

5 ZUSAMMENFASSUNG

Zahlreiche Untersuchungen belegen inzwischen die Existenz TAA-spezifischer T-Zellen bei unterschiedlichen Tumorentitäten. Besonders das maligne Melanom ist für seine Antigenität bekannt und wurde von Tumorimmunologen in den vergangenen Jahren intensiv erforscht. Viele Studien konnten Tumor-reaktive T-Lymphozyten nach *in vitro* Expansion von Vorläuferzellen aus dem peripheren Blut von Melanompatienten nachweisen. Die *in vitro* Expansion führt jedoch zu qualitativen und quantitativen Veränderungen der T-Zellen, so dass die *in vivo*-Funktion der Tumor-gerichteten Immun-Antwort nur eingeschränkt beurteilt werden kann. In dieser Arbeit wurde ein methodischer Ansatz gewählt, der direkt *ex vivo* zirkulierende T-Lymphozyten, die spezifisch autologe Tumorzellen erkennen, quantifiziert und charakterisiert.

Diese Untersuchung erforderte eine sehr sensitive Nachweismethode, die reaktive Zellen auf Einzelzellniveau nachweist. Da zusätzlich auch der Phänotyp der reaktiven Zellen beurteilt werden sollte, wurden zunächst zwei durchflußzytometrische Methoden im Vergleich mit dem IFN γ -ELISPOT-Assay, einer bereits etablierten, sensitiven Methode zur T-Zell-Analyse evaluiert. Die Analyse von Frequenzen Influenza-reaktiver T-Zellen ergab übereinstimmende Ergebnisse mit der IZ-DZ und dem IFN γ -ELISPOT-Assays. Deshalb wurde nachfolgend die IZ-DZ zur Quantifizierung der Tumor-reaktiven T-Zellen bei Melanompatienten eingesetzt.

Bei allen sechs untersuchten Patienten konnten Melanom-reaktive T-Zellen in der CD8 $^{+}$ - bzw. in der CD4 $^{+}$ -Population nachgewiesen werden. Die Frequenzen lagen mit 0,13%-2,17% spezifischer CD8 $^{+}$ T-Zellen in der Größenordnung Virus-reaktiver T-Zellen. Die Phänotypanalysen ergaben, dass es sich bei den reaktiven Zellen vor allem um CD45RA $^{+}$ CCR7 $^{-}$ -Effektorzellen handelte. Die Koexpression von Granzym B in den Tumor-reaktiven Zellen weist außerdem darauf hin, dass diese Zellen *in vivo* möglicherweise direkte zytotoxische Funktionen ausüben. Bei einer Patientin gelang nach direkter Separation Tyrosinase-spezifischer CD45RA $^{+}$ CCR7 $^{-}$ T-Zellen aus dem peripheren Blut mittels Tetrameren der Nachweis der Zytotoxizität direkt *ex vivo*.

Außerdem wurde die IZ-DZ in dieser Arbeit zur weitergehenden Charakterisierung Tyrosinase-reaktiver T-Zellen eingesetzt, die gegen ein neues, durch computergestützte Epitop-Vorhersage ermitteltes HLA-A1-restringiertes Tyrosinase-Peptid gerichtet sind. Mit dem ELISPOT-Assay wurden reaktive T-Zellen gegen das neue Tyrosinase-Epitop Tyr₄₅₄₋₄₆₃ nachgewiesen, die durchflußzytometrisch mit der IZ-DZ näher phänotypisiert wurden: Es handelt sich bei den reaktiven Zellen um CD3⁺CD8⁺ T-Lymphozyten, deren Effektorpotential durch den Nachweis von Granzym B gezeigt wurde.

Insgesamt demonstrieren die in dieser Arbeit vorgelegten Ergebnisse, dass Melanompatienten häufig funktionelle T-Zellantworten gegen den Tumor aufbauen. Die Beurteilung des Phänotyps reaktiver T-Zellen erlaubt ihre Zuordnung zu Differenzierungs-Subtypen, den naiven T-Zellen, Gedächtnis- und Effektorzellen. Die bei unseren Patienten nachgewiesenen Melanom-reaktiven Lymphozyten bilden eine Mischpopulation aus überwiegend Effektorzellen, aber auch Gedächtniszellen. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass Tumor-reaktive T-Zellen prinzipiell sowohl in der Lage sind, Tumorzellen zu zerstören, als auch eine langanhaltende Immunität aufrechtzuerhalten.