutzte (Vonderheide, 2001). Somit sind die Berichte zum immunologischen Verhalten der Telomerase widersprüchlich.

Die Ergebnisse des IFN-gamma Assays bei dieser Studie haben drei mögliche Begründungen. Die am wahrscheinlichste ist, dass die hTERT-spezifischen T-Zellen, welche in einer ohnehin sehr niedrigen Frequenz vorhanden sind, sich in einem anergen Zustand befinden. Die molekularen Gründe hierfür wurden im Kapitel 4.3.1 erwähnt, für die Telomerase speziell wurde unter anderen eine gestörte Zerlegung des Peptids im Proteasom postuliert, so dass es nicht auf der Oberfläche der Zellen präsentiert wird und somit die Freisetzung des IFN-gamma nicht stimulieren kann (Ayyoub, 2001). Andererseits konnte die Menge der produzierenden Zellen oder des produzierten Zytokins in unserem kleinen Patientenkollektiv einfach zu gering sein um nachgewiesen zu werden. Die Ergebnisse dieser Studie und der Untersuchungen von Amarnath zeigen, dass bei vielen Patienten die hTERT-spezifischen Frequenzen an der Grenze der Sensivität der Methoden liegen. Eine Untersuchung der größeren Patientenmenge mit IFN-gamma Assay, korreliert mit gleichzeitig durchgeführtem ELISPOT-Assay, würde helfen die widersprüchlichen Resultate in Einklang zu bringen. Die dritte Begründung ist methodischer Natur und erklärt die negativen Ergebnisse durch ein nicht funktionierendes Assay. Um das auszuschließen ist es bei den zukünftigen Experimenten empfehlenswert eine Positivkontrolle (z.B. mit einem der Influenza-Peptide) durchzuführen.

4.4 Änderungen der Frequenzen in zeitlichem Verlauf

Die erneute Messung der Frequenzen nach einem definierten Zeitraum erlaubt die Feststellung, ob im Laufe der Erkrankung und der Therapie zu deren Änderung kommt. Sie dient auch der Bestimmung der Reliabilität der verwendeten Methoden.

4.4.1 Muzin

Erhebliche Unterschiede wurden bei 2 Patienten gesehen (Tab 3.11). Bei der Patientin 11 wurde in der Zeit der ersten Blutabnahme die neoadjuvante Chemotherapie mit Gemcitabin und Doxorubicin erst eingeleitet, die zweite Untersuchung fand nach zwei Monaten statt. In dieser Zeit kam es zu Abnahme der Lymphozytenzahl von 4,6 /nl auf 1,7/nl - daraus resultierte, dass für das Tetramer-Assay weniger Material zur Verfügung stand und es konnten lediglich $2 \cdot 10^5$ Zellen pro Tetramer gefärbt werden. Da es eine direkte Proportionalität zwischen der Menge der eingesetzten Zellen und errechneter Frequenz besteht (s. 4.1.1), könnte die leukopene Lage der Patientin den beobachteten Abfall erklären. Es ist nicht gelungen die Ursache für den Frequenzanstieg bei der Patientin 12 zu finden. Sie befand sich in der Zeit der beiden Blutabnahmen inmitten ihres Chemotherapiezyklus mit Vinorelbin und war hinsichtlich der Leukozytenzahl stabil. Nicht ausgeschlossen ist, eine bisher wenig untersuchte, immunmodulierende Wirkung des Zytostatikums (Zagozdzon, 2001).

Interessant ist die Tatsache, dass die drei Patientinnen (1, 4, 8), deren Frequenz initial oberhalb der Nachweisgrenze lag und auch bei der zweiten Untersuchung sich in diesem Bereich hielt, seit Monaten lediglich mit Pamidronsäure behandelt wurden. Das könnte bedeuten, dass das Unterlassen einer immunsupprimierenden Chemotherapie zur Erhaltung einer stabilen MUC1-spezifischen Fraktion der CTL beiträgt.

4.4.2 Telomerase

Da das untersuchte Epitop der Telomerase bereits bei der initialen Untersuchung keine Antigenität erzeugte, erwartete man keine Änderung dieses Sachverhaltes bei der zweiten Messung. Die Ergebnisse bestätigen diese Hypothese weitgehend (Tab 3.12). Der Nachweis der hTERT-spezifischen Zellen bei der Patientin 8 ist überraschend, erlaubt aber wegen des Ausnahmecharakters keine definitive Aussagen über die Gründe. Eine mögliche Ursache wäre die Progredienz des Tumors (und damit zunehmende Stimulation der T-Zellen). Eine Fortsetzung der Beobachtung dieser Patientin wäre sinnvoll.

4.5 Klinischer Verlauf bei den Patienten

Die initiale Hypothese lautete, dass die bei der Hälfte der Patienten zuerst nachgewiesene Immunantwort gegen Muzin den klinischen Verlauf positiv beeinflussen könnte. Die später gewonnenen Erkenntnisse, dass die spezifischen CD8⁺ Zellen mit großer Wahrscheinlichkeit anerg sind, machten diesen Zusammenhang unwahrscheinlich, denn gerade auf der zytotoxischen Wirkung von IFN-gamma (dessen Produktion gestört ist) basieren die bisherigen Nachweise der Interaktionen zwischen dem Tumor und dem Immunsystem (Shankaran, 2001). Es war jedoch nicht ausgeschlossen, dass andere Effektorzytokine (z.B. Perforin) von den MUC1-spezifischen T-Zellen produziert werden und zu einer effektiven Immunantwort beitragen (Appay, 2000).

Wie in Tabelle 3.16 gezeigt, kam es bei keinem Patienten zu einer Tumorregression, dagegen wiesen 10 Patienten, unabhängig von dem ermittelten Immunstatus, eine Progredienz auf. Alle Patienten, deren Erkrankung stabil verläuft gehören zwar in die MUC1+ Gruppe, es ist jedoch am wahrscheinlichsten, dass die erfolgreiche Stabilisierung der Krankheit der medikamentösen Therapie zu verdanken ist. Interessanterweise haben die beiden Patientinnen, bei denen die zwei größten Frequenzen ermittelt wurden (Pat. 4 und 14) einen stabilen Tumorstatus und sie werden lediglich mit Bisphosphonaten und antihormoneller Therapie behandelt. Hierbei ist es zwar möglich, dass die weitere Metastasierung durch das Immunsystem verhindert wird, diese Hypothese kann jedoch auf Grund der geringen Patientenzahl, der unterschiedlichen Stadien der Erkrankung und des unklaren Einflusses der eingenommenen Medikamente, nicht untermauert werden.

Zusammenfassend bleibt festzustellen, dass den Ergebnissen kein Zusammenhang zwischen der Immunantwort gegen Muzin und dem klinischen Verlauf zu entnehmen ist. Auch bisherige Untersuchungen sprechen eher gegen eine Korrelation zwischen dem klinischen Verlauf und der Frequenz der tumorspezifischen, spontanen oder Vakzine-induzierten CTLs (Rosenberg, 1998), obwohl auch gegensätzliche Studien veröffentlicht werden (Karanikas, 2001). Als Ursachen für den mangelnden Einfluss der Immunantwort auf die Krankheitsprogredienz spielen, neben der bereits erwähnten Anergie der T-Zellen, auch die bereits im Kapitel 4.2.1 erwähnten „Tumor-Escape-Mechanismen“ eine Rolle. Dazu gehören beispielsweise Modulation der Tumorumgebung durch aus den Tumorzellen freigesetzte, immunsupprimierende Zytokine (IL-10, PGE-2) oder Herunterregulierung der MHC-Expression auf diesen Zellen (Überblick in Gilboa, 1999).

4.7 Schlussfolgerungen und Ausblick

In dieser Studie wurde die Existenz einer spontanen Immunantwort gegen das Epitop MUC-1₉₅₀₋₉₅₈ des Tumorantigens Muzin bei Mammakarzinompatienten bestätigt. Dies unterstützt das Modell einer aktiven Auseinandersetzung des Immunsystems mit den Tumorzellen. Die hier ermittelten Frequenzen der MUC1-spezifischen CD8⁺ T-Zellen liegen in einem niedrigen Bereich. Es könnte angestrebt werden, diese Frequenz mit Hilfe einer Vakzine-basierten Immuntherapie zu erhöhen, um auf diese Weise die endogene tumorspezifische Immunantwort zu verstärken. Obwohl die von den untersuchten Patienten stammenden CD8⁺ T-Zellen kein IFN-gamma produzieren, sind ihre zytotoxischen Fähigkeiten *in-vivo* nicht ausgeschlossen und bedürfen weiterer Untersuchungen.

Das Epitop ILAKFLHWL der katalytischen Untereinheit des Enzyms Telomerase – Reverse Transkriptase ist durch Induktion einer sehr niedrigen basalen Immunantwort, die nur bei einem kleinem Anteil der Patienten nachweisbar ist, charakterisiert.

Die beiden benutzten Assays eignen sich zur Durchführung des Immunmonitorings. Es ist zu empfehlen, beide Methoden zu kombinieren um ein zusammenhängendes Bild der strukturellen und funktionellen Fähigkeiten der Tumor-reaktiven Zellen zu bekommen.

Aus den Resultaten dieser Arbeit ergeben sich weitere Fragen. Ist die sehr mühsame und kostenaufwendige Analyse jedes einzelnen Epitops sinnvoll? Wo liegen die Gründe für die niedrige Immunogenität – eher an der Tumorumgebung oder an den Lymphozyten selbst? Sind MUC1 und hTERT wirklich die idealen, für das Überleben der Tumorzellen essentiellen Tumorantigene? Da die niedrigen Frequenzen sowie die funktionelle Beeinträchtigung wahrscheinlich aus der durch die Tumorzellen vermittelten Immunsuppression resultieren, sind Untersuchungen zu Tumor-Escape-Mechanismen zu empfehlen. Die Erforschung weiterer immunsuppressiver Faktoren, die durch die Tumorzellen sezerniert werden, könnte zu Beseitigung einer der letzten Hürden vor dem breiten Einsatz der Immuntherapie beitragen. Eine weitere Charakterisierung der Tumor-reaktiven Zellen, um ihre Rolle bei der Tumor-gerichteten Immunantwort zu verstehen, ist ebenfalls notwendig.