Aus der Klinik für Gynäkologie, Gynäkologische Endokrinologie und Onkologie

Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. med. Uwe Wagner

des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg

Untersuchungen zur physiologischen Rolle regulatorischer T-Zellen in Patientinnen mit fortgeschrittenem Ovarialkarzinom nach Immuntherapie mit Anti-Idiotyp Abagovomab

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten Humanmedizin

Dr. med. (doctor medicinae)

dem Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt

von Daria Wirch aus Balakowo

Marburg, 2010

Angenommen vom Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg am:

19.05.2011

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs.

Dekan: Prof. Dr. med. Matthias Rothmund

Referent: Prof. Dr. med. Uwe Wagner

1. Korreferent: Prof. Dr. med. Oliver Rick

Dokumentationsblatt

Bibliographische Beschreibung: Verhalten der regulatorischen T-Zellen aus kryokonservierten Lymphozytenproben von Ovarialkarzinompatientinnen unter der Antikörpertherapie mit Abagovomab sowie Effekte eines *in vitro*-Blocks des CTLA- 4- Rezeptors

139 Seiten, 12 Abbildungen, 26 Tabellen, 5 Diagrammen.

Schlüsselwörter

Ovarialkarzinom

CA125

Regulatorische T-Zellen, Tregs

Immuntherapie

Monoklonale Antikörper

ACA 125, Abagovomab

CTLA-4

FoxP3

$CD4+CD25_{high}+$

CTLA-4-Block

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis 5

Diagrammverzeichnis 6

Tabellenverzeichnis 7

Abkürzungsverzeichnis 10

I. Einleitung

I. 1. Das Ovarialkarzinom 13

I. 1.1. Stadien 15

I. 1.2. Natürlicher Verlauf 16

I. 1.3 Therapeutische Ansätze 17

I. 1.3.1. Operative Intervention 17

I. 1.3.2. Chemotherapie 18

I. 1.4. Bedarf nach neuen Therapieverfahren 19

I. 2. Immuntherapie 20

I. 2.1. Monoklonale Antikörper 26

I. 2.2. Immuntherapie beim Ovarialkarzinom 30

I. 3. CA 125 als Zielstruktur für die Therapie des Ovarialkarzinoms 31

I. 4.1. Der anti-idiotypische Antikörper Abagovomab (ACA15) 32

I. 4.2. Klinische Studien 32

I. 4.3. Offene Fragen und Konsequenzen 34

I. 5. Regulatorische T- Zellen 36

I. 5.1. Phänotypisierung regulatorischer T- Zellen 37

I. 5.1.1. CD25 37

I. 5.1.2. FoxP3 38

I. 5.1.3. CTLA-4 39

I. 5.1.4. GITR 39
I. 5.1.5. Bekannte T-Zell-Populationen mit regulatorischer Wirkung 40
I. 5.1.5.1. *Natural* Tregs 41
I. 5.1.5.2. *Adoptive* Tregs 42
I. 5.2. Aufgaben regulatorischer T- Zellen 44
I. 6. Problemstellung und Ziele dieser Arbeit 47

II. Material, Patienten und Methoden

II. 1. Material 48
II. 1.1. Geräte und Apparaturen 48
II. 1.2. Pipetten 48
II. 1.3. Plastikartikel 49
II. 1.4. Antikörper 49
II. 1.4.1. Erläuterung zu ausgewählten Antikörpern 50
II. 1.5. Das Tumorantigen CA125 (Mucin 16 / MUC 16) 51
II. 1.6. Medien und Puffer für Antikörper-Färbung 51
II. 1.7. Sonstiges 52
II. 1.8. Medium für Stimulationsversuche sowie zum Einfrieren und Auftauen der Lymphozyten 52
II. 1.9. Blutproben 53
II.1.9.1. Proben von Patientinnen 53
II.1.9.2. Proben von gesunden Probanden 54
II. 2. Methoden 56
II. 2.1. Probengewinnung 56
II. 2.1.1. Separation der Lymphozyten 56
II. 2.1.2. Einfrieren der Lymphozyten 57
II. 2.1.3. Auftauen von cryokonservierten Proben 58
II. 2.1.4. Vitalitätsprüfung und Zellzahlbestimmung 58
II. 2.2. Markierung von Antigenen mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern 59
II. 2.2.1. Allgemeines Prinzip der Färbung 59
II. 2.2.2. Phänotypisierung regulatorischen T-Zellen 60

II. 2.2.3. FoxP3 – Färbung, intrazellulär 61
II. 2.2.4. CTLA-4 – Färbung, intrazellulär 62
II. 2.2.5. Spezifische Stimulation mit CA125 und CTLA-4-Block für CFC- Assay 62
II. 2.2.6. Intrazelluläre Zytokinfärbung (CFC-Assay) 65
II. 2.3. Messung und Auswertung am FACS 66
II. 2.3.1. Funktionsprinzip der Messung am FACS 66
II. 2.3.2. Auswertung 68
II. 2.3.2.1. Analyse der Treg-Phänotypisierung 68
II. 2.3.2.2. Analyse der CFC-Assays 70
II. 2.3.2.3. Festlegung der Mindestgrenzen zur Auswertung 71
II. 2.3.2.4. Statistische Auswertung 73

III. Ergebnisse

III. 1. Proben aus der AGO-Studie 74
III. 2. CD4+ und CD8+ T-Zell-Populationen unter der Immuntherapie 74
III. 3. Regulatorische T-Zellen und ihre Frequenz im Verlauf der Vakzinierung mit Abagovomab 75
III. 3.1. Übersicht des gesamten Kollektivs 76
III. 3.2. Ergebnisse und einzelne Beispiele zum Verlauf der Treg-Frequenzen 79
III. 3.3. Korrelation der Treg-Marker im Verlauf 83
III. 4. CA125- Response 85
III. 5. Untersuchungen zu den einzelnen T-Zell-Populationen, differenziert nach CA125 spezifischen T-Zell-Respondern und Non-Respondern 88
III. 6. CTLA-4-Block 93

III. Diskussion

IV. 1.	Kurze Wiederholung der Fragestellung und der Ergebnisse	100
IV. 2.	Vergleich der Ergebnisse mit der Literatur	103
IV. 2.1.	T-Zell-Subsets	103
IV. 2.1.1.	Regulatorische T-Zellen	103
IV. 2.1.1.1.	Mögliche Einflussfaktoren auf die regulatorischen T-Zellen	106
IV. 2.1.1.2.	Korrelation der gemessenen Treg-Marker	108
IV. 2.1.2.	Rolle der Effektor-T-Zellen	109
IV. 2.2.	Der Block des CTLA-4-Rezeptors	112
IV. 2.2.1.	CTLA-4 und Tregs	112
IV. 2.2.2.	CTLA-4 und Effektor-T-Zellen	114
IV. 3.	Kritik der Methode	116
IV. 4.	Ausblick	118

Zusammenfassung	120
Danksagung	122
Erklärung	123
Akademischen Lehrer	124
Literaturverzeichnis	125

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Modell zur Entwicklung einer Antikörper-abhängigen zellulären Zytotoxität 28

Abbildung 2: Graphische Darstellung der Anti- idiotypische Kaskade 29

Abbildung 3: Übersicht regulatorischer T-Zellen 40

Abbildung 4: Schematische Darstellung der Antikörperfärbung mit fluoreszenzmarkierten Farbstoffen 60

Abbildung 5: Schematische Darstellung der Antikörperwirkung 63

Abbildung 6: *In vitro* – Stimulationsansätze 63

Abbildung 7: Schematische Darstellung des FACS- Funktionsprinzips 67

Abbildung 8: Graphische Extraktion aller CD4 exprimierenden Zellen in der FoxP3 Messung 69

Abbildung 9: Graphische Darstellung von FoxP3- Kontrolle und Probe aus dem Gate der CD4+ Lymphozyten 69

Abbildung 10: Analyse der CFC-Assays anhand einer als negativ bewerteten Kontrolle und Übertragung der Gates auf die entsprechenden Proben 71

Abbildung 11: Negative IL-10-Expression nach CA125-Stimulation, in Vorversuchen mit Il-10-MAK 85

Abbildung 12: Dot Plots einer CA125-spezifischen Response und eines positiven Blockeffekts 95

Diagrammverzeichnis

Diagramm 1: FoxP3 im Verlauf bei allen Patientenproben 77

Diagramm 2: CTLA-4 im Verlauf bei allen Patientenproben 77

Diagramm 3: IE – Tregs im Verlauf 79

Diagramm 4: KS – Tregs im Verlauf 81

Diagramm 5: GW – Tregs im Verlauf 82

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Histologische Klassifikationen des Ovarialkarzinoms	14
Tabelle 2:	Stadieneinteilung des Ovarialkarzinoms	15
Tabelle 3:	Übersicht verschiedener Ansätze in der Immuntherapie von Tumoren	25/26
Tabelle 4:	Immuntherapeutische Ansätze beim Ovarialkarzinom	30
Tabelle 5:	Patientinnen der beiden Studienarme mit Angabe des Alters	54
Tabelle 6:	Probanden mit Angabe des Alters	55
Tabelle 7:	Angabe statistisch signifikanter events anhand der Gesamtevents in der Auswertung	72
Tabelle 8:	CD4+ und CD4- T-Zellen des Gesamtkollektivs im Verlauf	75
Tabelle 9:	Anteil der FoxP3+ Tregs und CTLA-4+ T-Zellen im Verlauf der Vakzinierung	78
Tabelle 10:	Anteil der FoxP3+ Tregs an der Lymphozytenpopulation im Verlauf der Vakzinierung bei einer verlaufsäquivalenten Subgruppe der Patientinnen	80
Tabelle11:	Anteil der FoxP3+ Tregs an der Lymphozytenpopulation im Verlauf der Vakzinierung bei KS und MM	81
Tabelle12:	Anteil der FoxP3+ Tregs an der Lymphozytenpopulation im Verlauf der Vakzinierung bei GW	82

Tabelle13: Anteil der FoxP3+ Tregs an der Lymphozytenpopulation im Verlauf der Vakzinierung bei IS und KH 83

Tabelle 14: Korrelationskoeffizient und Bestimmtheitsmaß der einzelnen Treg-Marker im Verlauf der Immunisierung 84

Tabelle 15: IFNy-Expression der CA125-spezifischen Responder 86

Tabelle 16: Responder – Non-Responder: gemessenen Parameter in der präimmunen Abnahme 88

Tabelle 17: Responder – Non-Responder: gemessenen Parameter in der 5/6- Abnahme 89

Tabelle 18: Responder – Non-Responder: gemessenen Parameter in der Follow-up- Abnahme 89

Tabelle 19: Vergleich ausgewählter T-Zellpopulationen und ratios von Gesunden mit der baseline von Patientinnen 90

Tabelle 20: Vergleich ausgewählter T-Zellpopulationen und ratios von Gesunden mit Verlaufswerten der Patientinnen 91

Tabelle 21: Vergleich der CD4+ und CD8+ T-Zellen, sowie CD4+/CD8+ratio und CD8+/Treg-ratio bei Respondern sowie Non-Respondern vor der Immunisierung 92

Tabelle 22: Vergleich der CD4+ und CD8+ T-Zellen, sowie CD4+/CD8+ -ratio und CD8+/Treg-ratio bei Respondern sowie Non-Respondern im weiteren Verlauf 93

Tabelle 23: IFNy-Expression der CD4+ und CD8+ T-Zellen nach positivem CTLA-4-Block in präimmunen Abnahmen 94

Tabelle 24: IFNy-Expression der CD4+ und CD8+ T-Zellen nach positivem CTLA-4-Block in 5/6- Abnahmen 96

Tabelle 25: IFNy-Expression der CD4+ und CD8+ T-Zellen nach positivem CTLA-4-Block in Follow-up-Abnahmen 97

Tabelle 26: FoxP3-Mittelwerte im Verlauf bei CTLA-4-Block-positiven und -negativen Patientinnenproben 98

Abkürzungsverzeichnis

+/-	=	positiv / negativ auf Nachweis einer Antigenexpression (z.B. CD, FoxP3, CTLA-4, GITR)
Ab	=	antibody (Antikörper)
Ab1	=	Idiotypen-Antikörper
Ab1`	=	Anti-anti-Idiotypen-Antikörper
Ab2	=	Anti-Idiotypen-Antikörper
Ab3	=	Anti-anti-Idiotypen-Antikörper
Abb.	=	Abbildung
ADCC	=	Antibody-depended cell-mediated cytotoxity (Antikörper-abhängige Zellvermittelte Zytotoxizität)
Ag	=	Antigen
ACA 125	=	Abagovomab = Anti-idiotypischer Antikörper gegen CA 125
AGO	=	Arbeitsgemeinschaft gynäkologische Onkologie
AK	=	Antikörper
APC	=	Antigen präsentierende Zelle
AUC	=	Area under the curve
CA 125	=	Carbohydrate Antigen 125
Ca	=	Carcinom
CD	=	cluster of differentiation
CD4+/-	=	CD4 positive/negative T-Zellen, T-Zellen mit / ohne Nachweis einer CD4-Expression
CD8+/-	=	CD8 positive/negative T-Zellen, T-Zellen mit / ohne Nachweis einer CD8-Expression
CD28+/-	=	CD28 positive/negative T-Zellen, T-Zellen mit / ohne Nachweis einer CD28-Expression
CDC	=	Complemet depended cytotoxity (Komplement-vermittelte Zytotoxizität)
CEA	=	Carcino-Embryonales Antigen
CFC	=	colony forming cell

CpG	=	Cytosin-phospahtidyl-Guanin
CTLA-4	=	Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4
CTX	=	Cyclophosphamid
DC	=	Dendritische Zelle
Diff.	=	Differenz
DotPlot	=	Punktdiagramm
FIGO	=	Fédération Internationale de Gynécologie et d `Obstétrique (Internationale Vereinigung für Gynäkologie und Geburtshilfe)
FACS	=	fluorescence activated cell sorting = Durchflusszytometrie
Fc	=	Fragment crystallizable (Kristalisierbares Fragment von Antikörpern)
FITC	=	Fluoresceinisothiocyanat
FSC	=	forward scatter (Vorwärtsstreulicht bei der FACS-Analyse)
FoxP3	=	Forkhead-Box-Protein-3
gp100	=	zelluläres Glykoprotein
Her2/neu	=	human epidermal growth factor receptor 2
HMP	=	high malignant potential
ID	=	identification date (Kenndaten)
IL 2 / 10	=	Interleukin 2 / 10
immun.	=	immunisiert
IFNy	=	Interferon gamma
Ig	=	Imunglobulin
IPEX	=	Immundysregulation, Polyendokrinopathie - Enteropathie, X-chromosomales Syndrom
JÜR	=	Jahres-Überlebensrate
LMP	=	low malignant potential
MAK	=	Monoklonaler Antikörper
MART	=	Melanoma -associated antigen recognized by regulatory t cells (Melanomzell-spezifisches Tansmembranprotein)
MHC	=	Major histocompatibility complex
min	=	Minute (n)
MM	=	Malignes Melanom
mM	=	Millimol

MUC1	=	Mucin 1
MW	=	Mittelwert
nat.	=	natural
NHL	=	Non Hodgin Lymphom
nm	=	Nanometer
NY-ESO	=	cancer-testis Antigen
OK	=	Ovarialkarzinom
OC 125	=	erster Monoklonaler Antikörper gegen CA 125
Pat.	=	Patient / -in
PBMC	=	peripheral blood mononuclear cell
PE	=	Phycoerythrin
PE-Cy5	=	Phycoerythrin-Cyanin-5
r	=	Korrelationskoeffizient
r^2	=	Bestimmtheitsmaß
s.c.	=	subcutan
SSC	=	Side scatter (Seitwärtsstreulicht bei der FACS-Analyse)
Stdw.	=	Standardabweichung
t	=	time (= Zeitpunkt der Probenabnahme)
TAA	=	Tumor associated antigene (Tumorassoziiertes Antigen)
Tab.	=	Tabelle
TCR	=	T-Zell-Rezeptor
Teff	=	Effektor-T-Zelle
TGFß	=	Tissue growth factor beta
Treg	=	regulatorische T-Zelle
TUR-B	=	Transurethrale Resektion der Blase
Th-Zelle	=	T-Helfer-Zelle (z.B. Th-1, Th-3)
U	=	Unit (s)
UICC	=	Union internationale contre le cancer (Internationale Vereinigung gegen Krebs)
VEGF	=	Vascular endothelial growth factor
WHO	=	Word Health Organization
WT	=	Wildtyp
µl	=	Mikroliter

I. Einleitung

I.1. Ovarialkarzinom

Das Ovarialkarzinom (OK) ist in Deutschland mit circa 8000 Neuerkrankungen pro Jahr die sechsthäufigste Krebserkrankung der Frau und zweithäufigster weiblicher maligner Genitaltumor. In Relation zur Anzahl der Erkrankten ist das OK die häufigste gynäkologische Krebstodesursache.
Das mittlere Erkrankungsalter liegt bei etwa 65 Jahren, aber auch jüngere Frauen sind betroffen.

Aus histologischer Sicht sind Ovarialtumore sehr heterogen. Es gibt zahlreiche histologische Hauptklassen, von denen die meisten noch weiter differenziert werden (Tab.1).
Der epitheliale Subtyp (Adenokarzinom) ist jedoch bei Weitem der häufigste und liegt bei 3 von 5 ovariellen Neoplasien vor.

Die folgende Tabelle zeigt eine Übersicht der histologischen Klassifikationen ovarieller Tumoren (Tab. 1).

I. Maligne epitheliale Tumoren *A Seriös maligne Tumoren* 1 Karzinome mit "low malignant potential" (LMP) a) seröses Zystadenokarzinom mit LMP b) papilläres seröses Zystadenokarzinom mit LMP c) exophytisches papilläres Karzinom mit LMP d) Adenofibrom/Zystadenofibrom mit LMP 2 Karzinome mit "high malignant potential" (HMP) a) seröses Zystadenokarzinom mit HMP b) papilläres seröses Zystadenokarzinom mit HMP c) exophytisches papilläres Karzinom mit HMP d) malignes Adenofibrom/ Zystadenofibrom mit HMP *B Muzinöse maligne Tumoren* 1 Karzinome mit LMP a) muzinöses Zystadenokarzinom mit LMP b) Zystadenofibrom mit LMP 2 Karzinome mit HMP a) muzinöses Zystadenokarzinom mit HMP b) malignes Adenofibrom/Zystadenofibrom mit HMP *C Endometroide maligne Tumoren* 1 Zystadenokarzinom mit LMP 2 Karzinome mit HMP a) Adenokarzinom mit HMP b) Adenokarzinom mit Plattenepithelmetaplasie (Adenoakanthom) 3 Endometriales Stromasarkom 4 Mesodermaler ("Müller'scher") Mischtumor *D Klarzellige (mesonephroide) maligne Tumoren* 1 (Adeno-) Karzinom mit LMP 2 (Adeno-) Karzinom mit HMP *E Maligne Brenner-Tumoren* 1 mit LMP 2 mit HMP *F gemischte epitheliale Tumoren* *G undifferenzierte Karzinome* *H unklassifizierte Karzinome*	**II. Maligne Keimstrang-Stroma-Tumoren** *A weiblich determiniert* Granulosazell-Tumor malignes Thekom *B männlich determiniert* malignes Androblastom (Sertoli-Leydig-Zell-Tumor) malignes Gynandroblastom C unklassifizierbar maligner Keimstrang-tumor mit anulären Tubuli **III. Steroidzell-Tumoren (Lipidzell-Tumor, Lipoidzell-Tumor)** maligner Lipidzell-Tumor **IV. Maligne Keimzell-Tumoren** *A Dysgerminom* *B Entodermaler Sinus-Tumor (Dottersack-Tumor)* *C Embryonales Karzinom* *D Polyembryom* *E Chorionkarzinom* *F Malignes Teratom* 1 unreifes Teratom 2 reifes Teratom mit maligner Entartung 3 maligne Struma ovarii 4 Karzinoid 5 stromales Karzinoid *G kombinierte maligne Keimzell-Tumoren* **V. Mischtumoren aus Keimleiste und Keimzellen** *Gonadoblastom mit malignem Keimzell-Tumoranteil* **VI. Sarkome ohne Ovarspezifität** **VII. Metastasen extraovarieller Primärtumoren** **VIII. Maligne Tumoren des lymphatischen und blutbildenden Systems**

Tabelle 1: Histologische Klassifikationen des Ovarialkarzinoms (LMP = low-malignant-potential; HMP = high-malignant-potential)

I.1.1. Stadien

Die Tumorstadien werden nach FIGO eingeteilt und orientieren sich an festgelegten klinischen Kriterien (Tab. 2).
Die Stadiengruppierung nach TNM und die Einteilung nach UICC entsprechen den FIGO – Stadien.

FIGO/ UICC	Klinische Kriterien	TNM
I	**Tumor auf die Ovarien beschränkt**	**T 1 M0**
	a) Tumor auf ein Ovar beschränkt, Kapsel intakt, kein Aszites **b)** beide Ovarien befallen, Kapsel intakt, kein Aszites **c)** Tumor auf ein oder beide Ovarien beschränkt, Kapsel durchbrochen, Aszites oder maligne Zellen in der Peritonealspülung	
II	**Tumor einer oder beider Ovarien, Ausdehnung auf das kleine Becken beschränkt**	**T2 M0**
	a) Befall von Uterus und / oder Tuben, kein Aszites **b)** Befall anderer Organe des kleinen Beckens, kein Aszites **c)** Befall von Organen des kleinen Beckens, Aszites oder maligne Zellen in der Peritonealspülung	
III	**Tumor in einem oder beiden Ovarien, intraperitoneale Metastasen außerhalb des kleinen Beckens und / oder retroperitoneale LK- Metastasen, Befall von Omentum majus oder Dünndarm**	**T 3 M0**
	a) ausschließlich mikroskopische Metastasen außerhalb des kleinen Beckens **b)** Metastasen bis 2cm Größe außerhalb des kleinen Beckens **c)** Metastasen > 2cm außerhalb des kleinen Beckens oder retroperitoneale LK- Metastasen	
IV	**Fernmetastasen außerhalb der Bauchhöhle, ausschließlich Peritonealmetastasen (z.B. intrahepatische Metastasen, Pleuraerguss, Einbruch in Blase oder Darm**	**Alle T, M1**

Tabelle 2: Stadieneinteilung des Ovarialkarzinoms nach FIGO und TNM (UICC).

I.1.2. Natürlicher Verlauf

Etwa 90% der Ovarialkarzinome (OK) treten sporadisch auf. Bei 10% der Fälle entwickelt sich bei genetischer Prädisposition (Mutation in den BRCA-1 und/oder 2 Genen) ein hereditäres OK.
Das Risiko der Entwicklung eines OK wird durch Einnahme von Ovulationshemmer und bei frühen oder zahlreichen Schwangerschaften reduziert (Narod, S.A. 1998).

Es gibt kaum eindeutige Frühsymptome beim Ovarialkarzinom und dementsprechend befinden sich zwei Drittel der Frauen bei Diagnosestellung in einem fortgeschrittenen Tumorstadium (FIGO III oder IV). Die Überlebenschancen sind dann entsprechend niedrig (nach WHO, EUROCARE-1 study, in Berrino F.1995). Die angegebenen 5-JÜR beziehen sich auf Daten einer durch die NSOC durchgeführten Studie, basierend auf Langzeitüberlebensdaten von über 5000 Patientinnen. Entscheidend ist das Stadium zum Zeitpunkt der Diagnosestellung. So konnte eine 5-JÜR von 92-82% für Patientinnen im klinischen Stadium I und 67-71% im Stadium II definiert werden. In der höhere Tumorstadien nahm die 5-JÜR deutlich ab: 39-17% im Stadium III und nur noch 12% bei Patientinnen mit Fernmetastasen (Stadium IV) bei Diagnosestellung.
Die Prognose hängt entscheidend von der Radikalität der Operation ab, das heißt inwiefern eine R0- Resektion erreicht werden kann.
Weitere Prognosefaktoren beim OK sind:

- Alter, klinischer Allgemeinzustand
- FIGO-Stadium
- Grading (FIGO I-IIa)
- Ascitesmenge

Beim nachgewiesenen hereditären Ovarialkarzinom wird teilweise, unabhängig vom Folgenden, eine prophylaktische beidseitige Salpingo-Ovarektomie empfohlen (Kiechle 2001).

I.1.3.Therapeutische Ansätze

Die Standard-Therapie besteht im Wesentlichen aus einer operativen Intervention und einer adjuvanten, platinhaltigen Chemotherapie über 4-6 Zyklen (du Bois 2001).

I.1.3.1. Operative Intervention

Das Ziel der Operation ist die komplette Tumorresektion (R0), wenn möglich während der Erstoperation. Eine kurative Resektion beinhaltet folgende Schritte:

- Asservierung von Ascites (oder Peritoneallavage) und manuelle Exploration des gesamten Bauchraums
- multiple Peritoneal-PE der Beckenwand, der parakolischen Rinnen und der Zwerchfellkuppel beidseits
- Hysterektomie mit beidseitiger Adnexektomie
- systematische pelvine und paraaortale (infrarenale) Lymphadenektomie
- subtotale Peritonektomie, ggf. mit Darmresektion (wenn möglich en-bloc), sowie die Resektion aller befallenen Gewebe
- infragastische Omentektomie

Bei einer anoperierten Patientin (z. B. beim Zufallsbefund oder Erstoperation in einem Krankenhaus ohne spezifische Erfahrung) soll in einer Komplettierungsoperation ein maximales Tumordebulking angestrebt werden, möglichst innerhalb von 7 Tagen nach dem primären Eingriff.
Ist die R0-Resektion nicht möglich, soll der Eingriff im Sinne einer Palliation und einer histologischen Sicherung limitiert werden. Es kann dann ein Tumordebulking nach 3 Zyklen Chemotherapie erfolgen, wenn hierunter eine Partialremission erreicht wurde (van der Burg 1995; Rose P.G. 2002).
Die Chirurgie spielt auch eine Rolle in der palliativen Therapie des OK, mit dem Ziel der Symptomlinderung und der Verlängerung der Überlebenszeit.

I.1.3.2. Chemotherapie

Beim OK wird ab FIGO IA, G3 generell eine Chemotherapie empfohlen, da das Rezidivrisiko sehr hoch ist (insgesamt etwa 75%). Weiterhin konnte seit der Einführung der Taxane in die First-line-Therapie des Ovarialkarzinoms eine signifikante Verbesserung der 5-JÜR erreicht werden:

- FOGO I: 93%
- FIGO II: 70%
- FIGO III: 37%
- FIGO IV: 25%

Es wird dabei zwischen adjuvanter Chemotherapie (nach R0-Resektion) und palliativer Chemotherapie (nach R1- oder R2-Resektion oder bei Metastasen) unterschieden.

Primäre Chemotherapie

Bei FIGO IA, G1/2 besteht keine generelle Indikation zur adjuvanten Therapie. In Deutschland wird empfohlen, die anderen Patientinnen in Studien (z. B. Protokolle der AGO / NOGGO) einzuschließen.

Es gelten folgende Empfehlungen nach WHO:

- FIGO IA, G3 - IIa: Carboplatin (3-)6 Zyklen
- FIGO IIB – IV: Carboplatin + Taxol 6 Zyklen

Sekundäre Chemotherapie

Es wird hier zwischen Frührezidiv (in den ersten 6 Monaten) oder Spätrezidiv (> 6 Monate) unterschieden. Bei Frührezidiven geht man von einer Platinresistenz aus.

➔ *Frührezidiv (< 6 Monate) = „Platinresistent“:*

- Taxol (1. Wahl)
- Topotecan
- Caelyx

(Weitere Chemotherapeutika: Treosulfan, Etoposid, Cyclophosphamid, Gemcitabine)

➔ *Spätrezidiv (> 6 Monate) = „Platinsensibel“:*

- Carboplatin + Taxol (1. Wahl)
- Carboplatin mono, z.B. bei Taxan-Kontraindikation, Wunsch der Patientin
- Carboplatin + Gemcitabine, z.B. bei persistierender Neuropathie nach Primärtherapie

(Weitere Chemotherapeutika: Topotecan, Caelyx, Etoposid, Treosulfan, Cyclophosphamid)

I.1.4. Bedarf nach neuen Therapieverfahren

Da der natürliche Verlauf des Ovarialkarzinoms für die Erkrankte den Tod zur Folge hat, beschäftigt sich die laufende Forschung auf diesem Gebiet mit weiteren Möglichkeiten der multimodalen Therapie, die zu einer Verbesserung der Überlebensdauer beitragen könnten.

Neben der bisher üblichen Therapie solider Karzinome, das heißt der Operation und Chemotherapie, gewinnt dabei die Immuntherapie zunehmend an Bedeutung. Diese zielt darauf ab, den Organismus in seiner eigenen Immunantwort gegenüber den neoplastischen Zellen zu unterstützen und somit eine verbesserte körpereigene Tumorabwehr zu schaffen.

I.2. Immuntherapie

Die allgemeine Definition bezeichnet hiermit Behandlungsformen, die auf das Immunsystem in Abhängigkeit von der Erkrankung in stimulatorischer, inhibitorischer, suppressiver oder substituierender Weise einwirken.

Die Beeinflussung des Immunsystems ist dabei auf unterschiedlichen Ebenen möglich. Prinzipiell unterscheidet man das angeborene, unspezifische Immunsystem und das adaptive, erworbene Immunsystem, welches durch unterschiedliche Strategien aktiviert werden kann. Im Hinblick auf die Tumorbekämpfung wird dem adaptiven Immunsystem eine wichtige Rolle zugeschrieben.

Der humorale Schenkel des adaptiven Immunsystems umfasst die Bildung von Antikörpern, die von spezialisierten B-Lymphozyten, den sogenannten Plasmazellen, gebildet werden. Antikörper sind in der Lage, mit der hypervariablen Domäne Antigene hochspezifisch zu erkennen, und gleichzeitig über ihre konstante Domäne (Fc-Region) unterschiedliche Effektorfunktionen auszulösen. Diese beinhalten u.a. die Rekrutierung phagozytierender Zellen oder die Aktivierung des Komplementsystems.

T-Lymphozyten bilden dagegen den zellulären Schenkel des adaptiven Immunsystems. Man kann unterschiedliche Subtypen von T-Zellen, die auf verschiedene Weise unter Beteiligung des Major Histocompatibility Complex (MHC) aktiviert werden können, voneinander abgrenzen. Nach Prozessierung des Antigens werden antigene Peptide in Verbindung mit MHC-Molekülen auf der Oberfläche antigenpräsentierender Zellen (APC) exprimiert. MHC-Klasse-I Moleküle präsentieren in der Regel endogene Antigene und aktivieren CD8 positive (CD8+) zytotoxische T-Lymphozyten. Dagegen werden exogene Antigene in Assoziation mit MHCII-Molekülen präsentiert, welches zur Aktivierung CD4 positiver (CD4+) Lymphozyten, sog. T-Helferzellen, führt.

Entscheidend für die T-Zellaktivierung ist, neben der spezifischen Interaktion zwischen T-Zell-Rezeptor (TCR) auf der Oberfläche von T-Zellen und dem korrespondierenden Antigenpeptid-MHC-Komplex der APC, das Vorhandensein eines costimulatorischen Signals. Dieses erfolgt durch die Bindung von CD28, welches auf T-Zellen exprimiert wird, mit den entsprechenden Liganden CD80 /

CD86, die von den APCs exprimiert werden. Bindet ein T-Zell Rezeptor ein Antigen ohne zusätzliche Costimulation, bleibt die T-Zellaktivierung aus und es entsteht ein Zustand der T-Zell-Toleranz, der auch als Anergie bezeichnet wird.

Die Manipulation der humoralen sowie der zellulären Immunität wurde in der Vergangenheit durch verschiedene immunologische Verfahren angestrebt, wobei der zellulären Immunantwort im Rahmen der Tumorbekämpfung oftmals eine größere Rolle zugesprochen wird. Die humorale und zelluläre Immunität kann jedoch nicht vollkommen isoliert voneinander betrachtet werden, da sie über lösliche Mediatoren wie Zytokine gegenseitig beeinflusst werden. So können unterschiedliche Subsets der CD4+ T-Helferzellen, sogenannte Th1 und Th2-Zellen, stimuliert werden, die wiederum über die Sekretion von Zytokinen entweder die zytotoxische T-Zellantwort oder die Bildung von Antikörpern fördern. Beispielsweise werden zytotoxische T-Zellen über Sekretion von IFNγ durch Th1-Zellen stimuliert. Auf der anderen Seite wirken Zytokine wie z.B. IL-4, die von Th2-Zellen produziert werden, aktivierend auf die Bildung von Antikörper.

Die Therapieansätze im Rahmen der onkologischen Immuntherapie werden in unspezifische, spezifische und immunsuppressive Verfahren differenziert.
Unspezifische Ansätze wirken aktiv oder passiv aktivierend auf das gesamte Immunsystem. Im Rahmen der unspezifisch-aktiven Verfahren werden immunologische Adjuvantien (meistens toxinhaltige bakterielle Zellwände) mit spezifisch wirksamen Antigenen beladen. Diese wiederum sollen die gesamte humorale und zelluläre Immunabwehr steigern. Anwendung findet dieses Verfahren zum Beispiel bei der lokalen Therapie des oberflächlichen Blasenkarzinoms mit BCG (Nagorsen 2002) oder als systemisch wirksames Stimulanz Levamisol in der adjuvanten Therapie des kolorektalen Karzinoms (Beaty 1992).
Als unspezifisch-passiv werden sogenannte biologische „response modifier“ bezeichnet. Hierzu zählen Stoffgruppen, die bereits vom Körper selbst in geringen Mengen produziert werden, wie zum Beispiel Interleukine. Im Rahmen des therapeutischen Ansatzes werden solche Mediatoren *ex vivo* produziert

und können anschließend in entsprechend hoher Konzentration oral oder parenteral appliziert werden. Hierdurch soll insbesondere das zelluläre Immunsystem hoch zytotoxische Eigenschaften gegen eine Vielzahl von Tumorzielstrukturen entwickeln. Ihre Anwendung finden Interleukine z.B. in der Therapie des Nierenzellkarzinoms mit IL-2 (Yang 2002).

Spezifische Ansätze werden ebenfalls in aktiv und passiv wirksame Formen unterschieden und sollen das Immunsystem speziell gegen eine gezielte Erkrankung stimulieren.
Im Rahmen des spezifisch-aktiv wirksamen Ansatzes erfolgt die Kopplung eines spezifischen Substrates, wie z.B. Tumorzellextrakte oder Tumorantigene, an ein nicht spezifisches Adjuvans. Dadurch soll die körpereigene Abwehr zur Ausbildung einer Immunantwort gegen das spezifische Substrat stimuliert werden. Hierbei stehen Vakzine mit gereinigten oder rekombinanten Antigenen oder mit Tumorzellextrakten beladene dendritische Zellen (DC), die als professionelle Antigen-präsentierende Zellen wirken, zur Verfügung (Gao 2008). Antigen-basierende Vakzine findet man zum Beispiel in den Therapiekonzepten des kolorektalen Karzinoms. Eine Weiterentwicklung aktiver Vakzine zur Stimulation einer tumorspezifischen T-Zell-Immunität stellen synthetische MHCI und MHCII Tumorpeptide dar, die entweder alleine oder in Form zellulärer Vakzine, wie z.B. dendritische Zellen, die mit Tumorpeptiden beladen werden, appliziert werden.
Untersuchungen von Smith et al. mit gp100, welches ein spezifisches Antigen des Melanoms darstellt und zu den Klasse-I-Peptiden zählt, zeigten, dass bei 28 von 29 Patienten die Entwicklung einer Peptid-spezifischen Immunität der CD8+ T-Zellen nach Vakzinierung mit modifiziertem gp100 zu verzeichnen war (Smith 2003). Speiser et al. erweiterten diesen Ansatz und kombinierten die Immunisierung mit MART1 als Melanom-spezifisches Antigen mit CpG, einem bekannten Trigger des toll-like-Rezeptors (TLR) dendritischer Zellen. Sie verzeichneten eine signifikante Zunahme MART1-spezifischer, zytotoxischer CD8+ T-Zellen bei Patienten mit fortgeschrittenem Melanom (Speiser 2005). Vergleichbare Arbeiten gibt es auch mit Klasse-II-Peptiden. Hierzu zählt der Wachstumsfaktor HER2/neu, der insbesondere beim Mammakarzinom, aber auch bei anderen Tumorentitäten überexprimiert wird. Disis et al. konnten bei

Patientinnen mit fortgeschrittenem Mammakarzinom, die eine aktive Immunisierung mit dem HER2/neu-Peptid erhalten haben, die Entwickelung spezifischer CD4+ T-Zellen nachweisen. Diese zeigten eine effektive Tumorspezifität mit entsprechender Steigerung antigenspezifischer Epitope der produzierten Antikörper *in vivo* (Disis 2004). Weiterhin zeigte sich, dass die Immunisierung mit Klasse-II-Peptiden nicht nur zur Entwicklung spezifischer CD4+ T-Zellen führen kann, sondern dass sich hierdurch auch anlog zytotoxische CD8+ T-Zellen entwickeln können (Dang 2007). Folglich scheint es also möglich zu sein, anhand der gewählten Vakzinierungspeptide die zelluläre Immunantwort gezielt stimulieren zu können.
Dendritische Zellen zählen zu der potentesten Zellpopulation im Hinblick auf Initialisierung und Aufrechterhaltung einer Immunantwort und spielen daher als mögliches Target in der Immuntherapie eine wichtige Rolle. Ziel ist die Induktion einer spezifischen T-Zellantwort durch Antigen-beladene dendritische Zellen. Hierbei werden naive monoklonale Zellen des Individuums isoliert. In mehreren Schritten erfolgt die Reifung und Differenzierung der DCs, wobei in diesem Prozess die Prägung mit Tumorzellextrakten, isolierten Antigenen, Peptiden oder Tumor-mRNA erfolgt. Anschließend werden die beladenen dendritischen Zellen in Form einer Vakzine dem Individuum erneut appliziert. Die Ergebnisse der klinischen Studien basierend auf diesem Verfahren sind bislang kontrovers. In einer klinischen Phase I/II Studie ließen sich durch die Vakzinierung mit Tumor-mRNA-beladenen dendritischen Zellen antigenspezifische CD8+ T-Zellen bei Patienten mit Prostata- und Nierenzellkarzinom nachweisen (Gilboa 2004). Prinzipiell erscheint also die Induktion einer spezifischen T-Zellantwort durch beladene DCs möglich. Hingegen konnte in einer Phase III Studie bei Patienten mit fortgeschrittenem malignem Melanom kein Benefit einer Immuntherapie mit Tumorpeptid-beladenen DCs gegenüber einer Standard-Chemotherapie nachgewiesen werden (Schadendorf 2006).

Des Weiteren zählen monoklonale anti-idiotypische Antikörper zu den spezifisch-aktiv wirkenden Substanzen. Diese agieren als Surrogat für ein charakteristisches Antigen (z.B. CA125) (Wagner 1997) und sollen eine spezifische Immunabwehr gezielt gegen dieses induzieren.

Zu der spezifisch-passiven Immunisierung zählen monoklonale und bispezifische Antikörpervakzine. Diese finden ihre regelmäßige Anwendung in der Therapie des Mamma- und Kolonkarzinoms sowie des NHL (Viani 2007, Willet 2004). Solche Antikörper sind gegen ein spezifisches Antigen gerichtet und sollen nach erfolgreicher Bindung an die Zielstruktur, wie z.B. der Tumorzelle über unterschiedliche Wirkungsmechanismen die Zerstörung dieser induzieren. Dabei können Antikörper allein oder auch als Konjugat mit daran gekoppelten Wirkstoffen, wie z.B. Enzyme, Toxine oder Radioisotope, zur Anwendung kommen (Palena 2010).

Immunsuppressive Verfahren zielen in der Onkologie darauf ab, die körpereigenen, immunsuppressiven Faktoren zu limitieren, bzw. auszuschalten. Der Ansatz geht davon aus, dass eine adäquate Immunantwort auf eine Krebserkrankung durch körpereigene Faktoren verhindert wird. Durch das Durchbrechen dieser Suppression soll eine immunologische Reaktion ermöglicht werden. Vertreter dieser Wirkgruppe sind Ipilumimab (anti-CTLA-4) und Ontak (anti-IL-2-Rezeptor) (Yang 2007, Li 2009).

Die folgende Tabelle bietet einen zusammenfassenden Überblick über die unterschiedlichen immuntherapeutischen Ansätze und ihre Anwendung (Tab. 3).

Therapieform	Substanz	Ziel-struktur	Tumorentität	Klinische Studie
Unspezifische Verfahren - aktive				
	Bacillus Calmette-Guérin (BCG)		oberflächliches Blasen-karzinoms	Zulassung zur Rezidiv-prophylaxe
	Levamisol		kolorektales Karzinom	Zugelassen in der adjuvanten Therapie des CRC
Unspezifische Verfahren - passive				
	IL- 2		Nierenzell-karzinom	Zugelassen in der adjuvanten first-line Therapie
	IFN α		Lymphome und solide Tumoren	Supportive Anwendung
	TNF α			
Spezifische Verfahren - aktiv				
Antigene/Peptid vakzine	Antigen-vakzine (z.B. ALVAC-CEA B7.1)	CEA	Kolon-Ca	Phase-I-Studien
	Tumorpeptid-vakzine	gp100	Malignes Melanom	Phase-III-Studien
		Her2/neu	Mamma-Ca	Phase-II-Studien
Zelluläre Vakzine	DC-basierende Vakzine	Her2/neu	Mamma-Ca	Phase-I-Studien
	Autologer T-Zelltransfer			Präklinische/ Phase-I-Studien
	Genetisch modifizierte T-Zellen			Präklinische Studien
	Genetisch modifizierte Tumorzellen		Nierenzell-Ca	Phase-I-Studie
Monoklonale Anti-Idiotypische Antikörper	Abagovomab	CA125	Ovarial-Ca	Phase-III-Studie

Therapieform	Substanz	Ziel-struktur	Tumorentität	Klinische Studien
Spezifische Verfahren – passiv				
Monoklonale Antikörper	Rituximab	CD20	B-Zell-NHL	Zulassung in der First-line-Therapie
	Trastuzumab	Her2/neu	Mamma-Ca	Zugelassen in der adjuvanten Therapie
	Bevacizumab	VEGF	Colon-Ca	Zugelassen in der adjuvanten Therapie
Radioimmunkonjugate	^{90}Y-muHMGF1	MUC1	Ovarial-Ca	Phase-III-Studie
Bispezifische Antikörper	Removab	EpCAM / CD3	Ovarial-Ca	Phase-I/II-Studien
Supprimierende Verfahren				
Monoklonale Antikörperkonstrukte	Ontak	IL-2-R	Kutanes T-Zell-Lymphom	Zulassung in prim. Therapie (USA)
	Ipilimumab	CTLA-4	Malignes Melanom	Phase-III-Studien

Tabelle 3: Übersicht der verschiedenen Ansätze der Immuntherapie von Tumoren

I.2.1. Monoklonale Antikörper

Von besonderem Interesse sind die monoklonalen Antikörper. Diese sind, wie der Name schon sagt, nur gegen ein einziges Epitop gerichtet. Bezüglich ihrer Entwicklung lassen sie sich in murine, chimäre, humanisierte und humane Antikörper unterscheiden. Monoklonale Antikörper werden bereits bei vielen Erkrankungen und nicht nur im Bereich der Onkologie erfolgreich eingesetzt. Dabei definiert das betreffende Zielantigen die Bindungsstelle, das Paratop, des Antikörpers. Zum heutigen Zeitpunkt sind bereits mehrere Tumorantigene beschrieben, die als Zielantigen für die Entwicklung monoklonaler Antikörper fungieren (Disis 2009). Einige davon sind, wie z.B. MUC1,

Zellmembranproteine oder sekretorische Proteine, wie z.B. CEA. Andere wiederum erfüllen Schlüsselfunktionen im Zellzyklus. So reguliert p53 die Apoptose und HER2/neu ist ein überexprimierter Wachstumsfaktor (Dissis 2009). Zurzeit werden tumorspezifische monoklonale Antikörper, die wichtige Schlüsselfunktionen der Tumorgenese blockieren (z.B. Signaltransduktion durch anti-Her2/neu MAK Herceptin; Blockade der Angiogenese durch den anti-VEGF-MAK Avastin), bereits erfolgreich in der Tumortherapie eingesetzt (Weiner 2009) (Tab.3).

Anderseits können Antikörper (AK) auch als aktive Tumorvakzine eingesetzt werden. Mit dem Ziel, die körpereigene Abwehr der Erkrankten zu stimulieren und aktivieren, soll der Organismus in der Lage ist, die Tumorzellen selbst zu zerstören. Die Wirkung beruht auf der Induktion zytotoxischer Effekte gegen die Tumorzelle durch Interaktion mit dem Komplementsystem oder mit den Effektorzellen (Weiner 2009). Die Komplement-vermittelte Zytotoxizität (CDC) entsteht durch direkte Aktivierung der Komplementkaskade. Die Wirkung von sekundären Effektormechanismen erfordert zunächst die Aktivierung von Effektor-T-Zellen. Die resultierende Immunantwort wird als Antikörper-abhängige zelluläre Zytotoxizität (ADCC) bezeichnet. Für beide Wirkmechanismen ist die Fc-Domäne des AK entscheidend (Sulica 2001). Hierbei zeigte sich der Fc-Anteil von humanem IgG1 als besonders effizient.

Die folgende Abbildung (Abb. 1) zeigt das Modell eines möglichen Wirkungsmechanismus zur Entwicklung einer ADCC. Nach Bindung des Antikörpers an ein Tumorantigen können Fcy-Rezeptor-tragende Effektor-T-Zellen an die Fc-Domäne des AK binden und dadurch aktiviert werden. Anschließend sind zwei Optionen möglich: zum einen die direkte Lyse der Tumorzelle, zum Anderen die Phagozytose des Antikörper-Tumorzelle-Komplexes. Beides führt zum „processing“ des Tumorantigens und anschließender Präsentation über MHC I oder II. Das wiederum führt zur Initialisierung einer tumorspezifischen, adaptiven Immunität. Wird das Antigen über MHC I präsentiert, kommt es zur Induktion tumorspezifischer zytotoxischer T-Zellen. Erfolgt die Präsentation über MHC II, wird durch die Aktivierung antigenspezifischer T-Helfer-Zellen die Produktion tumorgerichteter Antikörper generalisiert (Weiner 2009).

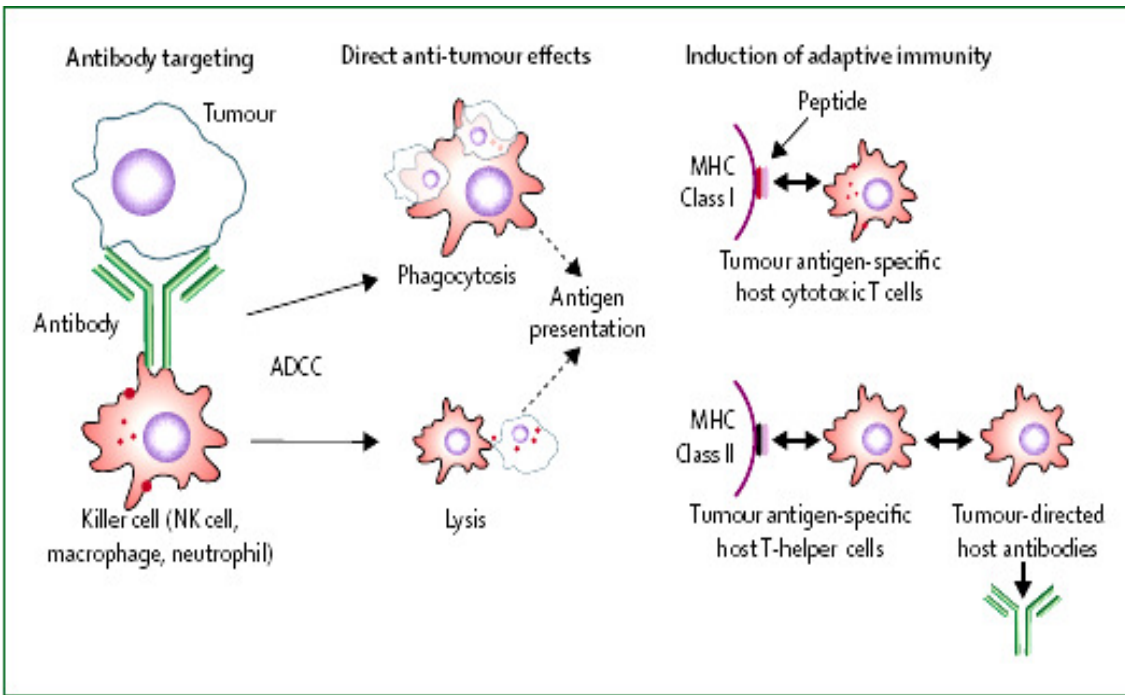


Abbildung1: Mögliches Modell zur Entwicklung einer Antikörper-abhängigen zellulären Zytotoxität (ADCC) (Quelle: Weiner 2009)

Die aktive Immuntherapie mit monoklonalen Antikörpern beruht auf der sogenannten Idiotypen-Netzwerk-Theorie von Jerne. Die Hypothese basiert auf dem dualen Charakter des Antikörpermoleküls: Es kann Antigene mit seiner Bindungsstelle, dem Paratop, das sich aus verschiedenen Idiotopen zusammensetzt, erkennen. Seine Idiotope können wiederum selbst als antigene Strukturen (also als Epitop) von anderen Antikörpern erkannt werden (Jerne 1974; Cerny 1990).

Darauf basierend führt die Immunisierung mit einem charakteristischen Antigen (in diesem Fall TAA = tumor-assoziiertes- Antigen) im Sinne der humoralen Immunabwehr zur Produktion von Antikörper, die gegen dieses Antigen gerichtet sind. Sie werden als idiotypische Antikörper (Ab1) bezeichnet. Diese induziert wiederum die Generierung von Antikörper, die gegen Ab1 gerichtet sind und als Ab2 bezeichnet werden. Einige dieser Ab2- Antikörper können effektiv die dreidimensionale Struktur von äußeren Antigenen imitieren. Diese besonderen Antikörper, Ab2β, passen in das Paratop des Ab1 und können eine spezifische Immunabwehr auslösen, die vergleichbar der Reaktion gegen das nominale Antigen ist. Ab2β-AK werden als so genannte anti-idiotypische

Antikörper vom β-Typ bezeichnet und zeigen das „innere Abbild“ des Antigens. Sie können somit als Surrogat-Antigen fungieren und im Rahmen einer Immunisierung die Entwickelung von anti-anti-idiotypischen Antikörpern induzieren. Diese sogenannten Ab3 können das korrespondierende Originalantigen erkennen. Aufgrund dieser Ab1-ähnlichen Reaktivität wird der Ab3 auch Ab1´ genannt. Somit wird auch angedeutet, dass dieser sich in seinen anderen Idiotopen vom Ab1 unterscheiden kann.

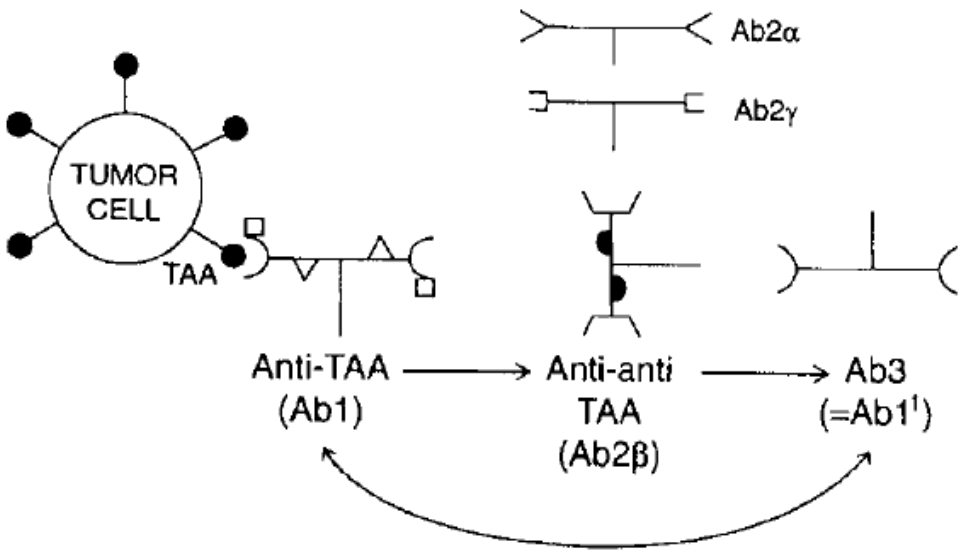


Abbildung 2: graphische Darstellung der Anti- idiotypische Kaskade im kurzen Überblick (Foon 2001)

Beruhend auf diesen Grundlagen wurden bereits verschiedene Antikörper aus der Reihe der Ab1 und Ab2 entwickelt und therapeutisch eingesetzt. Ein Vorteil der Antikörper-basierenden Immuntherapie gegenüber der konventionellen Chemotherapie ist das günstige Nebenwirkungsprofil. Nur in den seltensten Fällen wurden schwerwiegende Komplikationen beobachtet. Dies ist einer der Gründe, warum weiterhin Forschung und Entwickelung auf diesem Gebiet wichtig sind und dieser Behandlungsansatz sicherlich auch in Zukunft erfolgreich seinen Stellenwert in der onkologischen Therapie behaupten wird.

I.2.2. Immuntherapie beim Ovarialkarzinom

Im Gegensatz zu anderen Malignomen, wie z.B. Herceptin beim Mamma-Ca, gibt es bislang keinen standardisierten Einsatz von Immunmodulatoren beim Ovarialkarzinom.

In den Recherchen nach immunologischen Ansätzen in der Therapie des OK finden sich nicht nur antikörperbasierende Strategien, sondern auch Konzepte mit synthetischen Tumorpeptiden oder zelluläre Therapien, wie z.B. DCs und modifizierte Tumorzellen. Die Meisten befinden sich noch in der präklinischen Phase oder in frühen Stadien der klinischen Prüfung. Die Vielfalt der Ansätze spiegelt jedoch die rege Forschungsarbeit auf diesem Gebiet im Rahmen der Entwicklung neuer mulimodaler Therapiekonzepte wieder. Die folgende kurze Darstellung (Tab. 4) zeigt die erfolgversprechendsten Ansätze in der Immuntherapie des Ovarialkarzinoms.

Therapieansatz	**Substanz**	**Zielantigen**	**Klinischer Status**
Antigene/Peptid-vakzine	Herceptin	Her2/neu	Phase II-Studie (Gordon, 2006)
	NY-ESO1	NY-ESO1 / HLA I/II	Phase II-Studie (Odunsi, 2007)
Zelluläre Vakzine	DC-Partikel	Her2neu/MUC1	Pilotstudie (Brossart, 2000)
Virale Vektoren	Alphavirus	multipel	Phase I / II-Studie (Quentglas, 2010)
Antikörper			
Monoklonale Antikörper	Abagovomab	CA 125	Phase II/III-Studie (Wagner et al)
	Oregavomab	CA 125	Phase II-Studie (Ehlen 2005)
Bispezifische Antikörper	Removab	EpCAM / CD3	Phase I/II-Studie (Burges 2007)
Hemmung der Angiogenese	Bevacizumab	VEGF	Phase II-Studie (Burger 2007)
Hemmung der Immunsuppression	Ipilimumab	CTLA-4	Phase I-Studie (Hodi 2008)

Tabelle 4: Klinische Studien zur Immuntherapie mit Antikörpern bei Patientinnen im fortgeschritten OK- Stadium

I.3. CA 125 als Zielstruktur für die Immuntherapie des Ovarialkarzinoms

Das tumorassoziierte Antigen CA125 wird auf über 80% der Ovarialkarzinome (OK) exprimiert, auf normalem Gewebe ist es jedoch auch regelmäßig in geringen Raten nachweisbar (z.B. Tuben, Ovarien, Endometrium und Serosa von Peritoneum und Pleura). Als Screening-Parameter ist CA125 daher nicht brauchbar. Es wird jedoch routinemäßig als Tumormarker in der Verlaufsdiagnostik eingesetzt.

CA125 ist ein außergewöhnlich großes und komplexes Transmembranprotein von 3,5 MDa, dessen physiologische Funktion noch nicht endgültig geklärt ist. Spekuliert werden unterschiedliche Funktionen, die den maligen OK-Typ vom benignen unterscheiden.

Dabei scheint es sehr wahrscheinlich, dass CA125 eine wichtige Rolle im Rahmen der Adhäsion, Invasion und der peritonealen Metastasierung über Interaktion mit Mesothelin einnimmt (Rump 2004). Des Weiteren existieren Hinweise, dass es immunsuppressive Eigenschaften hat, da zytotoxische T-Zellen in Anwesenheit von CA125 in ihrer lytischen Eigenschaft inhibiert werden (Patankar 2005). Die Ergebnisse genannter und weiterer Arbeiten bieten Erklärungsansätze, warum CA125 als Tumor-assoziiertes Antigen (TAA) selbst nur gering immunogen ist (Scholler 2007).

Über die Regulation der CA125-Expression ist ebenfalls nur sehr wenig bekannt. Studien deuten auf Faktoren, wie Phosphorylierung von Threonin/Serin oder Tyrosinresten, Aktivierung von Wachstumsfaktoren, wie z.B. VEGF, sowie Aktivierung des P13K-AKT, MAPK- und STAT-Phathways, hin (O´Brien 2001; Adrianifahanana M. 2006).

Vor diesem Hintergrund erscheint das CA125-Tumorantigen als interessantes Target im Rahmen einer gerichteten Immuntherapie des OK.

I.4.1. Der anti-idiotypische Antikörper Abagovomab (ACA 125)

In einer retrospektiven Analyse konnte 1993 gezeigt werden, dass sich bei 28 von 58 Patientinnen, die eine Immunszintigraphie mit dem monoklonalen Antikörper OC125 (MAK OC125 = Ab1) erhalten haben, anti-idiotypische Antikörper (Ab2) entwickelt haben, welche das CA125 imitierten. Diese Patientinnen fielen durch eine vergleichsweise höhere Überlebensrate auf. In einer daraufhin durchgeführten prospektiven Studie mit dem MAK OC125 konnte diese Beobachtung bestätigt werden. Des Weiteren zeichnete sich eine Abhängigkeit von der Applikationsdauer ab (Wagner U. 1993-1995).
Vor dem Hintergrund der infausten Prognose des OK und der Notwendigkeit weiterer adjuvanter Therapieoptionen, führten diese positiven Ergebnisse im Bereich der Immunmodulation zu der Entwicklung des murinen monoklonalen Antikörper Abagovomab (ACA125), welches das TAA CA125 funktionell imitiert und somit einen „internal imaging“-Antikörper darstellt. In präklinischen Studien mit Abagovomab an Ratten konnte die Produktion von IgG und IgM- Antikörper, die sowohl an Abagovomab als auch an CA125 binden, festgestellt werden. Neben dieser humoralen konnte auch eine zellspezifische Immunreaktion gegen CA125-exprimierende Tumorzellen im Tiermodell ermittelt werden (Wagner U. 1993-1995; Schlebusch 1995).

1.4.2. Klinische Studien

Es folgte eine klinische Studie mit zunächst kleinen Fallzahlen. Hier konnten bei 9 von 16 Patientinnen Antikörper gegen Abagovomab (Ab3) nachgewiesen werden. Bei diesen 9 zeigte sich eine Lyse von CA125-tragenden Tumorzellen durch ihre peripheren Blutlymphozyten und eben bei diesen Patientinnen bestand auch klinisch ein deutliches Benefit sowie ein verlängertes Überleben bzw. progressionsfreies Intervall (statistisch aufgrund der geringen Fallzahl jedoch nicht signifikant). Begleitet wurde die Bildung der Ab3 durch erhöhte IFNy-Konzentrationen (Wagner U. 1997).

Zur Bestätigung dieses Ergebnisses folgte eine Studie mit insgesamt 42 Patientinnen im fortgeschrittenen Stadium (FIGO III-IV) der Erkrankung, die bereits eine operative Intervention und platinhaltige Chemotherapie erhalten haben. Die Bildung von Ab3 konnte bei 28 von 42 (66,7%) nachgewiesen werden. Diese Patientinnen fielen durch einen signifikanten Überlebensvorteil auf:19,9 +/- 13,1 Monate bei Pat. mit pos. Immunantwort vs. 5,3 +/- 4,3 Monate ohne Bildung von mAB3 ($p < 0,0001$) (Wagner U. 2001). Erfreulicherweise zeigte der eingesetzte Antikörper daneben auch ein günstiges Nebenwirkungsprofil. Diese Ergebnisse konnten in einer Fortführung der Studie an insgesamt 119 Patientinnen bestätigt werden (Reinartz S. 2004).
Des Weiteren wurden zwei Dosisfindungsstudien, bei denen unterschiedliche Dosierungen und Immunisierungsrouten (0,2mg vs. 2mg, s.c. vs. i.m.) bzw. Anzahl der Immunisierungen (AGO-OVAR 2.8.: 6 vs 8 Applikationen von 2mg s.c.) miteinander verglichen wurden, durchgeführt. Alle Patientinnen hatten nachweislich ein epitheliales OK oder Tubenkarzinom mit Peritonealkarzinose im Stadium FIGO III–IV, wurden entsprechend der evidenten Therapie bereits operiert und hatten eine platinhaltige Chemotherapie erhalten. Die Ergebnisse der ersten Dosisfindungsstudie zeigten, dass die gewählten Dosierungen und Immunisierungsrouten keinerlei Einfluss auf die Immunantwort hatten (Sabbatini 2006).

Die Proben dieser Arbeit entstammen der Phase I/II-Studie, die unter der Leitung der AGO-OVAR durchgeführt wurde.
Insgesamt 36 Patientinnen wurden randomisiert in die beiden Studienkollektive aufgenommen. Die zentrale Frage war, inwiefern die Anzahl der Immunisierungen (short arm: 6 versus long arm: 9 Applikationen) die Induktion und Aufrechterhaltung der tumorgerichteten B- und T-Zellfunktion beeinflusst.
Es wurden jeweils vor Therapiebeginn und im weiteren Verlauf immer unmittelbar vor der nächsten Vakzinierung und 2 bzw. 6 Wochen nach Beendigung der Therapie Vollblutproben abgenommen und eine systematische Untersuchung auf tumorspezifische Antikörper und T-Zellantworten (IFNy-Expression nach CA125-Exposition) durchgeführt. Unabhängig von der Anzahl der Applikationen konnten Antikörper gegen den Impfstoff (Ab3) bei allen Patientinnen nachgewiesen werden. 76,5% (long arm) bzw. 56,3% (short arm)

der Patientinnen entwickelten CA125-spezifische Antikörper (Ab1`). Insgesamt wurden CA125-spezifische T-Zellantworten bei 12 Patientinnen dokumentiert. Als Endergebnis scheinen die Patientinnen im Studienarm mit den 9 Immunisierungen im Hinblick auf die CA125-spezifische Immunresponse tendenziell zu profitieren.

I.4.3. Offene Fragen und Konsequenzen

Nach Abschluss der bisherigen Phase II-Studien mit Abagovomab bleibt festzustellen, dass eine positive Korrelation zwischen der humoraler Immunresponse (Bildung von Ab1´und Ab3–AK) und dem Überleben besteht. Der genaue Wirkungsmechanismus ist jedoch weitestgehend unklar. Eine Möglichkeit wäre die Induktion einer Antikörper-vermittelten Zytotoxizität (ADCC) gegen CA125-exprimierende Tumore durch Ab1´-Antikörper (Chien-fu Hung 2008; Reinartz S. 2006). Anderseits wird spekuliert, dass der Nachweis einer positiven AK-Antwort ein Surrogatmarker für eine spezifische zytotoxische T-Zellantwort sein könnte.
Die o. g. Studie zeigte jedoch auch, dass ein CA 125-spezifische Response nicht bei allen Ab1´/Ab3- positiven Patientinnen, bzw. in den meisten Fällen nur transient nachweisbar war. Daraus ergibt sich die Frage, inwiefern das immunologische Ansprechen auf Abagovomab durch negative Immunmodulationsmechanismen, die durch Tumor–Host-Interaktion induziert werden, beeinflusst wird.

Eine wichtige Rolle spielt hierbei das so genannte „Tumor-Escape-Phänomen“ im Rahmen der Onkogenese. Zum besseren Verständnis der „*Immunosurveillance“* von Malignomen kann dieser Prozess in drei Stadien eingeteilt:

Stadium 1: *Elimination*
In dieser Phase ist das kompetente Immunsystem in der Lage die veränderten Zellen zu zerstören, bzw. das weitere Wachstum zu unterbinden.

Stadium 2: *Equilibrium*

Sollte die vollständige Elimination nicht erfolgreich gewesen sein, verbleiben Tumorzellen im Organismus. In dieser Phase halten sich Tumorprogredienz sowie Destruktion der malignen Zellen die Waage.

Stadium 3: *Escape*

Erst in dieser dritten Phase wird die Erkrankung klinisch detektierbar. Das Gleichgewicht verschiebt sich zugunsten des Tumorwachstums. Warum das kompetente Immunsystem eines gesunden Individuums nicht in der Lage war, ist und bleibt die malignen Zellen zu zerstören, ist nach wie von nicht vollständig geklärt.

Es gibt mittlerweile mehrere Erklärungsansätze zum „Tumor-Escape-Phänomen“ (Dunn 2004). Einige davon sollen hier kurz erwähnt werden.

- Veränderungen der Tumorzelle:
  - Variabilität der Tumorantigen-Expression (‚Antigen-Loss-Varianten’)
- Veränderungen der Antigenpräsentation (z.B. in dendritischen Zellen):
  - down-Regulation von MHCI Molekülen
  - Defizite im Antigenprozessing
  - fehlende Expression costimulatorischer Moleküle
- Beeinträchtigung der T-Zellfunktion:
  - Induktion von T-Zellanergie und klonale Depletion reaktiver T-Zellen
  - Veränderung der T-Zellsignaltransduktion
  - Apoptoseinduktion in aktivierten T-Zellen (Fas, TRAIL, B7/H1)
- Induktion einer Immunsuppression:
  - Sekretion immunsuppressiver Faktoren durch die Tumorzelle (z.B. IL- 10, TGF-ß)
  - Induktion von Suppressorzellen z.B. regulatorische T-Zellen (Treg)

In histologischen Schnitten von operativ entferntem Tumorgewebe finden sich regelmäßig Infiltrate von Zellen aus dem Immunsystem. Hierbei ist auffällig, dass es insbesondere regulatorische T-Zellen sind, die regelmäßig in signifikant hohen Anzahl sowohl im Tumorgewebe selbst als auch in der unmittelbaren

Umgebung und in den drainierenden Lymphknoten zu finden sind. Wie in der Arbeit von Bonertz gezeigt, kann es zu tumorbedingter Induktion antigenspezifischer Tregs kommen (Bonertz 2009). Dies lässt wiederum die Schlussfolgerung zu, dass die Vakzinierung mit monoklonalen Antikörpern ebenfalls spezifische Tregs induzieren könnte, was sich in einer sistierenden Antikörper-vermittelten immunologischen Reaktion äußern könnte (Wada 2009, Nakai 2009).
Als Konsequenz soll nun in der folgenden Arbeit die Rolle der regulatorischen T-Zellen im Therapieverlauf und dem nachfolgenden Beobachtungszeitraum der zugrunde liegenden AGO-Studie untersucht werden.

I.5. Regulatorische T- Zellen

Die Forschungsergebnisse der letzten Jahre zeigen, dass regulatorische T-Zellen, so genannte „Tregs“, eine entscheidende Rolle in der Entwicklung und dem Progress von Neoplasien einnehmen.
Bereits vor dreißig Jahren entstand die Vorstellung von einer Lymphozytenpopulation mit supprimierenden Eigenschaften (Powell 1982). Man beobachtete, dass thymektomierte Mäuse wenige Tage postnatal schwere Autoimmunerkrankungen entwickelten (Asano 1996). Somit erschien der Thymus als Ursprungsort dieser Population als wahrscheinlich. Jedoch konnte zu diesem Zeitpunkt weder der Phänotyp noch der zugrunde liegende Mechanismus näher beschrieben werden.
Erst viel später konnte gezeigt werden, dass CD4+ T-Zellen mit konstitutiver Expression von CD25 (IL-2-Rezeptor-α-chain) für diesen Effekt verantwortlich sind (Sakagushi S. 1995; Ng W.F. 2001). Und es dauerte noch weitere Jahre, bis nachgewiesen werden konnte, dass der Transkriptionsfaktor FoxP3 wesentlich an der Entwicklung und Funktion dieser regulatorischen T-Zellen, beteiligt ist (Hori S. 2003).

Regulatorische T-Zellen machen circa 5-10 % aller peripheren CD4+ T-Lymphozyten aus (Wing 2006). Die Funktion und klinische Relevanz dieser

Population wurde bereits an mehreren Erkrankungen beschrieben. So konnte gezeigt werden, dass bei bestimmten Autoimmunerkrankungen, wie z.B. Diabetes mellitus, multiple Sklerose, Psoriasis und Myasthenia Gravis, sozusagen ein relativer „Mangel“, bzw. Dysfunktion der Tregs vorliegt. Da regulatorische T-Zellen eine gegen körpereigene Zellen gerichtete Immunreaktion hemmen, kommt es durch das Fehlen dieser natürlichen T-Zell-Inhibition zu autoimmunen Prozessen, die sich in den beispielsweise oben genannten Erkrankungen klinisch manifestieren können (Lindley 2005; Kondelkova 2010).
Zudem konnte in Untersuchungen bei Patienten mit malignem Melanom, Kolon-, Mamma- und Ovarialkarzinom eine erhöhte intratumorale und periphere Konzentration regulatorischer T-Zellen nachgewiesen werden (Wolf A.M. 2003; Liyanage U.K. 2002). Bei diesen Tumorentitäten konnte ferner gezeigt werden, dass dieses Phänomen mit einer schlechteren tumorgerichteten Immunreaktion und somit mit einer schlechteren Prognose einhergeht (Wolf D. 2005; Curiel T 2004).
Des Weiteren wird regulatorischen T-Zellen eine wichtige Rolle in der Infektiologie und Transplantationsmedizin zugeschrieben.

I.5.1. Phänotypisierung regulatorischer T-Zellen

Aufgrund der großen Heterogenität und Plastizität regulatorischer T-Zellen ist die Charakterisierung über Oberflächen– und intrazelluläre Marker problematisch. Zu den zurzeit geläufigen Charakteristika regulatorischer T-Zellen zählen neben den unspezifischen CD4 und CD25 weiterhin das CTLA-4, GITR und insbesondere das FoxP3. Im Folgenden sollen diese kurz erläutert.

I.5.1.1. CD25

Als CD25 wird die α-Kette des Interleukin-2-Rezeptors bezeichnet. Es bildet zusammen mit der β-Kette (CD122) den kompletten Rezeptor für das Zytokin. Sein Ligand IL-2 ist ein wichtiger Aktivierungs- und Wachstumsfaktor der T-

Zellen. Es unterstützt im Falle der Tregs die TGFβ-induzierte Expression von FoxP3 sowie CD25 und CD122 (α + β-chain des IL-2-Rezeptors). Regulatorische T-Zellen benötigen zwar IL-2 zur Aufrechterhaltung ihrer Funktion, sind aber nicht in der Lage es selbst zu produzieren. Dies kann unter anderem auf die Expression von CD25, CTLA-4 und FoxP3 zurückgeführt werden, welche die Produktion dieses Zytokins hemmen sollen (Burchill M.A. 2007). Dieser relative Mangel führt wiederum zu einer reflektorischen Hochregulierung des IL-2-Rezeptors.

Auf Effektor-Zellen wirkt IL-2 nicht nur aktivierend im Rahmen einer immunologischen Antwort. Es spielt auch eine wichtige Rolle dabei, die Zelle vor Anergie und Apoptose zu bewahren. CD25 ist in der Lage die IL-2-Produktion der Effektor-T-Zellen zu hemmen, und somit deren Aktivierung und Immunantwort zu unterbinden. Außerdem unterstützt es den Zellzyklus-Arrest von CD4+ und CD8+ Effektor-Zellen.

Natural Tregs exprimieren diesen Marker konstitutiv und werden in der Literatur als $CD25_{high}$ positiv bezeichnet. Da CD25 auch auf aktivierten T-Zellen transient exprimiert wird, ist es als alleiniger Marker regulatorischer T-Zellen nicht ausreichend.

I.5.1.2. FoxP3

FoxP3 gehört zu den Proteinen der Forkhead-Familie und wird intrazellulär exprimiert. Von diesen ist bekannt, dass sie zelluläre Differenzierungsprozesse steuern (Hori S. 2003). In *in vitro* Versuchen konnte gezeigt werden, dass FoxP3 an DNA-Sequenzen in der Promotorregion von Zytokinen, wie IL-2, bindet. Dort unterdrückt es als transkriptioneller Repressor die NFAT- und NFκB induzierte Zytokinexpression. Es scheint aber auch in der Lage zu sein, mit diesen direkt zu interagieren (Bettelli 2005). Daraus resultiert eine reduzierte IL-2-Produktion, welches wiederum für die Aktivierung von T-Zellen benötigt wird.

In Kombination mit CD25 ist FoxP3 zurzeit der beste Marker dieser Population. Es konnte jedoch auch auf aktivierten T-Zellen transient nachgewiesen werden. Zurzeit liegen Untersuchungsergebnisse vor, die eine Differenzierung zwischen dem FoxP3 regulatorischer T-Zellen und aktivierter T-Zellen anhand des Methylierungsstatus ermöglichen sollen (Janson P.C.J. 2008).

I.5.1.3. CTLA-4

Als das ***c**ytotoxic **T**-lymphocyte **a**ntigen-**4*** (CTLA-4), wird ein costimulatorischer Rezeptor der T-Zellen mit inhibitorischer Funktion im Hinblick auf die T-Zell-Aktivierung, bezeichnet.
Seine beiden Liganden CD80 und CD86, zusammen als B7 bezeichnet, teilt es mit CD28, einem T- Zellaktvierenden costimulatorischen Rezeptor. Jedoch hat CTLA-4 eine weitaus höhere Affinität zu B7 als CD28, sodass schon eine geringe Expression an der Zelloberfläche eine Hemmung der T-Zell-Aktivierung bewirken kann.
CTLA-4 ist ein intrazelluläres Antigen und ist daher in naiven T-Zellen kaum nachweisbar. Unter Stimulation des T-Zell-Rezeptors (TCR) wird es an die Zelloberfläche transportiert. Aktivierte T-Zellen weisen also innerhalb kurzer Zeit eine erhöhte CTLA-4-Expression auf. Auf regulatorischen T-Zellen wird CTLA-4 jedoch konstitutiv an der Zellmembran exprimiert. Dadurch gewinnt es als Marker dieser Population an Bedeutung. Des Weiteren gibt es in verschiedenen Studien Hinweise darauf, dass es eine wichtige Rolle bei der Treg-vermittelten Suppression, vor allem bei der zellkontaktabhängigen, spielt.
CTLA-4 erfüllt vielfältige Funktionen. Zum einen limitiert es die Produktion von IL-2. Zum anderen hemmt es die TCR-vermittelte Induktion von essenziellen Zellzyklus-Komponenten, wie z.B. cdk4, cdk6 und cyklin D3, welche für die G0/G1-Progression notwendig sind. Diskutiert wird in diesem Zusammenhang auch die IDO-3-abhängige Tryptophankatabolie der DCs (Beissert 2006).

I. 5.1.4. GITR

Das *Gluccorticoid-induced TNFR-related gene* (GITR) gehört zur *TNFR-superfamily* und wird durch seinen Liganden aktiviert. Es wird jedoch ebenfalls nicht ausschließlich auf Tregs exprimiert, sondern ist auch auf CD8+ und CD4+ Effektor-T-Zellen nachweisbar.
Die Bindung zwischen Rezeptor und Ligand wirkt aktivierend auf die Zielzelle. Auf regulatorischen T-Zellen kommt es durch diese Interaktion zum Überwinden des für die inhibitorische Funktion wichtigen anergen Zustandes und dadurch zum Verlust der suppressiven Funktion. Somit erscheint GITR als

ein negativer Modulator der suppressiven Treg-Funktion.
Es ist jedoch kein essenzieller Schlüsselfaktor in der Funktion regulatorischer T-Zellen. So konnte gezeigt werden, dass Tregs von GITR-/- knockout Mäusen genauso inhibitorisch wirken und ihre Funktion ausüben, wie WT-Tiere (Ronchetti 2004).

I. 5.1.5. Bekannte T-Zell- Populationen mit regulatorischer Wirkung

Von den *natural* Tregs unterscheidet man heute noch weitere Lymphozytenpopulationen mit suppressiven Eigenschaften, sogenannte *aquired* oder *adoptiv* Tregs. Dazu gehören die CD4 exprimierenden Typ1- und Th3-T-Zellen sowie Subpopulationen CD8+ T-Zellen. Sie unterscheiden sich sowohl in ihrem Phänotyp als auch durch ihre suppressiven Mechanismen voneinander (Abb. 3).

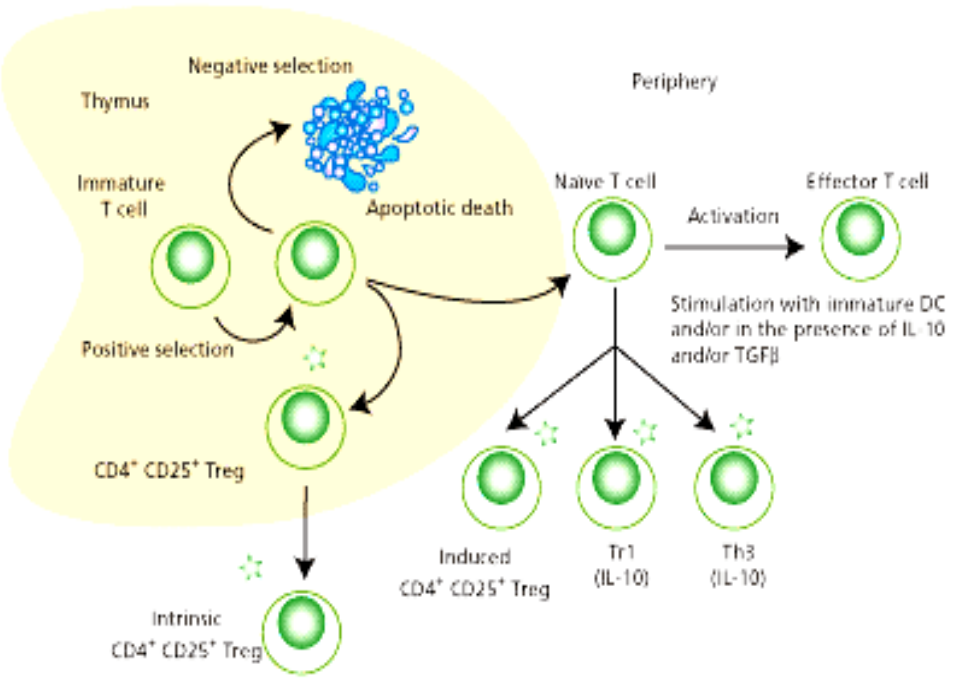


Abbildung 3: Übersicht regulatorischer T-Zellen (aus: BD Biosciences, Regulatory T cells)

I. 5.1.5.1. Natural Tregs

Natural Tregs reifen bereits pränatal im Thymus heran und werden dort spezifisch geprägt. In einem Maus-Modell konnte gezeigt werden, dass es spezielle Thymozyten gibt, die CD4 und CD25 exprimieren und für den Reifungsprozess speziell dieser Zellpopulation verantwortlich sind (Sakaguchi 1995; Tellier 2006).

Als weiterer essenzieller Faktor in der Generierung regulatorischer T-Zellen ist der Transkriptionsfaktor FoxP3 zu nennen. Ohne diesen sind Tregs nicht in der Lage ihre Funktion zu erfüllen. Das IPEX-Syndrom stellt ein Beispiel für dessen klinische Relevanz im Immunsystem dar. Dabei liegt ein genetischer Defekt vor, bei dem kein funktionell wirksames FoxP3 generiert werden kann. Als Folge dessen kommt es zu multiplen autoimmunen Prozessen gegen verschiedenste Gewebetypen. Die Patienten entwickeln Erkrankungen, wie zum Beispiel Diabetes mellitus Typ 1, allergische Ekzeme, respiratorische Allergien, Colitis und Erkrankungen aus dem rheumatoiden Formenkreis, um nur einige zu nennen (Ochs 2007).
Regulatorisch T-Zellen gehören zur Population der T-Helfer-Zellen. Sie exprimieren konstitutiv CD4, CD25*high* , FoxP3, CTLA-4, TGFβ, GITR und sind anerg. Das heißt, es ist nicht möglich sie mittels alleiniger TCR-Stimulation zu aktivieren, sondern nur in Anwesenheit von IL-2. Dieser anerge Zustand ist essenziell für die suppressiven Eigenschaften dieser Zellen (Takahashi 1998). Da sowohl FoxP3, CD25 als auch CTLA-4 die Eigenschaft haben, die Produktion des Wachstumsfaktors IL-2 zu hemmen, sind Tregs nicht in der Lage, es selbst zu produzieren und somit auf die parakrine Stimulation durch Effektor-T-Zellen, APCs und DCs angewiesen. Falls es demnach zu einer gesteigerten IL-2-Sekretion durch genannte Zellentitäten im Rahmen der T-Zellaktivierung kommt, führt die chemotaktische Zunahme der Treg-Frequenz oder aber auch die reflektorische Hochregulierung der genannten suppressiv wirksamen Treg-Peptide wiederum zu einer Hemmung der T-Zell-Aktivierung.

I. 5.1.5. 2. Adoptive Tregs

Tr1- T-Zellen

Tr1-Zellen wurden zum ersten Mal von Groux et al. 1997 in einem murinen System beschrieben. Im Gegensatz zu den *nat*Tregs, werden diese Zellen nach einer repetitiven TCR-Stimulation mit einem Antigen generiert. Im Gegensatz zu Effektor-Zellen proliferieren sie jedoch nicht, sondern inhibieren durch vermehrte Zytokinproduktion naive T-Zellen und Gedächtnis-T-Zellen.
Es ist im engeren Sinn keine einheitliche Population, sondern es sind schon mehrere Subtypen CD4+ T-Zellen beschrieben worden, die in der Lage waren die Immunantworten anderer T-Zellen über o. g. Mechanismus zu inhibieren.
Levings und Roncarolo konnten 2000 in einer Arbeit in *vitro* zeigen, dass sich Tr1-Zellen ebenfalls nach repetitiver Stimulation humaner CD4+ T-Zellen in Anwesenheit von IL-10 generieren lassen. Weiterhin demonstrierten Kemper und Mitarbeiter 2003 die Induktion solcher, durch Behandlung von ruhenden CD4+ T-Zellen mit anti-CD3/anti-CD46 Antikörpern in Anwesenheit des Wachstumsfaktors IL-2.
Allen Tr1-Zellen ist gemeinsam, dass sie CD4 exprimieren und ihre inhibitorische Wirkung hauptsächlich über eine massive Ausschüttung von IL-10 ausüben. Dabei ist zwar der Stimulus am TCR spezifisch, die Wirkung des Interleukins jedoch nicht. Die IL-10-vermittelte Immunsuppression kann durch Neutralisierung des Zytokins durch entsprechende Antikörper gehemmt werden (Vieira 2004).
Tr1-Zellen wird eine regulatorische *bystander*-Funktion in Bezug auf die T-Zellvermittelte Immunantwort bei Pathogenen, Allogenen und Malignomen zugeschrieben (Nicolson 2006). Ihre vorrangige Rolle scheinen sie jedoch in Autoimmunprozessen zu spielen (z.B. Pemphigus vulgaris: Toleranz gegen Desmoglein-3; Veldmann 2004).

Th3- T-Zellen

Th3-Zellen exprimieren wie Tr1-T-Zellen CD4 und wurden 1997 von Weiner in einem Maus-Modell zum ersten Mal beschrieben. Es scheint eine

Subpopulation der Th-Zellen zu sein, die durch orale Applikation von Antigenen induziert werden kann. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass sie in der Lage waren, sowohl Th1- als auch Th2-T-Zell-Klone in ihrer Aktivierung zu hemmen. Dies geschieht bei dieser Population hauptsächlich über eine enorme Ausschüttung von TGFβ und weniger des IL-10. Ihnen wird eine regulatorische *bystander*-Funktion in inflammatorischen und autoimmunen Prozessen zugeschrieben (Faria 2006).

CD8+ regulatorische T-Zellen

Neben CD4+ regulatorischen T-Zellen sind darüber hinaus auch CD8+ T-Zellen mit suppressiven Eigenschaften beschrieben worden. In diesem Zusammenhang kann man CD28-positive und CD28-negative Zellen differenzieren.

Cortesini beschrieb eine CD8+/CD28- Population, die ihre inhibitorische Funktion durch Inhibition der Hochregulation costimulatorischer Moleküle, wie CD80, CD86, CD54 und CD58, auf Antigen-präsentierenden Zellen auszuüben vermag (Cortesini 2001). Diese Subpopulation scheint eine Rolle in der Entwicklung einer systemischen Toleranz zu spielen (Nakamura 2003).
Daneben wurden CD8+/CD28+ T-Zellen beschrieben, die in der Lage waren auf dendritischen Zellen die inhibitorisch wirksamen *immunglobulin-like transcript factor* 3 und 4 hoch zu regulieren (Chang 2002).
Beide Populationen scheinen ihre suppressive Wirkung nicht primär an Effektor-T-Zellen, sondern sekundär über Modulation der APCs / DCs auszuüben.
Darüber hinaus wurde auf einer weiteren Subpopulation CD8+ reg. T-Zellen die zusätzliche Expression von CD122 beschrieben. Diese scheint analog den Tr1-T-Zellen die IFNy-Produktion ihrer Zielzellen durch IL-10-Sekretion zu limitieren. Ihre Rolle im Organismus soll in der Autoimmunitätstoleranz und der Regulierung des peripheren TCR-Repertoirs liegen (Beissert 2006).

I.5.2. Aufgaben regulatorischer T- Zellen

Autoimmunerkrankungen

Eine der Hauptaufgaben regulatorischer T-Zellen besteht in der sekundären Selektion von autoreaktiven Zellen. Schon während der Reifung, sowohl von T- als auch B-Zellen, werden Zellen, deren Epitope gegen körpereigene Antigene gerichtet sind, selektiert. Parallel dazu werden regulatorische T-Zellen durch Prägung mit körpereigenen Antigenen generiert. Sie sind für die periphere, so genannte sekundäre Selektion zuständig, um die noch verbliebenen, bzw. in der Peripherie durch Mutation neu entstandenen, autoreaktiven Zellen durch Funktions- und Aktivierungshemmung kontrollieren zu können (Beissert 2006).
Fehlt diese periphere Selektion, kommt es durch die `fehl gesteuerten` Effektorzellen zu autoimmunreaktiven Prozessen. Die Maximalvariante dieser Form ist das IPEX- Syndrom, bei dem es durch einen genetischen Defekt des FoxP3 zu multiplen autoimmunen Reaktionen kommt (Ochs 2007).

Inflammation

Eine weitere wichtige Rolle spielen regulatorische T-Zellen in der Generierung und Aufrechterhaltung einer adäquaten Immunantwort gegenüber Pathogenen. In diesem Prozess steigt die Produktion zellaktivierender Mediatoren, die primär der Aktivierung von Effektor- und Gedächtnis-Zellen dienen. Die Limitierung erfolgt durch Suppressor-Zellen, die ab einer bestimmten Konzentration dieser Mediatoren aktiviert werden. Sie verhindern über unterschiedliche Mechanismen eine überschießende Immunantwort und tragen so wesentlich zu einem Reaktionsgleichgewicht bei. In diesem Zusammenhang wird eine aktive Migration der Tregs zum „Ort des Geschehens“ über Chemokine oder die Generierung von Tregs *de novo* aus naiven CD4+CD25- T-Zellen diskutiert. Dabei wäre beispielsweise die Treg-Induktion aus naiven T-Zellen nach repetitiver TCR-Stimulation (Tr1) denkbar. Diskutiert wird in diesem Kontext auch die stimulationsinduzierte FoxP3-Expression (Wing 2006, Wei 2004).

Krebserkrankungen

Eine dritte wichtige Aufgabe ist diejenige, die auch hier untersucht werden soll: der Einfluss regulatorischer T-Zellen in der Immunkompetenz bei Krebserkrankungen.
Dieses Thema beschäftigt die Forschung schon seit einigen Jahren und es konnte in vergangenen Untersuchungen bei Patienten vor allem mit epithelialen Tumoren, wie zum Beispiel dem malignen Melanom, Kolon- und Ovarialkarzinom und einigen weiteren mehr, sowie lymphatischen Krebserkrankungen gezeigt werden, dass sich sowohl intratumoral als auch peripher eine im Vergleich zu gesunden Personen höhere Frequenz von CD4+/ CD25+/FoxP3+ T-Zellen nachweisen lässt (Wolf 2003; Beyer 2006). Diese Beobachtung diente als Erklärungsansatz, warum keine adäquate Immunantwort, trotz vorhandenem Pathogen erfolgt und stellte gleichzeitig eine Säule im Konzept des „Tumor-escape-Phänomen“ dar (Teng 2008; Zhou 2007; Wei 2004; Curriel 2004; Ribas 2003). Es erscheint demnach aus den Ergebnissen vorausgegangener Arbeiten als sehr wahrscheinlich, dass regulatorische T-Zellen eine zentrale Rolle in der Entwicklung einer Immuntoleranz gegenüber Neoplasien spielen. Die zugrunde liegenden Funktionsmechanismen in diesem Zusammenhang sind noch Gegenstand laufender Forschungsarbeiten. Die grobe Einteilung erfolgt jedoch in einen zellkontaktabhängigen und -unabhängigen Signalweg. Im Hinblick auf die Zielzellen regulatorischer T-Zellen scheint ihre suppressive Eigenschaft bei Weitem unspezifisch zu sein und richtet sich gegen zytotoxische T-Zellen sowie APCs, DCs, Th- und B-Zellen. Sie können also auf allen Ebenen der Immunantwort interagieren.

Insbesondere im Rahmen der Tumorerkrankung gibt es mittlerweile unterschiedliche Ansätze die Treg-vermittelte Suppression zu durchbrechen. In klinischen Studien konnte bereits gezeigt werden, dass die Depletion, bzw. Suppression der Tregs zu einer signifikanten Steigerung der T-Zellantwort führt. Als mögliche Zielstrukturen sind CTLA-4 und der IL-2-R-α-chain CD25 zu nennen. Ipilimumab ist ein inhibitorischer Antikörper, der gegen das CTLA-4 gerichtet ist. Dieses wiederum scheint eine wichtige Rolle beim Zell-Kontakt-

abhängigen Suppressionsmechanismus regulatorischer T-Zellen zu spielen (Hodi 2008). Durch die Blockade des CTLA-4 werden die Tregs in ihrer Funktionalität inhibiert.
Ontak ist ein an IL-2 gebundenes, zytotoxisches Fusionsprotein, das an IL-2-R-α-chain (CD25) bindet. Die Internalisierung des Komplexes führt zur Freisetzung des Toxins und Zelllyse (Duvic 2008). Dieses Verfahren resultiert in einer Antikörper-vermittelten Depletion der Zielzelle.

Basierend auf diesen Grundlagen und den entstandenen Fragen in vorausgegangenen Arbeiten zum monoklonalen Antikörper Abagovomab soll in dieser Arbeit die Rolle der regulatorischen T-Zellen bei Patientinnen mit fortgeschrittenem Ovarialkarzinom vor, während und nach der Vakzinierung mit dem monoklonalen Antikörper erarbeitet werden.

I.6. Problemstellung und Ziele dieser Arbeit

Ziel der Arbeit ist es, quantitative und qualitative Informationen über das dynamische Verhalten von verschiedenen T-Zell Populationen vor, während und nach Behandlung von Ovarialkarzinompatientinnen mit dem monoklonalen Antikörper Abagovomab zu gewinnen.

Die spezifischen Fragestellungen sind:

1) Sind Unterschiede in der Frequenz von regulatorischen T-Zellen im peripheren Blut im Verlauf der Immuntherapie zu beobachten?

2) Besteht eine Korrelation zwischen der Entwickelung einer CA125-spezifischen T-Zell-Antwort und der Anzahl der regulatorischen T-Zellen?

3) Kann die tumorspezifische T-Zell-Response, die durch Abagovomab induziert wurde, durch Blockade des CTLA-4- Antigens *in vitro* gesteigert werden?

Zur Bearbeitung dieser Fragestellungen sollen folgende quantitative, qualitative und funktionelle Aspekte untersucht werden.

1) Messung von Interferon-y (ein aktivierendes Interleukin) als Marker der CA125- spezifischen T-Zell-Aktivität (Response) vor, während und nach der Therapie mit Abagovomab

2) Bestimmung von regulatorischen T-Zell-Subpopulationen über die Marker CD3, CD4, CD25, FoxP3 und CTLA-4 vor, während und nach der Therapie mit Abagovomab

3) Bestimmung des Interferon-y als Marker der CA125-spezifischen T-Zell-Aktivität unter *in vitro* Blockade des CTLA-4-Antigens

Patienten und Methoden

II. 1. Material

II. 1.1. Geräte und Apparaturen:

Zentrifuge:	Heraeus, Multifuge3 S-R
FACS:	BD Bioscience, FACSCalibur
Mikroskop:	Zeiss, Axiovert 40 C
Sterile Bank:	Telstar, Bio-II-A, class II cabinet
Brutschrank:	Heraeus, Hera-cell, 37°C, 5% CO2
Kühlschrank:	Liebherr, Premium NoFrost, 4°C
Tiefkühlschrank:	HERA, *freeze*, -85°C
Stickstoff tiefkalt, verflüssigt:	MG Messer Griesheim, Chronos/Apollo

IKA, MS2 Minishaker
IBS integra Biosciences Pipetboy aca
Cryo Freeze Container (Nunc)

II. 1.2. Pipetten

Gilson Pipetman: 2µl, 10µl, 20µl, 100µl, 200µl, 1000µl
Entsprechende Plastik-Pipettenspitzen
Greiner bio-one, serologische Pipetten mit Spitze: 1ml [604 181]
2ml [710 180]
5ml [606 180]
10ml [607 180]
25ml [760 180]]

II. 1.3. Plastikartikel

BD Falcon, 5ml polystyrene round-botton tube		
Greiner bio-one, Cellstar,	PP-Test tubes,	15 ml
Greiner bio-one, Cellstar,	PP-Test tubes,	50 ml
Greiner bio-one, Cellstar,	TC-Plate	24 well
Greiner bio-one, Leukosep-Röhrchen, KO.		50 ml
Sarstedt -Monovette		4,9 ml Li-Heparin-Gel
Greiner bio-one, Cryoröhrchen, PP, mit Schraubverschluss, streril		

II. 1.4. Antikörper

Farbmarkierte Antikörper gegen humane Antigene

CD3,FITC-conjugated mouse anti-human CD3	BD Pharmigen	Cat#: 555348; Lot#: 03537(clone HIT3A)
CD4,PE-Cy5-conjugated mouse anti-human CD4	BD, Pharmigen	Cat#: 555348; Lot#: 03537] (clone RPA-T4)
CD25,PE-conjugated anti-human CD25	BD Biosciences,	Lot#: 25610 (clone 2A3)
CTLA-4,PE-conjugated mouse anti-human CD152	BD Pharmigen	Cat#: 555853; Lot#: 16639] (clone BNI3)
FoxP3,PE-conjugated anti-human Foxp3	NatuTec, eBioscience	Cat#: 12-4776-71; Lot#: E017339] (clone PCH101-PE)
Cocktail FITC anti-human CD4 (RPA-T4), APC anti-human CD25	NatuTec, eBioscience	Cat#: 22-0425-71; Lot#: E017776] (clone BC96)
IFNy,FITC-conjugated mouse anti-human IFNy	BD Pharmigen	Cat#: 554551; Lot#: 02036 (clone 4S.B3)
IL10,PE-conjugated rat anti-human IL10	BD Pharmigen	Cat#: 559330; Lot#: 17273] (clone JES3-19F1)

Isotypenkontrollen

PE Mouse IgG2aκ	BD Pharmigen	Cat#: 555574; Lot#: 27576] (clone G155-178)
PE-conjugated rat IgG2a isotype control	NatuTec, eBioscience	Cat#: 12432193

Nicht farbmarkierte Antikörper gegen humane Antigene

CD28,purified anti-human CD28	BioLegend	Cat#:302902; Lot#:B101383] (CD28.2)
CTLA-4,purified mouse anti-human CD152	BD Pharmigen	Cat#: 555851; Lot#: 84717] (BNI3)

II. 1.4. 1 Erläuterung zu ausgewählten Antikörpern

CD 28

Der im CFC-Assay verwendete anti-CD28-MAK ist ein Antikörper, dessen Ligand der humane Rezeptor B7 ist. Dort wirkt er agonistisch zu dem nativem CD28. Dieses wird auf den meisten T-Zellen exprimiert und dient als so genannter positiver Costimulus.

Die alleinige Stimulation von T-Zellen über den T-Zell-Rezeptor mit einem Antigen ist für eine Aktivierung dieser meistens nicht ausreichend. Sie führt vielmehr zu einem anergen Zustand oder gar Apoptose der Zellen. Es bedarf also einer Costimulation über einen weiteren Faktor, welcher in dem Fall das CD28 darstellt. Aus diesem Grund ist es ein essenzieller Bestandteil in der Aktivierungskaskade von T-Zellen. Allerdings ist auch CD28 alleine nicht in der Lage, T-Zellen zu aktivieren.

Hier wird das Antigen CA125 für eine spezifische Stimulation separat den entsprechenden Proben im CFC-Assay zugefügt. Um aus genannten Gründen möglichst optimale Bedingungen für eine Stimulation zu schaffen, wird auch CD28 zusätzlich den Zellkulturen angeboten.

CTLA- 4

Der verwendete Antikörper gegen das CTLA-4 entspricht in seiner wesentlichen Struktur dem für die CTLA-4-Färbung verwendeten Antikörper, er ist jedoch nicht farbstoffmarkiert und bindet an das Zielprotein, ohne mit den anderen fluoreszenzgebunden Antikörpern zu interagieren oder die später durchgeführte Messung am FACS zu beeinflussen. Hingegen soll dessen Bindung an das CTLA-4 die weitere Signaltransduktion verhindern. Er wirkt also antagonistisch an diesem Rezeptor.

Das Ziel des Einsatzes eines solchen Antikörpers in dieser Arbeit ist, die vermutete zellkontaktabhängige Suppression durch Blockierung des dafür vermutlich verantwortlichen Rezeptors zu durchbrechen und dadurch eine Immunreaktion aus der Population der Effektorzellen zu induzieren, bzw. zu verstärken.

II. 1.5. Das Tumorantigen CA125 (Mucin 16 / MUC 16)

Das verwendete CA125 entstammt aus Kulturüberständen der CA125 positiven humanen Ovarialkarzinomzelllinie OAW-42 (Subklon H8+). Die Reinheit und Funktionalität der Antigenpräparation wird mittels SDS-PAGE, ELISA- und Western-Blot-Verfahren bestimmt und das aufgereinigte Protein in Aliquots bei –20°C gelagert. Um die Spezifität der T-Zellassays zu gewährleisten, wurde die CA125-Präparation zuvor mit einer kommerziell erhältlichen CA125-Präparation (Biodesign) verglichen.

II. 1.6. Medien und Puffer für Antikörper-Färbung

- BD, Cytofix/Cytoperm Kit; contents: BD Cytofix/Cytoperm Fixation and Permeabilisation Solution, BD, Perm/Wash Buffer 10x Solution [Cat#: 5547714; Lot#: 25414]
- EBioscience, Flow Cytometry staining Buffer [Cat#: 00-422-57; Lot#: E018058]

- EBioscience, Fix/Perm Diulent [Cat#: 00-5223-56; Lot#: E0117593]**PAA,** Dulbecco´s PBS (1x) [Cat#: H15-002; Lot#: H00205-0506]
- B.Braun, Aqua ad iniectabilia
- 20 mM EDTA in PBS
- Waschlösung: Cellwash (BD) / 3% FCS (PAA)

II. 1.7. Sonstiges

- Sigma, Brefeldin A from Penicillinum brefeldinum
- Sigma Aldrich: PHA, Phytohaemagglutinin (Lektinextrakt aus der roten Feuerbohne; besitzt starke mitogene Wirkung auf Lymphozyten; hier Verwendung als unspezifisches Stimulans)
- Methanol
- PAA Natrium-Pyruvat-Lösung
- PAA, Penicillin/Streptomycin (100x) (Pen-Strep)
- Normal rat Serum, NatuTec, eBioscience, Cat#: 24-5555-93; Lot#: E018515
- Trypanblau

II. 1.8. Medium für Stimulationsversuche sowie zum Einfrieren und Auftauen der Lymphozyten

88% PAA, RMPI 1640 with L-Glutamine
[Cat#: E15-840; Lot#: E84006-0513]
10% PAA humanes AB-Serum, steril, inaktiviert
1% PAA Natrium- Pyrovat
1% PAA, Penicillin/Streptomycin (Pen-Strep) (100x)

Um mögliche Interaktionen mit den Antikörpern später zu vermeiden, wurde das Medium mit sterilem humanem AB-Serum, statt FCS angesetzt.

II. 1.9. Blutproben

II.1.9.1. Proben von Patientinnen

In den Versuchen dieser Arbeit wurden kryokonservierte Lymphozyten verwendet. Diese stammen alle aus der Phase I/II AGO-Studie zu ACA125-Vakzine bei Patientinnen mit fortgeschrittenem epithelialem Ovarialkarzinom oder Peritonealkarzinose (AGO Protokoll OVAR 2.8).
Hierbei erfolgte eine randomisierte Zuteilung der Patientinnen in zwei Arme der Studie. Jeweils 16 Patientinnen aus Arm A erhielten 6 Applikationen des Antikörpers, aus Arm B 9 Applikationen. Alle Patientinnen erhielten jeweils 2mg Abagovomab s.c. bei jeder Applikation. Die ersten vier Vakzine erfolgten im Abstand von zwei Wochen in beiden Studienarmen. Die weiteren zwei, bzw. fünf Applikationen wurden im vierwöchigen Abstand injiziert. Anschließend folgte die Phase des „Follow-up“, in der die Patientinnen weiterhin unter Beobachtung und regelmäßigen Blutkontrollen standen. Diese dauerte sechs Wochen in beiden Studienarmen. Die Vorstellung zu den Untersuchungen erfolgte alle zwei Wochen.
Die Blutentnahme zur Bestimmung immunologischer Parameter erfolgte jeweils unmittelbar vor jeder Applikation der Vakzine bzw. zwei und sechs Wochen nach der letzten Applikation (Follow-up 1 und 2).
Zu den Einschusskriterien gehörten ein histologisch gesichertes plattenepitheliales Ovarial- oder Tubenkarzinom FIGO I-IV, sowie eine abgeschlossene radikale, operative Therapie und eine abgeschlossene, platinhaltige Chemotherapie. Als Ausschlusskriterium galten Zweitmalignome, chronisch entzündliche Erkrankungen sowie Erkrankungen des allergischen Formenkreises. Weiterhin sollte das zelluläre Blutbild innerhalb der durchschnittlichen Normgrenzen des jeweiligen Labors liegen.

Für die Analysen der vorliegenden Arbeit standen kryokonservierte PBMCs von insgesamt 12 Patientinnen zum Zeitpunkt vor Therapiebeginn (baseline-Abnahme, im Folgenden gekennzeichnet mit -V), während der Therapie (vor Applikation 5 bzw. 6, im Folgenden mit -5 bzw. -6 gekennzeichnet) und in der

Follow-up- Phase (2 bzw. 6 Wochen nach der letzten Applikation, im Folgenden mit -F1 bzw. -F2 gekennzeichnet) zur Verfügung. Die PBMCs wurden innerhalb von 24h nach Blutentnahme aus heparinisiertem Vollblut über einem Ficoll-Gradienten nach einheitlichem Protokoll separiert und in flüssigem Stickstoff kryokonserviert. Die Entnahme erfolgte je fünf Tage vor der darauf folgenden Vakzine. Ein Teil der Proben wurde für laufende Studienzwecke verwendet, der andere Teil der Lymphozyten blieb kryokonserviert in flüssigem Stickstoff gelagert und wurden als Proben in dieser Arbeit verwendet.
Das mittlere Alter der Patientinnen betrug 57,8 Jahre (40 – 76 Jahre) und lag somit deutlich über dem mittleren Alter der Vergleichsgruppe (s. u.).

Pat.-ID / Alter	
Short arm	***Long arm***
GW - 68 AG - 72 KS - 36 PS - 42 IE - 40 BW - 53 EB - 76 AZ - 38 KH - 51 IS - 55 MH - 47	UR - 68
Mittleres Alter: 57,8	

Tabelle 5: Patientinnen aus beiden Studienarmen, deren Proben zur Auswertung zur Verfügung standen mit Angabe des individuellen Alters. Im Short arm der Studie wurden 6 Vakzinen appliziert, im Long arm 9.

II.1.9.2. Proben von gesunden Probanden

Neben den Proben von den Studienpatientinnen wurden auch Lymphozyten von gesunden Probanden verarbeitet. Voraussetzung für die Kontrollen waren weibliches Geschlecht und keine aktuellen Erkrankungen - weder autoimmune,

noch infektiöse oder neoplastische.

Das mittlere Alter betrug 43,4 Jahre (33-56 Jahre). Alle Probanden erklärten freiwillig ihre anonyme Teilnahme.

Es wurden insgesamt fünf Personen heparinisiertes Vollblut abgenommen. Die entsprechend aufbereiteten Lymphozyten wurden sowohl im frischen als auch kryokonservierten Zustand weiterverarbeitet. Sie dienten zum einen zur Etablierung der Färbeprotokolle und der Stimulationsversuche. Zum anderen konnten die entsprechend gemessenen Daten als Vergleich zu den Proben der Studienpatientinnen verwendet werden, da sie einen kleinen Querschnitt einer weiblichen Standardbevölkerung repräsentieren. Für die Auswertung kamen davon fünf Probanden infrage (Tab. 6).

Probanden -ID / Alter
KR - 33
SR - 34
TP - 40
DF - 54
EF – 56
Mittleres Alter: 43,4

Tabelle 6: Angabe der Probanden sowie ihr entsprechendes Alter zum Zeitpunkt der Arbeit.

II. 2. Methoden

II. 2.1. Probengewinnung

II. 2.1.1. Separation der Lymphozyten:

Das Arbeiten erfolgt stets unter der sterilen Bank. Dazu werden vorbereitet:

>Lymphozytenseparationsmedium
>Leukosep-Röhrchen
>PBS streril
>humanes AB-Serum, Kulturmedium
>frisch abgenommenes heparinisiertes Vollblut in Sarstedt- Monovetten
>entsprechend benötigte Pipetten

Pro Leukosep-Röhrchen werden ca. 30ml Vollblut benötigt (entspricht etwa 6 vollen Li-Hep-Gel-Monovetten).
Je Leukosep-Röhrchen werden 15ml Lymphozytenseparationsmedium pipettieren und 1min bei 2600 rpm mit Gegengewicht abzentrifugieren.
Anschließend wird das Blut aus den Monovetten dazu pipettiert (je Röhrchen ca. 30ml) und 15 min bei 1100 rpm mit entsprechendem Gegengewicht zentrifugiert. Die Erythrozyten sollten danach unterhalb, das Plasma mit dem Lymphozytenring oberhalb der Separationsplatte sein.
Nun wird vorsichtig den Lymphozytenring abpipettiert und in ein 50ml Falcon überführt. Die Suspension wird in 30ml PBS resuspendiert und 10min bei 1100 rpm zentrifugiert.
Der Überstand wird vorsichtig abgenommen und erneut mit 15ml PBS gewaschen und 10min bei 1100rpm zentrifugiert. Dieser Schritt wird einmal wiederholt.

Der Überstand anschließend abgenommen und das Zellpellet in 1ml AB-Medium resuspendiert.
10 µl der Zellsuspension werden für die Zellzahlbestimmung in ein Eppendorf-Cap überführt. Der Rest soll anschließend je nach Versuchsprotokoll weiterverarbeitet werde..

II. 2.1.2. Einfrieren der Lymphozyten

Arbeiten erfolgt steril unter der Bank. Dazu werden vorbereitet:

>mindestens $1x10^6$ Lymphozyten
>entsprechendes Volumen an eiskaltem AB-Einfriermedium
>beschriftete Kryoröhrchen
>entsprechenden benötigte Pipetten

Es sollten mindestens $1x10^6$ Zellen pro ml sein. Die Suspension wird nach Bestimmung der Zellzahl für 10min bei 200g zentrifugiert und der Überstand vollständig abgenommen. Ein der Zellzahl entsprechendes Volumen (Pro Milliliter Gefriermedium: $1x10^6$–$1x10^7$ Zellen) des eiskalten Einfriermediums (AB-Medium) wird in die Pipette aufgenommen und tröpfchenweise zu den Zellen gegeben und anschließend vorsichtig resuspendiert. Je 1ml Zellsuspension werden pro Kryoröhrchen pipettieren, fest verschlossen und sofort in den „cryo- freezing container“ gestellt. Dort werden sie über Nacht, jedoch mindestens 4 Stunden, bei –80°C gehalten.
Zur Langzeitlagerung werden die Kryoröhrchen anschließend in flüssigen Stickstoff überführt.

II. 2.1.3. Auftauen von kryokonservierten Proben

Folgendes Material wird unter der sterilen Bank bereitgestellt:

>steriles Zentrifugenröhrchen, 15ml Falkon
>5 ml eiskaltes AB-Medium
>1 ml 37°C warmes AB-Medium
>entsprechenden benötigte Pipetten

Das benötigte Kryo wird aus dem Stickstofftank entnommen und mit Methanol abgewischt. Vorsichtig aber zügig wird es nun im Wasserbad aufgetaut. Wenn es gerade getaut ist, erfolgt die schnelle Überführung unter die sterile Bank, wo es aufgemacht und der Inhalt mit 1 ml Glaspipette in das sterile, beschriftete Zentrifugenröhrchen überführt wird. Hier wird sofort vorsichtig 5 ml eiskaltes AB-Medium tropfenweise zu pipettiert und vorsichtig resuspendiert.
Anschließend wird die Zellsuspension bei 1100 rpm 10 min zentrifugiert.
Der Überstand wird vorsichtig abnehmen und in 1ml warmem AB-Medium resuspendieren. 10µl der Zelllösung wird für Zellzahlbestimmung und Vitalitätsprüfung entnommen und der Rest weiterverarbeitet.

II. 2.1.4. Vitalitätsprüfung und Zellzahlbestimmung

Mit dem Aliquot einer Zellsuspension wird eine 1:10-Verdünnung hergestellt. Dafür werden:

36µl Trypanblau-Lösung
54µl PBS
10µl der Zellsuspension

in einem 1,5ml Eppendorf-Cap vorsichtig gemischt.
Der Testansatz wird mittels Pipette in eine Neubauer-Zählkammer gefüllt und die Zellen mit dem 40er Objektiv gezählt.
Tote Zellen nehmen den Farbstoff an und färben sich dunkel. Vitale Zellen bleiben ungefärbt. In der Zählkammer sollen mindestens zwei große Eckquadrate ausgezählt werden.

Berechnung der vitalen Zellen pro ml Zellsuspension:

Das gezählte Ergebnis wird durch 2 (= Anzahl der gezählten großen Eckquadrate) dividiert und mit der entsprechenden Verdünnung multipliziert. Daraus resultiert die Zellzahl in 0,1µl Zellsuspension. Multiplikation mit dem Faktor 10.000 ergibt die Zellzahl pro Milliliter Zellsuspension.
Hieraus kann die weitere Berechnung des benötigten Volumens entsprechend der pro Ansatz des Versuchs benötigten Zellzahl erfolgen.

II. 2.2. Markierung von Antigenen mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern

II. 2.2.1. Allgemeines Prinzip der Färbung

Das Prinzip der Antikörperfärbung beruht darauf, dass die hier verwendeten monoklonalen Antikörper mit einem Teil spezifisch an das definierte humane Antigen binden und an einem weiteren Teil mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert sind (Abb. 4). Die Auswertung kann dann anschließend mittels FACS-Analyse erfolgen.

Zu Beginn wurden standardisierte Versuchsbedingungen (z.B. Konzentration der Antikörper, Inkubationsdauer, etc.) mit PBMCs gesunder Normalpersonen etabliert und validiert.
Isotypenkontrollen wurden in jedem Ansatz mitgeführt. Dabei handelt es sich um Antikörper der gleichen Spezies und dem identischen Isotyp, wie der speziell zur Färbung eingesetzte Antikörper. Diese Isotypenkontrollen sind mit dem gleichen Farbstoff markiert wie die Probenantikörper, binden jedoch nicht an humane Zellantigene.
Für die Darstellung der intrazellulären Zytokine, sowie der ebenfalls intrazellulären Antigene CTLA-4 und FoxP3 muss die Zellmembran vorher mit einem speziellen Puffer permeabilisiert werden. Dieser Schritt ist bei der Färbung oberflächlicher Antigene hingegen nicht notwendig.

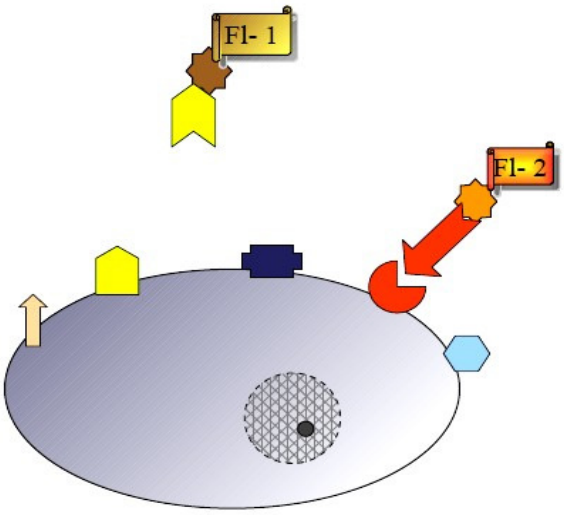


Abbildung 4: Schematische Darstellung der Antikörperfärbung mit fluoreszenzmarkierten Farbstoffen.

II. 2.2.2. Phänotypisierung regulatorischer T- Zellen

Die Phänotypisierung der regulatorischen T-Zellen orientierte sich anhand der aktuellen Literatur. Demzufolge exprimiert diese Population CD4+,CD25*high*+,FoxP3+ an ihrer Oberfläche, bzw. intrazellulär. Als weiterer Marker wurde hier das intrazelluläre CTLA-4 gewählt. Dieses wird konstitutiv auf Tregs exprimiert. Weiterhin sollte in dieser Arbeit die zellkontaktabhängige Suppression über den CTLA-4-Rezeptor untersucht werden. Durch die quantitative Darstellung des Antigens sollten gegebenenfalls Rückschlüsse auf den Einfluss der zellkontaktabhängigen Suppression ermöglicht werden. CD3 gilt in diesem Fall als allgemeines Oberflächenantigen der gesamten Lymphozytenpopulation.

Zur Darstellung der intrazellulären Marker FoxP3 und CTLA-4 wurde die Zellmembran mit Hilfe von Saponin (zählt zu den Tensiden, welche die Oberflächenspannung polarer Substanzen herabsetzten) permeabilisiert.

II. 2.2.3. FoxP3 – Färbung, intrazellulär

Benötigt werden 2 Ansätze à $3x10^5$ cells: a) Kontrolle
b) Probe

Die Zellsuspension wird bei 1600rpm 5min zentrifugiert und det Überstand vorsichtig abgenommen. Das verbliebene Zellpellet wird mit je 1ml PBS oder eBioscience Flow Cytometry Staining Buffer durch Resuspendieren gewaschen und für weitere 5 Minuten bei 1600rpm zentrifugiert. Der Überstand wird vorsichtig abgenommen.
Pro Ansatz werden je 10µl CD4/CD25 Cocktail zufügt und die tubes für 30min bei 4°C, dunkel inkubiert. Anschließend werden sie mit je 1ml PBS oder eBioscience Flow Cytometry Staining Buffer gewaschen und erneut bei 1600rpm, 5 min zentrifugiert. Der Überstand wird vorsichtig abgenommen.
Nun wird eBioscience Fix/Perm Diulent mit Aqua dest. im Verhältnis 1:4 verdünnt, pro Ansatz werden je 1ml davon zufügt und kurz vortexet (durchschütteln). Die Proben werden im Kühlschrank für weitere 60min bei 4°C, dunkel inkubiert. Nach Ablauf der Zeit werden sie mit je 1ml PBS oder eBioscience Flow Cytometry Staining Buffer gewaschen und bei 1600rpm 5 min lang zentrifugiert. Der Überstand wird vorsichtig abgenommen und die Zellpellets mit je 2ml Permeabilization-Buffer-Lösung, welche zuvor aus einem Konzentrat im Verhältnis von 1:10 mit Aqua injekt. verdünnt wurde, gewaschen. Die Zellsuspensionen werden erneut bei 1600rpm für 5 min bei1600rpm zentrifugiert und den Überstand entfernt. Der letzte Waschschritt wird wiederholt. Anschließend wird pro Ansatz je 2µl normal rat serum zugefügt und die Proben für 15 min bei 4°C im Dunkeln inkubiert.
Die Tubes werden anschließend nicht gewaschen und stattdessen direkt zu Ansatz

a) Kontrolle: 7µl rat IgG2a PE isotype control
b) Probe: 7µl Anti-human FoxP3- PE

hinzu pipettieren, kurz vortexet und für weitere 30min bei 4°C, dunkel inkubiert.
In der Zwischenzeit wird Permeabilization-Buffer-Konzentrat im Verhältnis 1:10 mit Aqua injekt. verdünnt. Nach Ablauf der Inkubationszeit werden die Proben mit je 2 ml dieser Lösung gewaschen und bei 1600rpm für 5 min zentrifugiert.

Der Überstand wird vorsichtig abgenommen und der zuletzt durchgeführte Waschschritt wiederholt.
Die verbliebenen Zellpellets werden in je 300µl PBS oder eBioscience Flow Cytometry Staining Buffer resuspendiert und möglichst sofort der Messung zuführt oder kurzzeitig bei 4°C im Dunkeln aufbewahrt.

II. 2.2.4. CTLA-4 – Färbung, intrazellulär

Die intrazelluläre Färbung mit anti-CTLA-4-MAK erfolgte analog zur FoxP3-Färbung (siehe Abschnitt II. 2.3.2.). Anstelle des anti-FoxP3-PE-MAK wurde hier 10µl eines PE- markierten anti-CTLA-4-MAK eingesetzt.

II. 2.2.5. Spezifische Stimulation mit CA125 und CTLA-4-Block für CFC- Assay

Das Arbeiten erfolgte hier ebenfalls ausschließlich unter der sterilen Bank.
CD28 diente als costimulatorischer Antikörper für aktivierte T-Zellen. Es soll die aktivierende Signalkaskade und die resultierende Zytokinexpression unterstützen.

Der verwendete monoklonale Antikörper gegen CTLA-4 bindet spezifisch an diesen Rezeptor und blockiert zellsuppressive Kaskade, die nach Bindung an seinen Liganden B7 initiiert wird (Abb. 5).

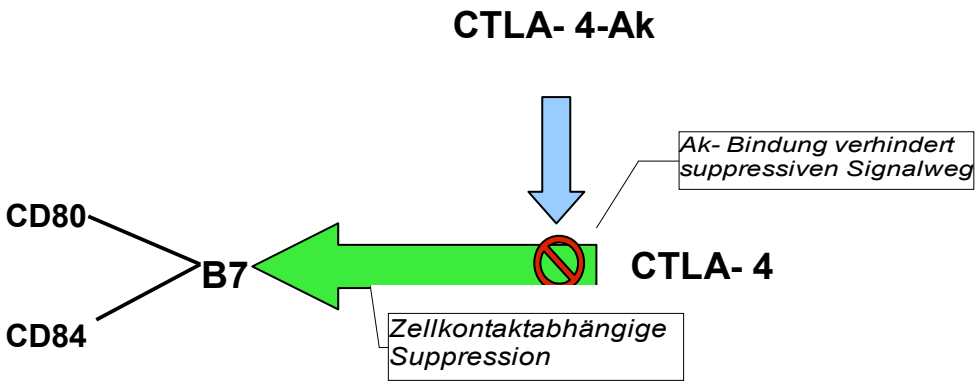


Abbildung 5: Schematische Darstellung der Wirkung eines anti-CTLA-4-Antikörpers

In drei 24er wells werden jeweils mindestens $5x10^5$ Zellen in Lösung ausplattieren und auf 500µl Gesamtvolumen mit RPMI/ 10% humanem AB-Serum aufgefüllt.

Daraus ergibt sich für das weitere Arbeiten folgende Konstellation (Abb. 6):

well 1: unstimuliert (= Kontrolle)

well 2: spezifisch stimuliert

well 3: spezifisch stimuliert + CTLA-4-Antikörper

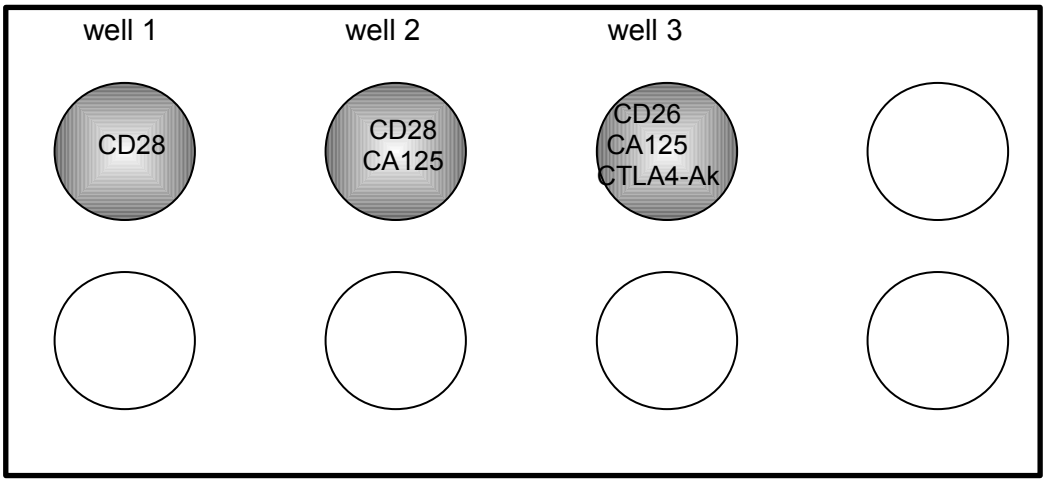


Abbildung 6: *In vitro* - Stimulationsansätze

Zu Beginn wird dem well 3 2,5µl purified Anti-Human CD152 (CTLA-4) vorsichtig hinzu pipettiert (entspricht einer Endkonzentration von 0,5vol%). Die Inkubation erfolgt für 30min, dunkel im Brutschrank bei 37,0°C , 5,0% CO_2. Anschließend werden allen drei wells je 1µl purified Anti-Human CD28, das als Costimulus fungiert, zugefügt (entspricht einer Endkonzentration von 0,2vol%). Erneut werden nun die Zellen im dunklen Brutschrank bei 37,0°C , 5,0% CO_2 für 15 min inkubiert.
Als nächster Schritt folgt die spezifische Stimulation mit dem Antigen CA125. Dafür werden sowohl dem well 2, als auch dem well 3 je 2500U des CA125 zugeführt (entspricht 1,25U/µl). Nun erfolgt die Inkubation bei bereits genannten Bedingungen für weitere 120 min.
Als letzter Schritt der Assays wird nun allen drei wells je 5µl BFA hinzu pipettiert und die Zellplatte für die folgenden 16 Stunden im Brutschrank bei gehabten Bedingungen inkubiert. Als BFA wird Brefeldin A from Penicillinum brefeldinum bezeichnet. Es agiert als Golgi-Stopp-Reagenz und verhindert somit die Sekretion der intrazellulär produzierten Zytokine.

Zellernte:

Da die geernteten Zellen für Antikörperfärbungen weiterverarbeitet werden, muss dieser Schritt nicht unter sterilen Bedingungen erfolgen.

Je 50µl kalter 20mM EDTA in PBS-Lösung pro well pipettieren, durch vorsichtiges Schwenken auf der Arbeitsfläche gut vermischen und 15 min bei Raumtemperatur inkubieren.
Durch vorsichtiges Auf- und Abpipettieren über das gesamte well werden die Zellen geerntet und in die entsprechend beschrifteten 5ml BD Falcon tubes überführt. Anschließend mit je 1ml PBS nach spülen, die noch verbliebenen Zellen wie beschrieben ernten und ebenfalls zu den jeweiligen tubes geben. Kontrolle des Ernteerfolgs erfolgt unter dem Mikroskop.

II. 2.2.6. Intrazelluläre Zytokinfärbung (CFC-Assay)

Die grundsätzliche Stimulierbarkeit kryokonservierter Proben wurde zunächst durch eine unspezifische Stimulation mit dem Mitogen PHA überprüft. Als Backgroundkontrolle wurden unstimulierte PBMCs mitgeführt.

Die Zellsuspension (PBMCs à $5x10^5$ bis zu $1x10^6$ cells) wird bei 1600rpm 5min zentrifugiert und der Überstand vorsichtig mit einer Pipette abgenommen. Das Zellpellet wird durch Resuspension in je 1ml Cellwash gewaschen und anschließend erneut 5min bei1600rpm zentrifugiert, der Überstand vorsichtig abgenommen.
Pro Ansatz werden je 10µl CD4 PE-Cy5 hinzu pipettiert, kurz vorgetexet und im Dunkeln bei 4°C für 30 min inkubiert. Anschließend werden die Proben mit je 1ml Cellwash gewaschen, kurz vorgetexet und 5min bei 1600rpm zentrifugiert. Der Überstand wird vorsichtig abgenommen.
Je Ansatz werden 250µl BD CytoFix/CytoPerm zugefügt, kurz vortexet und weiter im Dunkeln bei 4°C für 20min inkubiert. Danach wird direkt je 1ml BD PermWash-Lösung zugefügt. Diese wird für diesen Versuch aus dem BD PermWash-Konzentrat und aqua in einer 1:10 Verdünnung angesetzt. Es folgt das Zentrifugieren für 5min bei 1600rpm. Der Überstand wird vorsichtig abgenommen und die Probe erneut mit je 1ml BD PermWash-Lösung gewaschen und 5min bei 1600rpm zentrifugiert.
Der Überstand wird im Anschluss vorsichtig abgenommen und pro Ansatz je 10µl Il-10-PE und 1µl IFNy-FITC zufügt. Nach kurzem Vortexen werden die Proben anschließend 30min bei 4°C im Dunkeln inkubiert.
Anschließend folgt das Waschen mit je 1ml BD PermWash-Lösung und das Zentrifugieren für 5min bei 1600rpm. Den Überstand nun vorsichtig abnehmen und das Zellpellet in 300µl Cellwash resuspendieren.
Die Messung wird sofort durchführt oder die Proben kurzzeitig bei 4°C, dunkel, aufbewahrt.

II. 2.3. Messung und Auswertung am FACS

Die Zellanalyse der Proben erfolgte mit Hilfe der Durchflusszytometrie. Im Folgenden soll kurz das Funktionsprinzip und die Ergebnisauswertung erläutert werden.

II. 2.3.1. Funktionsprinzip der Messung am FACS

Das Prinzip der Untersuchung beruht auf der Emission von optischen Signalen seitens der Zelle, wenn diese einen Laserstrahl passiert (Abb. 6). Hierbei werden die in Lösung befindlichen Zellen durch eine Kapillare gesaugt und passieren im Sensormodul einen Laserstrahl. Die Zellen streuen einen Teil des Lichts, welches mittels Detektoren (Photomultipler) nachgewiesen wird. Die Menge des gestreuten Lichts korreliert hierbei mit der relativen Größe der Zelle und mit ihrer Komplexität, d.h. Granularität.

Im FACS kommt es also durch Anregung der Zellen über einen Laserstrahl der Wellenlänge von 488nm oder 595nm, zur Streuung des Lichts an ihrer Oberfläche und zu einer Emission durch die verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe entsprechend ihren individuellen physikalischen Eigenschaften. Mithilfe der optischen und elektronischen Detektoren wird das nach vorne (FSC = *forward light scatter*) und das um 90° (SSC = *sideward light scatter*) gestreute Licht gemessen. Je nach Zelltyp wird dementsprechend der Strahl unterschiedlich stark gestreut und detektiert. FSC erfasst hierbei hauptsächlich die Größe und SSC die Granularität der durchfließenden Zellen. Die Emission der gebundenen Farbstoffe, welche der Kennzeichnung der gefragten Moleküle dienen, wird in 90°- Richtung aufgenommen. Dabei emittiert FITC bei 525nm, PE bei 575nm, APC bei 660- 685nm und PE-Cy5 bei 660- 675nm. Das emittierte Fluoreszenzlicht ist hierbei proportional zur Zahl der gebundenen Fluorochrommoleküle an der jeweiligen Zelle, das heißt, dass die gemessenen Daten hierbei der quantitativen Expressionshöhe der gefragten Moleküle entsprechen. Da bekannt ist, dass Zellpopulationen bestimmte Antigene an ihrer Oberfläche oder auch intrazellulär in einer höheren

Zahl exprimieren als andere, können diese gesuchten Populationen anhand der stärkeren Lichtemission im FACS differenziert dargestellt werden (Abb. 7).

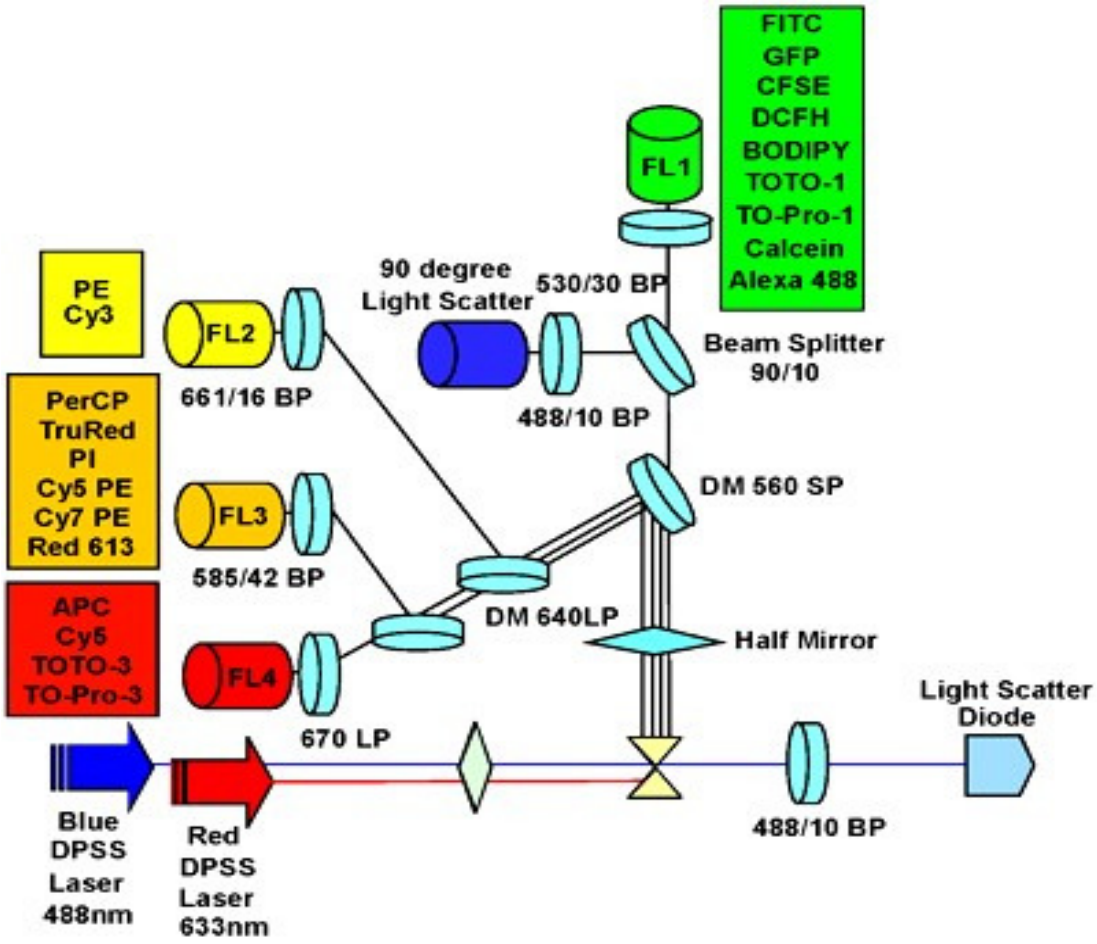


Abbildung 7: Schematische Darstellung des FACS- Funktionsprinzips (aus NIAID, Vaccine Research Center)

II. 2.3.2. Auswertung

Die Messung und Auswertung der gefärbten Proben erfolgt am FACS-Gerät mithilfe der Software CellQuest Pro.

Die Geräteeinstellung der FSC-/SSC-/Fluoreszenzdetektion sowie die Kompensationseinstellung erfolgte anhand der Isotypenkontrollen (Treg-Phänotypisierung) bzw. unstimulierte Backgroundkontrollen (CFC-Assay).

II. 2.3.2.1 Analyse der Treg- Phänotypisierung

Nach erfolgter Geräteeinstellung wurde die Expressionshöhe der einzelnen Marker durch Setzen von sogenannten Gates bestimmt. R1 war dabei immer G1 und umschrieb die Lymphozyten im FSC /SSC–DotPlot.
In dem folgenden Plot wurde nun ausschließlich die Population aus R1 angezeigt und die Expressionshöhe der gesuchten zellulären Proteine in dieser Population. Hier konnten nun weitere definierte Gates gesetzt und die definitive quantitative Expression der Marker sowohl in Prozent als auch als Rohwert in R1 bestimmt werden.

Die Messung des intrazellulärem FoxP3, bzw. CTLA-4 folgte den gleichen Kriterien. Da in diesem Fall jedoch ein CD4 / CD25-Antikörper-Cocktail und kein CD3-AK verwendet wurde, sah das Endergebnis, wie im Folgenden exemplarisch dargestellt, aus.
Zunächst wurden die CD4+ Lymphozyten in R2 dargestellt (Abb. 7).

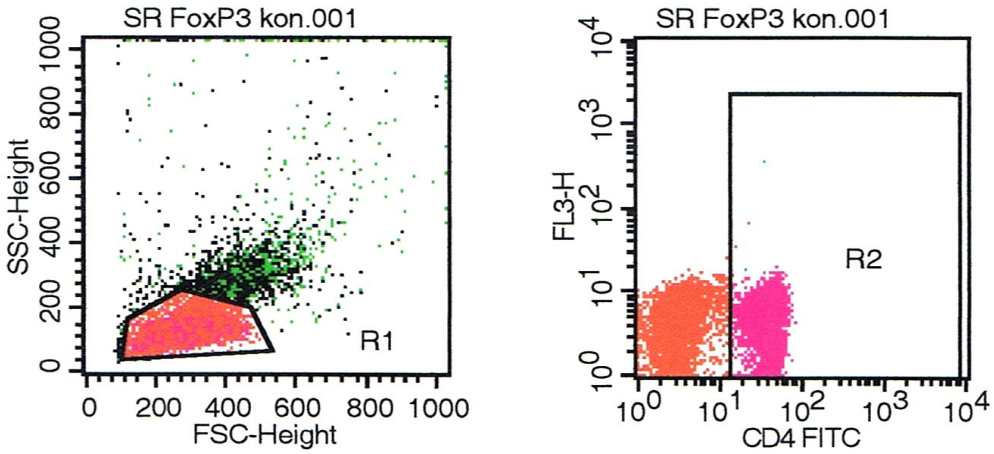


Abbildung 8: Graphische Extraktion aller CD4 exprimierenden Zellen(R2) einer Probensuspension

Anschließend der Vergleich zwischen der Kontrolle und der entsprechenden Probe. In R3 sind nun alle CD4+ Lymphozyten dargestellt, die zusätzlich CD25 und FoxP3 exprimieren (Abb. 9). Dem analog sehen die Messergebnisse bei der CTLA-4- Färbung aus.

Für die intrazellulären FoxP3 und CTLA-4-Färbungen wurden 10000 Lymphozyten im Gate G1 gemessen.

Die Frequenz FoxP3, bzw. CTLA-4 positiver T-Zellen wurde in R3 in Prozent der CD4+ T-Zellen angegeben (Abb. 9).

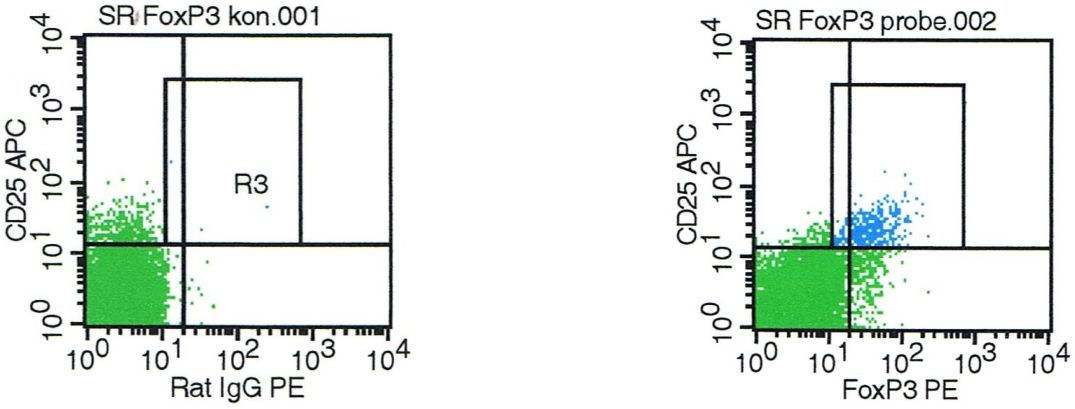


Abbildung 9: Graphische Darstellung von FoxP3- Kontrolle und Probe aus dem Gate der CD4+ Lymphozyten. X-Achse: PE-markierte events, Y-Achse: APC-markierte events

II. 2.3.2.2 Analyse der CFC-Assays

Nach erfolgter Geräteeinstellung wurde die Expressionshöhe der einzelnen Marker durch Setzen der Gates bestimmt. R1 war dabei immer G1 und umschrieb analog der Treg- Phänotypisierung die Lymphozyten im FSC /SSC – DotPlot.

Für die intrazelluläre Zytokinfärbung wurden 100.000 Lymphozyten in R1 gezählt.

In dem folgenden Plot wurde nun ausschließlich die Population aus R1 angezeigt und die Expressionshöhe der CD4+ und der CD4- T- Zellen aus R1 bestimmt. Hier konnten nun weitere Gates gesetzt und die definitive quantitative Expression der MAK-markierten Zytokine sowohl in Prozent als auch als Rohwert in R1 bestimmt werden.

Zur Analyse der CFC-Assays wurde die unstimulierte Probe als Kontrolle gewertet. Anhand dieser wurde R4 mit einem möglichst niedrigen Background (<0,05) gesetzt. R4 wurde anschließend jeweils auf die stimulierte und die CTLA-4-Block-Probe übertragen (Abb. 10). Die so ermittelte Expressionshöhe der Proben wurde anhand der unten genannten Tabelle ausgewertet. Als positiv wurde hier eine Differenz bei entsprechend statistisch ausreichender Zellzahl, bzw. gezählter Events aus dem definierten Gate und einem Background von weniger als 0,05% in den Kontrollen, von mindestens 0.05% der Proben im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle gewertet. Als starke Response wurde ein Wert von > 0,5% gewertet.

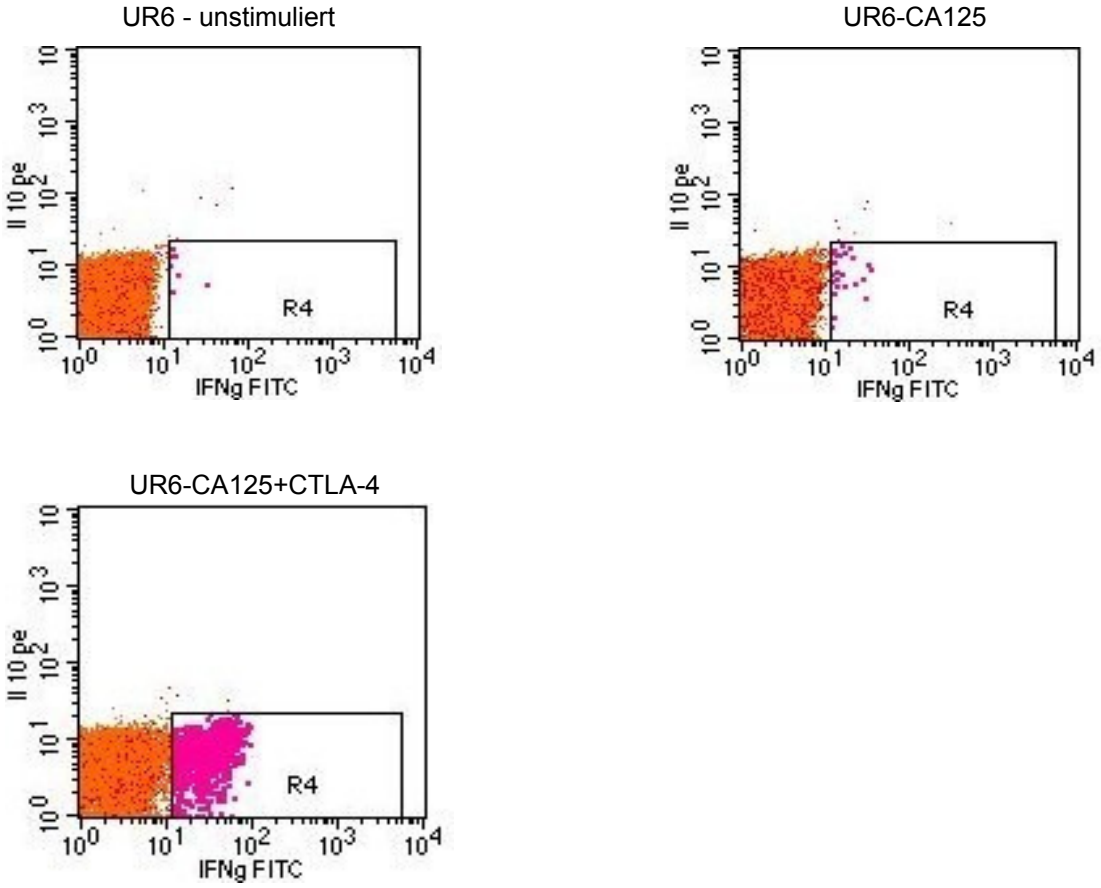


Abbildung 10: Darstellung des Vergleichs einer als negativ bewerteten Kontrolle, die nur mit CD28 im Ansatz des CFC-Assays enthielt, und der entsprechenden Proben: zum einen mit CA125 und zum anderen, zusätzlich zu CA125, mit einem CTLA-4-Antikörper. Hierbei wurde das Gate, wie beschrieben anhand der Kontrolle mit einem möglichst minimalen background gesetzt und auf die DotPlots der Proben übertragen. In diesem Fall betrug der background 0,06% und die entsprechenden events in den Proben 0,12% und 3,05%.

II. 2.3.2.3. Festlegung der Mindestgrenzen zur Auswertung

Die Festlegung der Mindestgrenze für die notwendige Zellzahl in R1 erfolgte anhand des „BD FastImmune CFC Handbook, Acqusition and Analysis“, BD Biosciences (Tab. 5). Das Setzten der Gates und die Auswahl der gewählten Antikörper orientierte sich an den Angaben aus „Techniqes fo Immune Function Analysis, Application Handbook 1st Edition“, BD Biosciences

		Anzahl der gezählten events insgesamt	
% background in R	% mind. Positiv in R´	p < 0,05; 90% power	p < 0,005; 99% power
0,01	0,02	260 000	720 000
0,01	0,05	32 000	90 000
0,01	0,1	12 000	32 000
0,02	0,05	67 000	190 000
0,02	0,1	16 000	45 000
0,03	0,05	170 000	480 000
0,03	0,1	23 000	63 000
0,04	0,1	33 000	93 000
0,05	0,1	52 000	140 000
0,06	0,1	86 000	240 000
0,07	0,1	160 000	450 000
0,08	0,2	17 000	46 000
0,1	0,2	26 000	72 000

Tabelle 7: Statistisch signifikante events entsprechend den Gesamtevents, aus „BD FastImmune CFC Handbook, Acqusition and Analysis“, BD Biosciences.
R = in Kontrolle
R´= in Probe

Die Anzahl der in dieser Tabelle gezählten events bezieht sich immer auf das Gate R1, das heißt alle events aus der gesamten Population der Lymphozyten. In den Versuchen, vor allem mit Zytokinen, wurden alle Ereignisse aus R2 gezählt, das heißt von den CD3+ / CD4+ Lymphozyten. Somit war zu jedem Zeitpunkt sichergestellt, dass die gemessenen Daten statistisch signifikant auszuwerten sind.

II. *2.3.2.4. Statistische Auswertung*

Deskriptive Statistiken

Die Daten wurden mit Mittelwert und Konfidenzintervall (5-95%) angegeben.
Die Rohdaten werden als BoxPlots oder Balkengrafiken dargestellt.

Vergleichende Statistiken

Für den Vergleich der quantitativen Ergebnisse zwischen Responder und Non-Responder wurde der Mann-Withney U-Test angewendet, da die Normalverteilung der Daten bei den kleinen Gruppen nicht gesichert werden konnte.
Als statistisch signifikant galt ein $p < 0,05$.

Die statistische Signifikanz des Vergleichs der gemessenen Werte der jeweiligen Patientin zu den einzelnen Abnahmezeitpunkten wurde anhand des Wilcoxon – Vorzeichen – Rang – Test bestimmt.
Als signifikant wurde ein $p < 0,05$ angenommen

III. Ergebnisse

III.1. Proben aus der AGO-Studie

Insgesamt konnten Blutproben von 12 Patientinnen aus der AGO-Ovar 2.8. Studie zu Zeitpunkt vor Therapiebeginn (V), nach 5 bzw. 6 Applikationen (5/6) und 6 Wochen nach letzter Vakzinierung (F2) analysiert werden. Hierbei handelte es sich um eine Phase I/II-Studie zum monoklonalen Antikörper Abagovomab bei Patientinnen mit fortgeschrittenem Ovarialkarzinom nach erfolgter operativer, radikaler Intervention und Platin-haltiger adjuvanter Chemotherapie.

Nach dem Auftauprozess der PBMCs wurde wie oben beschrieben die Zellzahl der Probe bestimmt und das entsprechend benötigte Volumen für die einzelnen Färbungen und das CFC-Assay errechnet. Voraussetzung für eine vollständige Färbung war also eine Mindestzellzahl von 3,1 x 10^6 Zellen pro PBMC. Bei insgesamt vier Proben lag die Zellzahl darunter. Bei drei Patientinnen konnte keine CTLA-4-Färbung durchgeführt werden: KS-V, UR-6, BW-F2. Bei einer weiteren reichte die Zellzahl weder für eine CTLA-4 noch für eine FoxP3-Färbung aus: EB-5.

III.2. CD4+ und CD8+ T- Zell- Population unter der Immuntherapie

Zunächst wurden die gesamten Populationen der CD4+ und der CD8+ T-Zellen in ihrem prozentualen Anteil an den Lymphozyten betrachtet (Tab. 8).
Es sollte untersucht werden, ob in diesem Punkt Veränderungen unter der Therapie mit Abagovomab auftreten und inwiefern diese, falls vorhanden, mit den Frequenzen der regulatorischen T-Zellen korrelieren.

In dieser Arbeit wurde keine Färbung mit CD8-markierendem Antikörper durchgeführt. Die gemessenen Frequenzen der CD4- T-Zellen waren mit denen der CD8+ T-Zellen in der zugrunde liegenden AGO-Studie nahezu äquivalent, sodass im Folgenden die Population der CD4- T-Zellen als CD8+ bezeichnet werden kann.

Die Mittelwerte und Standardabweichungen des Gesamtkollektivs sind der folgenden Tabelle 8 zu entnehmen.

Aus den aufgeführten Ergebnissen lässt sich schlussfolgern, dass sich die beiden Lymphozytenpopulationen der Patientenproben im Mittel sowie deren ratio im Verlauf der Immunisierung nicht signifikant verändern.

Abnahmezeit punkt	***MW- CD4+Lymphozyten***	***MW- CD8+ Lymphozyten***	***Ratio CD4+/ CD8+***
V-Abnahme	38,8475% (10,56)	27,7617% (9,38)	1,45
5/6-Abnahme	35,9658% (7,71)	26,485% (10,69)	1,54
F2-Abnahme	34,5936% (8,24)	29,0991% (10,32)	1,38

Tabelle 8: Mittelwert des prozentualen Anteils CD4+ und CD8+ T- Zellen an der gesamten Lymphozytenpopulation im Gesamtkollektivs der Patientinnen im Verlauf (die entsprechenden Standardabweichungen sind in Klammern angegeben) sowie die ratio dieser beiden Populationen

IV. 3. Regulatorische T-Zellen und ihre Frequenz im Verlauf der Vakzinierung mit Abagovomab

In der vorliegenden Arbeit wurden regulatorische T-Zellen über die Markerkombination CD4/CD25/FoxP3 mittels FACS-Analyse charakterisiert und quantifiziert.

Unter der Annahme einer CTLA-4-abhängigen Treg-vermittelten Suppresion, erfolgte zusätzlich in einem weiteren Ansatz die Markierung und Auswertung der CD4/CD25/CTLA-4 T-Zellen.

Bei ausreichender Zellzahl konnte die Färbung mit den entsprechenden Antikörpern bei jeder Patientinnenprobe, bei jeder Abnahme durchgeführt werden. Das ergibt je drei Analysen (V-, 5-/6- und F-Abnahme) pro Patientin, sodass man die einzelnen Ergebnisse im Verlauf der Vakzine betrachten und untereinander vergleichen kann.
Die gesamte Anzahl vitaler Zellen in der Lymphozytenprobe reichte für eine FoxP3-Markierung bei EB-5 nicht aus. Aus gleichem Grund konnte weiterhin keine CTLA-4-Färbung bei EB-5, KS-V, UR-6 und BW-F2 durchgeführt werden.

IV. 3.1. Übersicht des gesamten Kollektivs

Die grafische Darstellung der Ergebnisse aus den FoxP3- und CTLA-4-Analysen aller Proben ist in den folgenden Diagrammen aufgezeigt (Diagramm 1 + 2). Es werden jeweils die gemessenen Werte der Treg-Marker FoxP3, bzw. CTLA-4 (Angabe in Prozent) bei den zwölf in die Auswertung aufgenommenen Patientinnen dargestellt.

Die Grafiken dienen einerseits der optischen Darstellung der individuellen Schwankungen der hier gemessenen Parameter im Verlauf. Zum Anderen soll die heterogene Verteilung der Werte zwischen den einzelnen Patientinnen hervorgehoben werden.

Hier fällt insbesondere auf, dass bereits vor der Vakzinierung unterschiedliche Basiswerte der Marker gemessen wurden. Weiterhin zeigt sich hier, dass sich der Verlauf der Parameter während der Immunisierung ebenfalls individuell unterschiedlich entwickelte.

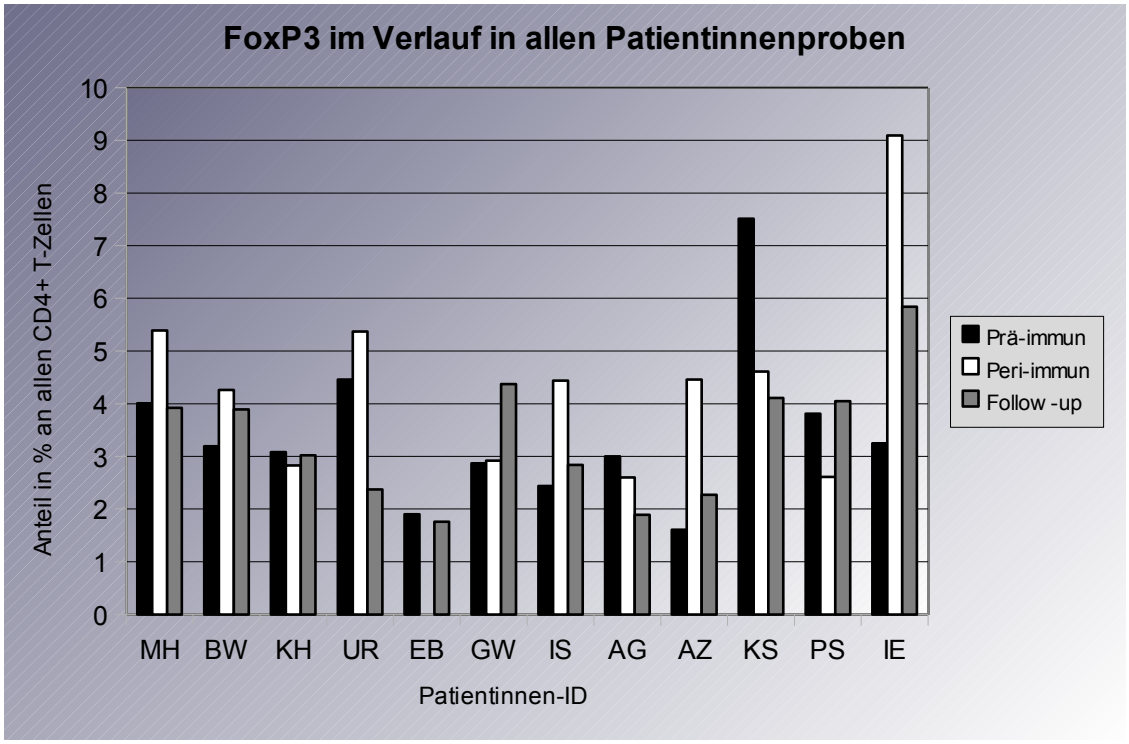


Diagramm 1: FoxP3 im Verlauf bei allen Patientenproben. Y-Achse: %-Angabe der CD4+ T-Zellen, Skala von 0 -100%. x-Achse: einzelne Patientinnen mit den Proben zum entsprechenden Zeitpunkt

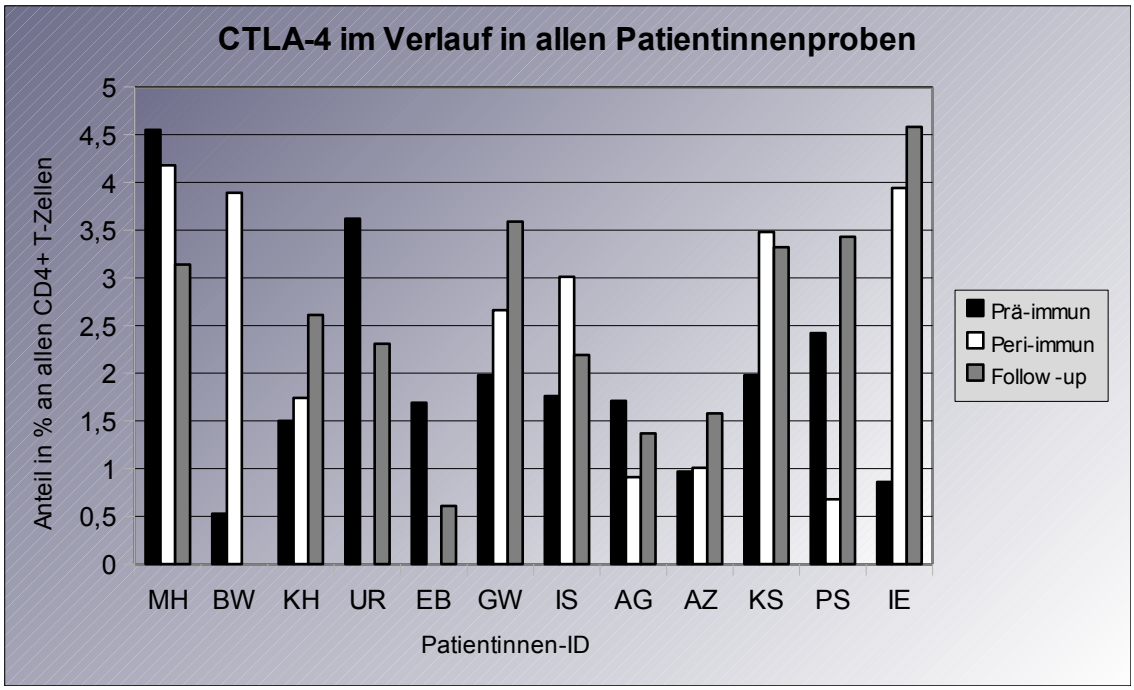


Diagramm 2: CTLA-4 im Verlauf bei allen Patientenproben. Y-Achse: %-Angabe der CD4+ T-Zellen, Skala von 0 -100%. x-Achse: einzelne Patientinnen mit den Proben zum entsprechenden Zeitpunkt, schwarz: V-Abnahme, weiß: 5/6-Abnahme, grau: F-Abnahme

Bei der Analyse der Mittelwerte der gemessenen Treg-Parameter (Tab. 9) fällt weiterhin auf, dass sich diese, trotz der grafisch hohen individuellen Schwankungen, im Verlauf der Vakzinierung nicht statistisch signifikant verändern. Es muss jedoch festgehalten werden, dass ein Trend zu höheren Frequenzen des FoxP3 zum Zeitpunkt der 5/6-Abnahme beobachtet werden konnte. Obwohl dieser hier nicht signifikant erscheint, darf das Ergebnis nicht überbewertet werden und sollte kritischen Anlass geben, dies in einem größeren Kollektiv zu überprüfen.

Zeitpunkt der Probenabnahme	***MW – CD4+/CD25+/ FoxP3+ % (Stdw.)***	***MW -CD4+/CD25+/ CTLA4+ % (Stdw.)***
V-Abnahme	3,4275% (1,52)	2,0008% (1,2)
5-/6-Abnahme	4,4155% (1,87)	2,55% (1,36)
F2-Abnahme	3,3608% (1,21)	2,6118% (1,15)

Tabelle 9: Gemessener prozentuale Anteil der Treg-Marker an der gesamten Lymphozytenpopulation im Verlauf der Vakzinierung als Mittelwert des Gesamtkollektivs. In Klammern ist jeweils die Standardabweichung angegeben. Es ergeben sich keine statistisch signifikanten Veränderungen im Verlauf der Vakzinierung (Wilcoxon-Test für gepaarte Proben, $p > 0,05$) (MW = Mittelwert, Stdw. = Standardabweichung)

III. 3.2. Ergebnisse und einzelne Beispiele zum Verlauf der Treg-Frequenzen

Basierend auf den zunächst inhomogen erscheinenden grafischen Ergebnissen, konnte nach differenzierter Betrachtung doch festgestellt werden, dass sich die Patientinnen in unterschiedliche Gruppen bezüglich des möglichen Verhaltens der Parameter im Verlauf einteilen lassen.
In den folgenden Grafiken sind die Proben drei ausgesuchter Patientinnen aus der AGO-OVAR – Studie und die gemessenen Marker zu den jeweiligen Abnahmezeitpunkten dargestellt. Sie sollen exemplarisch die beobachteten, möglichen Verläufe der Treg-Frequenzen unter der Vakzinierung veranschaulichen.

Beispiel 1:

Wie hier exemplarisch anhand der Patientin IE in Diagramm 3 dargestellt, konnte man bei insgesamt sieben Patientinnen im Verlauf beobachten, dass die Frequenz der regulatorischen T-Zellen tendenziell unter der Vakzine anstieg und im Follow-up wieder sank (Tab. 10).

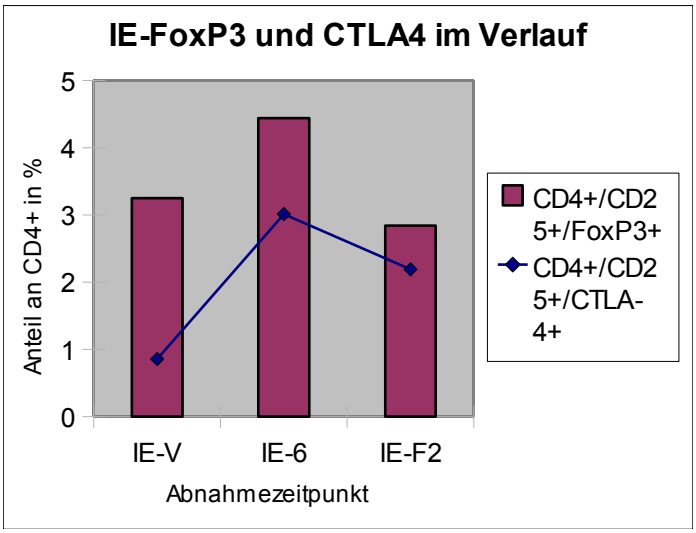


Diagramm 3: Graphische Darstellung der Treg-Marker FoxP3 und CTLA-4 bei der Patientin IE zu den einzelnen Abnahmezeitpunkten (V= prä-immun; 6= peri-immun; F2= Follow-up). Exemplarische Darstellung eines möglichen Verlaufs der Treg-Frequenzen im Verlauf der Immunisierung

Pat.-ID	FoxP3 % V- Abnahme	FoxP3 % 5/6- Abnahme	FoxP3 % F- Abnahme	FoxP3 Diff: V - 5/6
UR	4,46%	5,37%	2,37%	0,91
BW	3,19%	4,26%	3,89%	1,07
AG	3,00%	4,46%	2,27%	1,46
AZ	1,61%	4,6%	4,11%	2,99
PS	3,81 %	9,09%	5,84%	5,28
IE	3,25%	4,44%	2,84%	1,19
MH	4,01%	5,39%	3,92%	1,38
Mittelwert	*3,33*	*5,37*	*3,61*	*2,05*

Tabelle10: Prozentuale Anteil der FoxP3+ Tregs an der Lymphozytenpopulation im Verlauf der Vakzinierung, sowie die Differenz zwischen der V und der 5/6- Abnahme und Mittelwerte dieser Subgruppe.

Der Anstieg des FoxP3 deutet möglicherweise auf eine Rekrutierung regulatorischer T-Zellen aus bis dahin noch naiven, sogenannten *T-cell-precursors* hin. Möglich wäre aber auch eine zunehmende, temporäre Migration aus der unmittelbaren Nähe des Tumors in die Peripherie. Dieses könnte dadurch bedingt sein, dass der applizierte Antikörper Abagovomab systemisch wirkt und eine spezifische T-Zellantwort im peripheren Blut induziert. Dies könnte als Stimulus auf die lokalen, tumornahen regulatorischen T-Zellen wirken und eine Migration induzieren.

Es kann in dem Falle eine Aussage über die Quantität, nicht jedoch über die Qualität, das heißt die Stärke, der resultierenden Suppression dieser Population, getroffen werden. Der Abfall im Follow-up wäre dementsprechend durch das Fehlen des stimulierenden Faktors, dem Antikörper Abagovomab, zu erklären.

Beispiel 2:

Bei zwei Patientinnen sank der Anteil der Tregs in der 5/6-Abnahme ab und stieg wieder im Follow-up an, wie in Diagramm 4 dargestellt. Da es sich hier um nur zwei Patientinnen handelt, wurde kein Mittelwert gebildet.

Möglicherweise ist dieser Verlauf durch eine reduzierte Aktivierung der gesamten T-Zellpopulation zu erklären und dadurch bedingte reflektorische Abnahme der Treg-Frequenz im Sinne des immunologischen Gleichgewichts.

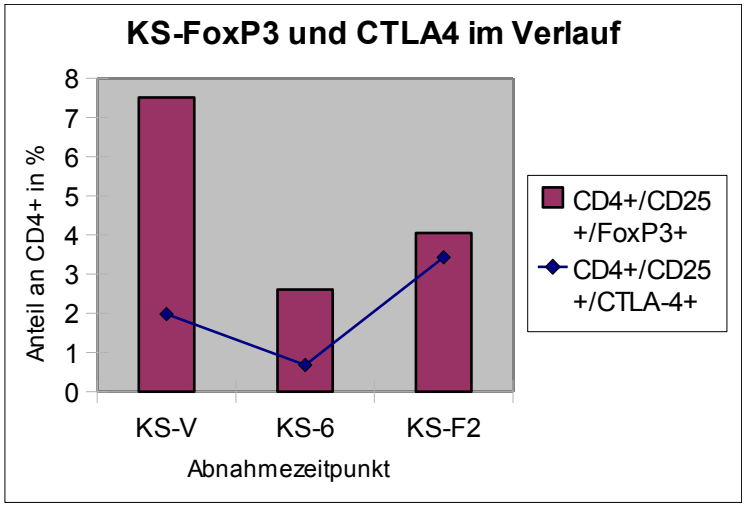


Diagramm 4: Graphische Darstellung der Treg-Marker FoxP3 und CTLA-4 bei der Patientin KS zu den einzelnen Abnahmezeitpunkten (V= prä-immun; 6= peri-immun; F2= Follow-up). Exemplarische Darstellung eines möglichen Verlaufs der Treg-Frequenzen im Verlauf der Immunisierung

Pat.-ID	FoxP3 % V- Abnahme	FoxP3 % 5/6- Abnahme	FoxP3 % F- Abnahme	FoxP3 Diff: V - 5/6
KS	7,51%	2,61%	4,05%	- 4,90
MM	1,17%	0,66%	1,47%	- 0,51

Tabelle11: Prozentuale Anteil der FoxP3+ Tregs an der Lymphozytenpopulation im Verlauf der Vakzinierung, sowie die Differenz zwischen der V und der 5/6- Abnahme und Mittelwerte dieser Subgruppe (KS und MM).

Beispiel 3:

Und wie in Diagramm 5 dargestellt, stieg bei einer Patientin die Treg-Frequenz erst im Verlauf tendenziell weiter an.

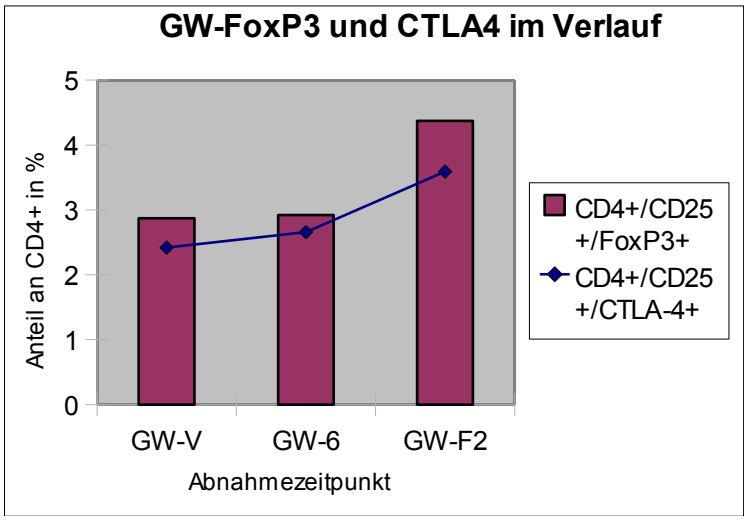


Diagramm 5: Graphische Darstellung der Treg-Marker FoxP3 und CTLA-4 bei der Patientin GW zu den einzelnen Abnahmezeitpunkten (V= prä-immun; 6= peri-immun; F2= Follow-up).

Die gemessenen FoxP3-Werte bei der Patientin GW zu den einzelnen Abnahmezeitpunkten sind Tabelle 12 zu entnehmen.

Pat.-ID	FoxP3 % V- Abnahme	FoxP3 % 5/6- Abnahme	FoxP3 % F- Abnahme	FoxP3 Diff: V- 5/6
GW	2,87%	2,92%	4,37%	0,05

Tabelle12: Prozentuale Anteil der FoxP3+ Tregs an der Lymphozytenpopulation im Verlauf der Vakzinierung, sowie die Differenz zwischen der V und der 5/6- Abnahme und Mittelwerte bei GW.

Bei zwei weiteren blieben die Werte annähernd konstant (hier nicht grafisch dargestellt) (Tab. 13).

Pat.-ID	FoxP3 % V- Abnahme	FoxP3 % 5/6- Abnahme	FoxP3 % F- Abnahme	FoxP3 Diff: V - 5/6
IS	2,44%	2,6%	1,89%	0,16
KH	3,08%	2,83%	3,02%	- 0,25

Tabelle13: Prozentuale Anteil der FoxP3+ Tregs an der Lymphozytenpopulation im Verlauf der Vakzinierung, sowie die Differenz zwischen der V und der 5/6- Abnahme und Mittelwerte bei nahezu konstantem Verlauf der Pat. IS und KH.

Fazit: Es lässt sich ein Anstieg der regulatorischen T-Zellen bei insgesamt 7 Patientinnen beobachten. Das spricht für eine Aktivierung der Tregs durch Abagovomab bei einzelnen Patientinnen. Dies trifft jedoch nicht für das gesamte Kollektiv zu. Die Betrachtung der einzelnen Mittelwerte der Treg-Frequenzen bei allen immunisierten Patientinnen, ergabt hier keinen statistisch signifikanten Unterschied im Verlauf ($p > 0,05$).

III.3.3. Korrelation der Treg-Marker im Verlauf

Um zu überprüfen, wie hoch die Korrelation der beiden Treg-Marker FoxP3 und CTLA-4 im Verlauf der Immunisierung tatsächlich ist, wurden anhand von Punktwolkediagrammen die Bestimmtheitsmaße (= r^2) und deren Korrelationskoeffizienten (= r) gebildet. Die Angaben basieren auf den Mittelwerten der Parameter in allen Patientinnen.
Im Folgenden sind die berechneten Daten dargestellt (Tab. 14).

Zeitpunkt der Probenabnahme	*Korrelation* CD4+CD25+FoxP3+/ CD4+CD25+CTLA-4+	
	r^2	r
V-Abnahme	0,1119	0,3449
5/6-Abnahme	0,4206	0,6485
F2-Abnahme	0,9349	0,9669

Tabelle 14: Korrelationskoeffizient (=r^2) und Bestimmtheitsmaß (=r) der einzelnen Treg-Marker im Verlauf der Immunisierung

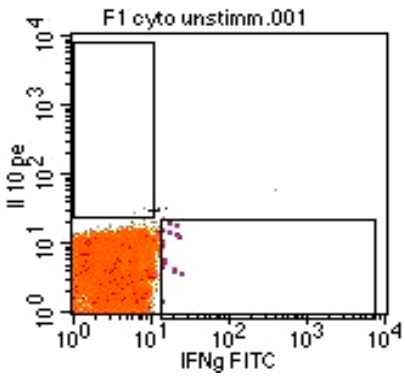
Wie der Tabelle zu entnehmen, ist die Korrelation der FoxP3+ zu CTLA-4+ T-Zellen in der Follow-up Abnahme am größten. Das heißt, dass die gemessenen Werte der CD4+/CD25+/CTLA-4+ Events in 96,69% der Fälle durch die gemessenen Werte aus dem Gate der CD4+/CD25+/FoxP3+ T-Zellen erklärt werden können und davon abhängen. Zu bemerken ist hier weiterhin, dass das Bestimmtheitsmaß der beiden Marker im Verlauf der Studie stetig steigt: r-V: 34,49%, r-5/6: 64,85%, r-F2: 96,69%. Möglicherweise ist dies dadurch zu erklären, dass CTLA-4 zum Beispiel über TGFß die FoxP3-Expression steigern kann.

Daher muss gefolgert werden, dass die Marker nicht zwangsweise die selbe T-Zellpopulation darstellen. Da nach Angaben der Literatur, FoxP3 die höhere Treg-Sensitivität hat, wurden im Weiteren FoxP3+ T-Zellen als Tregs bezeichnet.

III.4. CA125-Response

Nach dem beschriebenen Protokoll wurde zunächst nach Kurzzeitstimulation mit CA125 die Induktion spezifischer T-Effektorzellen anhand der Expression von IFNγ bestimmt. Im gleichen Ansatz wurde der mögliche Einfluss einer Zytokin-vermittelten T-Zellsuperession untersucht. Hiermit sollte die Frage geklärt werden, ob im Verlauf der Immunisierung mit Abagovomab neben CA125-spezifischen T-Zellantworten gleichermaßen suppressive Treg-Populationen aktiviert werden, die über den Nachweis von IL-10 im CFC-Assay charakteresiert werden sollten.

Dementsprechend wurde im Rahmen der Protokolletablierung mit IFNγ und IL-10 gearbeitet. Bei der Messung am FACS war jedoch, wie im folgenden DotPlot abgebildet (Abb. 11), eine IL-10-Expression in CA125-stimulierten T-Zellen nicht nachweisbar. Möglicherweise war der antigenspezifische Stimulus in vitro nicht stark genug, sodass die IL-10-Expression unter der Detektionsgrenze der Nachweismethode lag. Aus diesem Grund wurde die IL-10-Expression nicht weiter in die Auswertung aufgenommen.



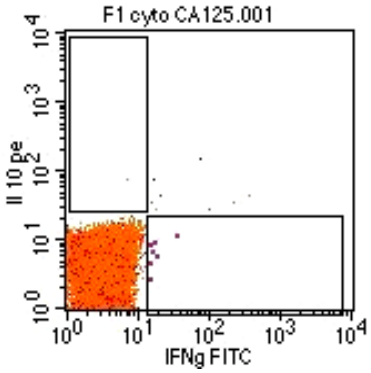


Abbildung 11: Darstellung einer Proben mit als „negativ“ bewerteten IL-10-Expression nach CA 125-Stimulation, in Vorversuchen mit markiertem Il-10-MAK für FACS-Analysen

Im Folgenden werden insgesamt 6 Patientinnen als Responder bezeichnet (Tab. 15). Diese definieren sich darüber, dass die Vakzinierung mit Abagovomab zu einer Induktion von CA125-spezifischen T-Zellresponse in CD4+ und / oder CD8+ T-Zellsubsets führte. Der Nachweis dieser erfolgte durch den Anstieg des IFNγ während, bzw. nach der Immunisierung. Dieser musste mindestens 0.05, bzw. das Zweifache des baseline-Wertes betragen.

Pat.-ID	**IFNγ- Expression %**	
	Gate CD4+	**Gate CD4-**
BW- V	0,06	0,04
- 6	0	0
- F2	0,06	0,11
UR- V	0	0
- 6	0,06	0,07
- F2	0,23	0,33
MH-V	0	0
- 6	0	0
- F2	0,02	0,05
EB- V	0,03	0,03
- 5	0	0,13
- F2	0,02	0,04
KH- V	0	0
- 6	0,07	0,1
- F2	0	0
GW- V	0	0
- 6	0	0,05
- F2	0	0,07

Tabelle15: Tabellarische Darstellung der backgroundbereinigten IFNy-Expression der CA125-spezifischen Responder unter Angabe der gemessenen Werte in der FACS-Analyse. Der Messwert entspricht dem prozentualen Anteil der IFNγ-Expression an allen detektierten events.

Bei einer Patientin (AZ) war schon vor der Immunisierung eine starke CA125-spezifische T-Zellantwort im Gate der CD4+ T-Zellen nachweisbar. Diese wurde jedoch nicht als „Responder“ gewertet, da sich die Immunantwort durch die Vakzinierung nicht weiter steigern ließ.

Pat.-ID	Gate CD4+	Gate CD4-
AZ- V	0,19	0,71
- 6	0	0,04
- F2	0	0

Neben AZ war noch bei zwei weiteren Patientinnenproben im Gate der CD8+ T-Zellen bereits vor Immunisierung eine spezifische T-Zellantwort messbar: IS: 0,06, KS: 0,06.
Im Verlauf der Immunisierung konnte im CD4+ Gate nur bei KH eine signifikante IFNγ-Produktion gemessen werden. Hier war das Zytokin ebenfalls im Gate der CD8+ T-Zellen zu detektieren. Weiterhin bestand zu diesem Zeitpunkt bei drei weiteren Patientinnen (GW, UR und EB) eine CA125-spezifische Response der CD8+ T-Zellen.

Nach der Vakzinierung zeigten noch insgesamt 2 Patientinnen eine CA125-spezifische Response der CD4+ T-Zellen: BW, UR. Neben BW und UR war weiterhin noch bei MH und GW eine CA125-spezifische Response der CD8+ T-Zellen messbar.

Ausgeprägt war die Response insbesondere dann, wenn sie sowohl im CD4+ als auch im CD8+ Gate nachweisbar war. Ist sie nur bei einer der beiden Populationen detektiert worden, war sie deutlich schwächer ausgeprägt.
Insgesamt betrachtet sind jedoch die gemessenen Werte der Response als schwach zu bewerten. Die meisten IFNγ-Werte liegen unter 0,5%. Möglicherweise ist dies darauf zurückzuführen, dass es sich in dieser Arbeit um kryokonservierte, gelagerte Proben handelt und nicht um frische PBMCs.
Auffällig ist weiterhin, dass im Gate der CD8+ T-Zellen weitaus häufiger eine

CA125 spezifische T-Zellantwort verzeichnet werden konnte. Dies könnte zum einen dadurch bedingt sein, dass aus o.g. Grund die Response im Gate der CD4+ T-Zellen zu schwach ausgeprägt war und unterhalb der Nachweisgrenze lag. Anderseits wäre es auch möglich, dass CA125 präferenziell stimulierend auf CD8+ T-Zellen wirkt. Diese Aussage kann jedoch durch keinerlei Angaben aus der Literatur unterstützt werden.

III.5. Untersuchungen zu den einzelnen T- Zellpopulationen, differenziert nach CA125-spezifischen T-Zell-Respondern und Nonrespondern

Da Tregs die Funktionalität von Effektor-T-Zellen supprimieren, sollte untersucht werden, ob sich bei denjenigen Patientinnen, die eine CA125-spezifische T-Zellresponse unter der Vakzine mit Abagovomab entwickelt haben, weniger Tregs im peripheren Blut nachweisen lassen.
Um mögliche Differenzen zwischen den Patientinnen, die eine CA125-spezifische T-Zellresponse entwickelten (Tab. 15) mit `Non-T-Zellrespondern` herausarbeiten zu können, wurden die relevanten Parameter in beiden Subgruppen einzeln zu den jeweiligen Abnahmezeitpunkten betrachtet und verglichen (Tab. 16-18). In den beiden Subgruppen der T-Zell-Responder und -Nonresponder konnten jeweils 6 Patientinnen analysiert werden.

	MW CD4+% (Stdw.)	***MW CD8+% (Stdw.)***	***MW CD4+/CD25+/ FoxP3+% (Stdw.)***	***MW CD4+/CD25+/ CTLA-4+% (Stdw.)***
Responder	30,38% (10,5)	32,96% (9,86)	3,25% (0,9)	2,31% (1,49)
Non-Responder	39,31% (9,34)	22,56% (5,62)	3,60% (2,06)	1,54% (0,64)

Tabelle 16: gemessenen Parameter in der V- Abnahme (MW unter Angabe in %, sowie Stdw in Klammern) differenziert in Responder und Non-Responder.

	MW CD4+% (Stdw.)	***MW CD8+% (Stdw.)***	***MW CD4+/CD25+/ FoxP3+% (Stdw.)***	***MW CD4+/CD25+/ CTLA-4+% (Stdw.)***
Responder	33,82% (5,72)	31,07% (13,01)	4,15% (1,25)	3,12% (1,13)
Non-Responder	38,11% (9,33)	22,12% (5,82)	4,64% (2,37)	2,17% (1,46)

Tabelle 17: gemessenen Parameter in der 5/6- Abnahme(Mittelwert, angegeben in Prozent, sowie Stdw in Klammern) differenziert in Responder und Non-Responder.

	MW CD4+% (Stdw.)	***MW CD8+% (Stdw.)***	***MW CD4+/CD25+/ FoxP3+% (Stdw.)***	***MW CD4+/CD25+/ CTLA-4+% (Stdw.)***
Responder	31,43% (9,9)	32,06% (13,03)	3,22 (1,02)	2,04% (1,14)
Non-Responder	36,65% (5,92)	24,54% (5,53)	3,50 (1,46)	2,75% (1,24)

Tabelle 18: gemessenen Parameter in der F- Abnahme (Mittelwert, angegeben in Prozent, sowie Stdw in Klammern) differenziert in Responder und Non-Responder.

Fazit: Es ergeben sich zu keinem Zeitpunkt unter der Immuntherapie mit Abagovomab statistisch signifikante Unterschiede in den Frequenzen CD4+ und CD8+ Effektor-T-Zellen zwischen Patientinnen, die eine CA125-spezifische T-Zellresponse entwickelten, und den T-Zell-Nonrespondern. Gleichermaßen bestand auch kein relevanter Unterschied zwischen diesen beiden Patientengruppen in der Frequenz der regulatorischen T-Zellen - weder über die Detektion des FoxP3-markierenden Antikörpers noch über die Expression von CTLA-4. Aufgrund dieser Beobachtung liegt zunächst der Schluss nahe, dass die Frequenz der Tregs und der Effektor-T-Zellen keinen Einfluss auf die Entwicklung einer CA125-spezifische T-Zellresponse unter Abagovomab-Therapie haben könnte.

In einer weiteren Subanalyse wurden die Patientinnenproben mit denen von gesunden Probanden verglichen. Die Parameter beschränkten sich auf CD4+, CD8+ und CD4+/CD25+/FoxP3+ T-Zellen. Relevant waren hier insbesondere die Werte vor der Applikation von Abagovomab. Es kann angenommen werden, dass zu diesem Zeitpunkt die Vergleichbarkeit der beiden Gruppen am besten möglich war, da ein Einfluss durch die Immunisierung ausgeschlossen werden konnte. Veränderungen der Parameter im weiteren Verlauf der Studie könnten somit auf Abagovomab zurückzuführen werden.

Es ließen sich signifikante Unterschiede in den gemessenen Frequenzen der einzelnen Populationen der CD4+ und CD8+ T-Zellen in den prä-immunisierten Abnahmen nachweisen (Tab. 19). Dabei zeigten die Proben der Patientinnen signifikant mehr CD8+ T-Zellen und weniger CD4+ T-Zellen im Vergleich zu Normalpersonen. Weiterhin war die ratio dieser beiden Populationen zueinander sowie die ratio der CD8+ T-Zellen / Tregs deutlich zugunsten der CD8+ T-Zellen verändert.

	Gesunde	**Pat. total bei V**	***p***
CD4+ % - Mittelwert	49,02%	38,8475%	0,0012
CD8+ % - Mittelwert	17,73%	27,7617%	0,008
CD4+/CD8+ ratio	2,96	1,45	0,013
CD8+/Treg ratio	4,04	8,70	< 0,001

Tabelle 19: Vergleich ausgewählter T-Zellpopulationen und ratios bei Gesunden und baseline der Patientinnen. Der Vergleich bezieht sich auf die Mittelwerte der einzelnen Subgruppen, die Angaben der CD4+ und CD8+ T-Zellen stellen den prozentualen Anteil an der gesamten Lymphozytenpopulation dar

Bei Betrachtung des Patientenkollektivs im weiteren Verlauf der Studie waren die genannten Unterschiede im Vergleich zu den Normalpersonen weiterhin nachweisbar (Tab. 20).

	Gesunde	**t**	**Pat. total**	***p***
CD4+ % - Mittelwert	49,02%	*Abagovomab*	35,97%	< 0,01
		Follow-up	34,04%	< 0,01
CD8+ % - Mittelwert	17,73%	*Abagovomab*	26,59%	0,03
		Follow-up	28,3%	0,01
CD4+/CD8+ ratio	2,96	*Abagovomab*	1,54	0.02
		Follow-up	1,38	0,01
CD8+/Treg ratio	4,04	*Abagovomab*	6,87	0,03
		Follow-up	9,24	< 0,01

Tabelle 20: Vergleich ausgewählter T-Zellpopulationen und ratios bei Gesunden und der Patientinnen im weiteren Verlauf(= t). Der Vergleich bezieht sich auf die Mittelwerte der einzelnen Subgruppen, die Angaben der CD4+ und CD8+ T-Zellen stellen den prozentualen Anteil an der gesamten Lymphozytenpopulation dar. Auch im weiteren Verlauf ist hier ein signifikanter Unterschied zwischen den Patientinnen und Gesunden zu verzeichnen ($p < 0,05$) (t = Zeitpunkt der Probenabnahme)

Bei genauerer Betrachtung dieser Ergebnisse in der prä-immunisierten Abnahme und weiterer Differenzierung der Patientinnengruppe fiel auf, dass dieser Unterschied insbesondere auf die Subgruppe der T-Zell-Responder zurückzuführen ist. Hier zeigt sich ein signifikanter Unterschied der CD8+/Treg – ratio zwischen den beiden Gruppen (Tab. 21). Da die Treg-Frequenzen vergleichbar mit denen von Normalpersonen waren und sich im Verlauf der Studie nicht signifikant verändert haben, könnte dies auf Veränderungen der CD8+ T-Zellgruppe zurückzuführen sein. Obwohl ein Vergleich der CD8+ T-Zellen zwischen Responder und Non-Responder mit einem $p = 0,06$ nicht statistisch signifikant erscheint, könnte es dennoch als Hinweis auf höhere Frequenzen der CD8+ T-Zellen in der Gruppe der CA125-spezifischen T-Zell-

Responder gedeutet werden. Da es sich hier jedoch um eine Studie mit geringen Fallzahlen handelt, wären die Überprüfung dieses Ansatzes und der Nachweis einer möglicherweise bestehenden Signifikanz in weiteren Studien mit einem größeren Patientenkollektiv möglich.

	Responder V-Abnahme	**Non-Responder V-Abnahme**	**p**
CD4+ % - Mittelwert	30,38%	39,31%	0,15
CD8+ % - Mittelwert	32,96%	22,56%	0,06
CD4+/CD8+ ratio	1,03	1,88	0,06
CD8+/Treg ratio	10,25	7,14	0,02

Tabelle 21: Vergleiche der CD4+ und CD8+ T-Zellen, sowie CD4+/CD8+ratio und CD8+/Treg-ratio bei Responder sowie Non- Responder zum Zeitpunkt der prä-immunen Abnahme. Der Vergleich bezieht sich auf die Mittelwerte der einzelnen Subgruppen, die Angaben der CD4+ und CD8+ T-Zellen stellen den prozentualen Anteil an der gesamten Lymphozytenpopulation dar

Fazit: Aus diesem Ergebnis lässt sich schließen, dass eine bereits vor der Vakzinierung mit Abagovomab vorhandene, hohe CD8 / Treg- ratio mit einer höheren Wahrscheinlichkeit zu einer T-Zellresponse führt. Eine signifikante Korrelation zwischen einer resultierenden T-Zellantwort und einer verbesserten Prognose kann aufgrund der kleinen Patientenanzahl jedoch nicht nachgewiesen werden. Es zeigt sich lediglich eine positive Tendenz, die noch in weiteren Studien mit größerem Kollektiv belegt werden muss.

Im weiteren Verlauf der Studie ist weiterhin zu beobachten, dass die einzelnen Lymphozytenpopulationen und deren ratios während und nach der Immunisierung keine weiteren signifikanten Unterschiede zwischen Responder und Non-Responder mehr aufweisen (Tab. 22).

	t	Responder	Non-Responder	*p*
CD4+ % - Mittelwert	*Abagovomab*	33,82%	38,11%	0,36
	Follow-up	31,43%	36,65%	0,3
CD8+ % - Mittelwert	*Abagovomab*	31,07%	22,12%	0,17
	Follow-up	32,06%	24,54%	0,23
CD4+/CD8+ratio	*Abagovomab*	1,27	1,81	0,12
	Follow-up	1,22	1,54	0,4
CD8+/Treg ratio	*Abagovomab*	8,05	5,88	0,23
	Follow-up	10,37	8,11	0,33

Tabelle 22: Vergleiche der CD4+ und CD8+ T-Zellen, sowie CD4+/CD8+ratio und CD8+/Treg-ratio bei Responder sowie Non- Responder im Verlauf (= t). Der Vergleich bezieht sich auf die Mittelwerte der einzelnen Subgruppen, die Angaben der CD4+ und CD8+ T-Zellen stellen den prozentualen Anteil an der gesamten Lymphozytenpopulation dar. Hier zeigen sich keine weiteren signifikanten Unterschiede im Verlauf ($p > 0,05$). (t = Zeitpunkt der Probenabnahme)

III. 6. CTLA-4- Block

Da vergleichenden Analysen der T-Zell-Responder versus T-Zell-Nonresponder darauf hinweisen, dass eine erhöhte CD8+Teff/FoxP3+Treg – ratio möglicherweise die Induktion einer CA125-spezifischen T-Zellantwort durch Abagovomab begünstigt, wurde in den folgenden Experimenten der Effekt einer Blockade des CTLA-4 durch einen monoklonalen Antikörper auf die tumorgerichtete T-Zellwirkung in vitro untersucht. Grundlage hierfür ist die Annahme, dass eine Blockade der CTLA-4-induzierten Signalkaskade einerseits die Suppression durch Tregs hemmt, anderseits eine Aktivierung von Teffs begünstigt und auf diese Weise eine Verschiebung der Treg/Teffs – Ratio zugunsten der Effektor-T-Zellresponse bewirkt.

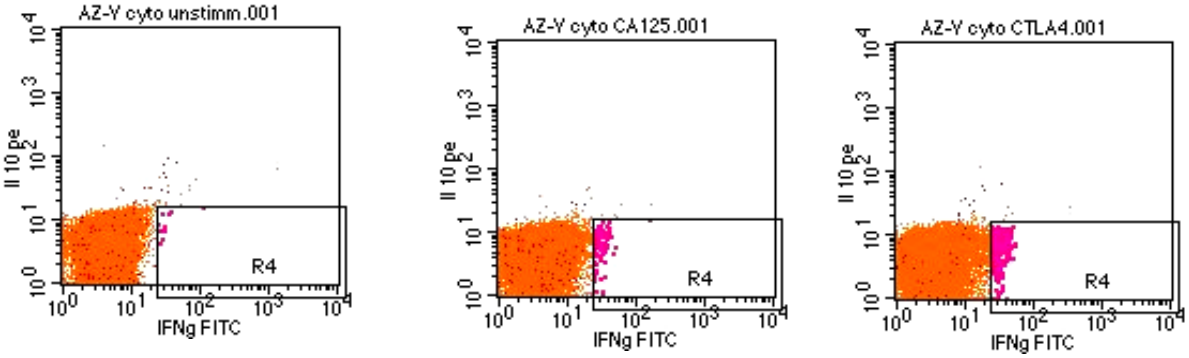
In den folgenden Tabellen wird in den Spalten der Proben der gemessene Rohwert nach Abzug der background-Stimulation (unstimulierte Kontrollen) angegeben (Tab. 20 - 22)

Prä-immun (V-Abnahmen) konnte bei 4 von 12 Patientinnen ein positiver Effekt der CTLA-4-Blockade auf den Nachweis CA125-spezifischer T-Zellen induziert werden. Diese Auswirkungen waren gleichermaßen auf CD4+ und CD8+ T-Zellsubsets nachweisbar (Tab. 23). Dabei ist jedoch anzumerken, dass die Effekte der CTLA-4-Blockade unterschiedlich stark ausgeprägt waren.

Pat.-ID/ prä-immun	**T-Zell-Subset**	**CA125**	**CA125 + CTLA- 4-AK**	***Diff.:CTLA-4 - CA125***
AZ- V	CD4+	0,19	0,54	*0,35*
	CD8+	0,71	1,28	*0,57*
KS- V	CD4+	0,02	1,49	*1,47*
	CD8+	0,06	1,66	*1,6*
UR- V	CD4+	0	0,14	*0,14*
	CD8+	0	0,28	*0,28*
IS- V	CD4+	0,03	0,13	*0,1*
	CD8+	0,07	0,17	*0,1*

Tabelle 23: Angabe der gemessenen IFNy-Expression der als Block-positiv gewerteten Patientinnenproben als prozentualer Anteil aller gezählter Events jeweils im Gate der CD4+ und CD8+ T-Zellen abzüglich des backgrounds aus prä-immunisierten Abnahmen.

Nur einer Patientin (AZ) zeigte bereits prä-immun eine deutliche CA125-spezifische CD4+ und CD8+ T-Zellantwort (Abb. 12), die durch CTLA-4-Blockade noch gesteigert werden konnte.



R4= 0,04 0,23 0,58

Abbildung 12: Darstellung der Patientenprobe AZ zum prä-immunen Zeitpunkt mit einer CA-125-spezifischen T-Zellresponse und einer als „positiv“ bewerteten IFNy-Expression nach CTLA-4-Block

Bei den restlichen 3 Patientinnen konnte nach alleiniger Stimulation mit CA125 keine IFNγ-Sekretion nachgewiesen, jedoch mittels Blockade des CTLA-4 induziert werden. Das spricht dafür, dass in einigen Patientinnen bereits vor Therapie mit Abagovomab prinzipiell CA125-spezifische T-Zellen im peripheren Blut existieren, die jedoch nicht funktional sind. Durch Blockade des CTLA-4-Moleküls scheint eine Steigerung der Frequenz funktionaler natürlicher CA125-spezifischer T-Zellen, die IFNγ produzieren, auch ohne Vakzinierung mit Abagovomab möglich zu sein.

Nach 5-6 Vakzinierungen mit Abagovomab (5/6 Abnahme) konnte bei 4 von 12 Patientinnen ein deutlicher Effekt einer CTLA-4-Blockade auf die Induktion CA125-spezifischer T-Zellen nachgewiesen werden (Tab. 24).

Pat.-ID / peri-immun	T-Zell-Subset	CA125	CA125 + CTLA- 4-AK	*Diff: CTLA-4 – CA125*
UR- 6	CD4+	0,06	2,99	*2,93*
	CD8+	0,07	3,97	*3,9*
IS- 6	CD4+	0	0,1	*0,1*
	CD8+	0	0,12	*0,12*
GW- 6	CD4+	0	0,11	*0,11*
	CD8+	0,5	0,11	*0,06*
AZ- 6	CD4+	0	1,64	*1,64*
	CD8+	0,04	1,8	*1,76*

Tabelle 24: Angabe der gemessenen IFNy-Expression der als Block-positiv gewerteten Patientinnenproben als prozentualer Anteil aller gezählter Events jeweils im Gate der CD4+ und CD8+ T-Zellen abzüglich des backgrounds aus peri-immunisierten Abnahmen.

Bei keiner dieser Patientinnen war durch alleinige Stimulation mit CA125 eine Detektion IFNγ-exprimierender T-Zellen möglich. Daher könnte spekuliert werden, dass Abagovomab zwar CA125-spezifische T-Zellen induziert, die aber durch immunsuppressive Mechanismen (wie CTLA-4) funktional inhibiert werden. Interessanterweise wurde bei drei Patientinnen (AZ, UR, IS) ein positiver Effekt der CTLA-4-Blockade auf den Nachweis CA125-spezifischer T-Zellen bereits prä-immun sowie nach 5-6 Applikation Abagovomab beobachtet. Dies könnte dafür sprechen, dass bei bestimmten Patientinnen eine CTLA-4 vermittelte Immunsuppression einen höheren Stellenwert einnimmt als bei anderen, bei denen möglicherweise andere Suppressionsmechanismen im Vordergrund stehen.

Die weitere Analyse der Follow-up-Proben nach Beendigung der Therapie mit Abagovomab zeigte wiederum einen positiven Effekt der CTLA-4-Blockade bei 3 der 12 getesteten Patientinnen, welcher gleichermaßen auf beiden T-Zellsubsets zu finden war (Tab. 25).

Pat.-ID / Follow-up	T-Zell-Subset	CA125	CA125 + CTLA- 4-AK	*Diff.: CTLA-4 - CA125*
UR- F2	CD4+	0,23	0,4	*0,17*
	CD8+	0,33	0,7	*0,37*
PS- F2	CD4+	0	0,25	*0,25*
	CD8+	0	0,47	*0,47*
IS- F2	CD4+	0	3,01	*3,01*
	CD8+	0,04	3,42	*3,38*

Tabelle 25: Angabe der gemessenen IFNy-Expression der als Block-positiv gewerteten Patientinnenproben als prozentualer Anteil aller gezählter Events jeweils im Gate der CD4+ und CD8+ T-Zellen abzüglich des backgrounds aus den Abnahmen im Follow-up

Abschließend lässt sich sagen, dass sich bei zwei Patientinnen (UR und IS) die positive Auswirkungen der CTLA-4-Blockade vor, während und nach Beendigung der Abagovomab-Therapie zeigen. Eine Patientin (AZ) zeigte positive Effekte der CTLA-4 Blockade vor und während der Therapie, während insgesamt bei 2 weiteren Patientinnen (GW, PS) jeweils nur zu einem Zeitpunkt unter Therapie eine Steigerung der CA125-spezifischen T-Zellen durch CTLA-4-Block möglich war.

Um weitere mögliche Differenzen der CTLA-4-Block-positiven und -negativen Patientinnenproben besser herausarbeiten zu können, wurden in Subanalysen die einzelnen T-Zellpopulationen und die entsprechenden ratios dieser beiden Subgruppen betrachtet.
Insbesondere bestand die Frage eines möglichen Zusammenhangs zwischen den gemessenen Treg-Frequenzen und einem positiven Block-Effekt.
Entsprechende Analysen der Daten zeigten jedoch in den beiden Subgruppen der CTLA-4-Block-positiven und -negativen Patientinnenproben keine signifikanten Unterschiede dieser T-Zell-Subpopulation im Verlauf (Tab. 26). Somit sind Rückschlüsse von den gemessenen FoxP3+ Treg-Frequenzen auf einen positiven Blockeffekt nicht möglich.

Zeitpunkt der Probenabnahme	*Fox-P3- Mittelwert +Stdw*		
	Gruppe CTLA-4-Block-positiv	**Gruppe CTLA-4-Block-negativ**	*p*
V-Abnahme	4,05 (2,63)	3,14 (0,64)	> 0,05
5/6-Abnahme	3,88 (1,33)	4,73 (2,16)	> 0,05
Follow-up	4,11 (2,45)	3,12 (0,98)	> 0,05

Tabelle 26: Mittelwerte der gemessenen FoxP3-Frequenzen zu den einzelnen Abnahmezeitpunkten in den Subgruppen der CTLA-4-Block-positiven und -negativen Proben unter Angabe der Standardabweichung (= Stdw.) in Klammern. Es ergibt sich kein signifikanter Unterschied ($p > 0,05$) (

Die Analyse der weiteren T-Zellsubsets, sowie der ratios ergab ebenfalls keinen signifikanten Zusammenhang zu einem positiven Effekt des CTLA-4-Blocks.

Somit kann keine der quantitativ untersuchten T-Zellpopulationen als Prädiktor für die Entwicklung einer Neuinduktion, bzw. Steigerung einer CA125-spezifischen T-Zellresponse nach Blockierung des CTLA-4-Rezeptors herangezogen werden.

Fazit: Die Induktion, bzw. Steigerung einer CA125-spezifischen T-Zellantwort ist im Verlauf der Abagovomab-Therapie (Abnahme 5/6, bzw. Follow-up) bei 5 von 12 Patientinnen durch Blockade der CTLA-4-Rezeptoren in vitro möglich.
Die Ergebnisse der präimmunen Abnahmen zeigen jedoch auch, dass der Effekt der CTLA-4-Blockade auf die CA125-spezifische T-Zellresponse von Abagovomab unabhängig ist. Dies deutet darauf hin, dass eine CA125-spezifische Immunität in Patientinnen mit fortgeschrittenem Ovarialkarzinom prinzipiell vorhanden sein kann, jedoch von suppressiven Mechanismen unterdrückt wird.
Weiterhin spricht die Tatsache, dass eine Steigerung einer CA125-spezifischen

T-Zellantwort durch die Blockade des CTLA-4-Rezeptors nicht in allen Patientinnenproben beobachtet werden konnte, dafür, dass eine CLTA-4-vermittelte Suppression nicht der einzige immunsuppressive Mechanismus ist. Eine Steigerung der immunologischen Effizienz von Abagovomab durch den generellen Einsatz einer zusätzlichen CTLA—4-Blockade *in vivo* wäre nicht ausreichend. Welche Subgruppen jedoch davon profitieren würden, müsste in weiteren Untersuchungen noch evaluiert werden.

Da in der vorliegenden Arbeit keine Assoziation zwischen FoxP3-Tregs und einem positiven Effekt des CTLA-4-Blocks gezeigt werden konnte (Tab. 23), spricht dieses Ergebnis dafür, dass die Blockade eher zu einer gesteigerten Aktivierung der Effektor-T-Zellen führt und weniger die Treg-vermittelte Suppression beeinflusst.

IV. Diskussion

IV. 1. Kurze Wiederholung der Fragestellung und der Ergebnisse

Die Ergebnisse sollten vor dem Hintergrund der Fragestellung dieser Arbeit kritisch diskutiert werden.

1. Fragestellung:

- Sind Unterschiede in der Frequenz von regulatorischen T-Zellen im peripheren Blut im Verlauf der Immuntherapie zu beobachten?

- Besteht eine Korrelation zwischen der Entwickelung einer CA125-spezifischen T-Zellantwort und der Anzahl der regulatorischen T-Zellen?
- Kann die tumorspezifische T-Zellresponse, die durch Abagovomab induziert wurde, durch Blockade des CTLA-4-Antigens *in vitro* gesteigert werden?

2. Hauptergebnisse dieser Arbeit

- In dem untersuchten Kollektiv von 12 Patientinnen mit fortgeschrittenem Ovarialkarzinom (FIGO III / IV) konnte im Mittel keine signifikante Veränderungen in den Frequenzen der CD4+, CD8+, CD4+CD25+FoxP3+ bzw. C4+CD25+CTLA-4+ Treg, sowie der ratio zwischen Effektor-T-Zellen / Treg im Verlauf der Immunisierung mit Abagavomab festgestellt werden. Jedoch konnte bei 7 von 12 Patientinnen ein Trend zu erhöhten Treg-Frequenzen nach 5-6 Vakzinierungen beobachtet werden, die sich im Follow-up wieder auf Baseline-Level reduzierten. Hier darf jedoch die Statistik aufgrund der kleinen Fallzahlen weder im positiven noch im negativen Sinne überbewertete werden. Deutlichere Aussagen diesbezüglich wären erst durch Arbeiten mit einem größeren Kollektiv möglich.
  Weiterhin konnten signifikante Unterschiede in den Frequenzen der CD4+, CD8+ sowie der ratios der CD4+ / CD8+ und CD8+ / FoxP3-Treg zwischen Normalpersonen und den Patientenproben nachgewiesen werden. Diese waren nicht nur zum Zeitpunkt der prä-immunen Abnahme vorhanden, sondern ließen sich weiterhin während der Immunisierung und im Follow-up nachweisen.

- Es ist gelungen in Kurzzeitkulturen in *ex-vivo* Versuchen über einen Antikörper-vermittelten Block des CTLA-4-Moleküls auf zellulärer Ebene eine Response auf das Antigen CA125 zu induzieren, bzw. zu verstärken.

- Es war nicht möglich einen direkten Zusammenhang zwischen der Induktion einer CA125-spezifischen T-Zellresponse und der Frequenz regulatorischer T-Zellen herzustellen.

- Retrospektive Betrachtungen zeigten eine positive Assoziation zwischen der ratio CD8+/Tregs in der prä-immunen Phase und der Entwicklung einer CA125-spezifischen T-Zellantwort durch Immunisierung mit Abagovomab im Verlauf der Studie.

- Ein Zusammenhang zwischen Treg-Frequenz und einem positiven Effekt des CTLA-4-Rezeptor-Blocks in Bezug auf eine CA125-spezifische T-Zellaktivierung ließ sich nicht herstellen. Dieses Ergebnis unterstützt den bereits in der Literatur beschrieben Verdacht, dass eine Blockade des CTLA-4-Rezeptors weniger die Treg-abhängige Suppression beeinflusst, sondern vielmehr zu einer gesteigerten Aktivität der Effektor-T-Zell-Population führt.

IV.2. Vergleich der Ergebnisse mit der Literatur

IV.2.1. T-Zell-Subsets

IV.2.1.1 Regulatorische T-Zellen

Im Rahmen der Fragestellung dieser Arbeit ging es insbesondere um die Rolle der immunsuppressiv wirksamen regulatorischen T-Zellen bei Patientinnen mit fortgeschrittenem Ovarialkarzinom im Rahmen einer Antikörpertherapie mit dem anti-idiotypischen monoklonalen Antikörper Abagovomab. Diese Subpopulation der T-Zellen ist im Hinblick auf ihre Rolle im Immunsystem, die grundlegenden Funktionsmechanismen und mögliche Interaktionen vergleichsweise noch relativ neu und unbekannt. Zum heutigen Zeitpunkt sind bereits diverse Möglichkeiten einer Treg-induzierten Suppression beschrieben worden. Die Ergebnisse sowie mögliche Ansätze diesbezüglich sind kontrovers und stehen im Rahmen der laufenden Forschung zur Debatte.
Einigkeit besteht darüber, dass es scheinbar nicht nur eine Population regulatorischer T-Zellen gibt, sondern mehrere verschiedene, die sich in ihrem Phänotyp unterscheiden können. Eine grobe Einteilung erfolgt weiterhin entsprechend ihrer Genese in *natural* und *aquired* Tregs. Während *natural* Tregs (*nat.* Tregs) schon intrauterin im Thymus generiert werden und autoimmune Prozesse hemmen sollen, entstehen *aquired* Tregs im Verlauf des Lebens unter Kontakt mit neuen Antigenen. Sie sollen überschießende Immunantworten verhindern und somit zum immunologischen Gleichgewicht beitragen.

In dieser Arbeit sollte es vor allem um die Gruppe der FoxP3+ Tregs gehen. Diese exprimieren laut Literatur neben CD3, CD4, CD25 insbesondere FoxP3 konstitutiv. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass sie den B7 Liganden CTLA-4 überexprimieren können. Bisher bestand die Annahme, dass es sich hierbei um die Gruppe der *natural* Tregs handelt. Es muss jedoch erwähnt werden, dass mittlerweile auch *aquired* Tregs beschrieben werden, die diese Marker exprimieren können. Somit ist eine phänotypische Differenzierung

dieser beiden Gruppen zum heutigen Zeitpunkt nicht definitiv möglich. Von diesen Markern hat, laut heute gängiger Meinung, FoxP3 die höchste Sensitivität, da es präferenziell auf den anergen regulatorischen T-Zellen exprimiert wird und für die Generierung, das Überleben und die Funktion dieser Population essenziell zu sein scheint. Die genauen Mechanismen sind hier jedoch noch weitestgehend unbekannt und Gegenstand laufender Forschung.

Im Hinblick auf die Rolle regulatorischer T-Zellen in der Onkogenese, bzw. deren direkte klinische Relevanz bezüglich Prognose und Überlebenszeit, sind bereits zahlreiche Untersuchungen anhand unterschiedlicher Tumorentitäten durchgeführt worden. Anhand dieser wird postuliert, dass bei Karzinompatienten eine gesteigerte Treg-Frequenz vorliegt und dies eine wesentliche Rolle im Hinblick auf das klinische Outcome spielt. Zum besseren Vergleich wurde die Arbeit von B. Barnet herangezogen, der 2005 in einer Arbeit bei 66 Patientinnen mit Ovarialkarzinom zum einen signifikant erhöhte intratumorale Frequenzen CD4+CD25+ regulatorische T-Zellen nachweisen konnte, die in enger Assoziation zum Tumorstadium stiegen. Zum anderen konnte ein direkter Zusammenhang ($p < 0{,}0001$) zwischen tumorinfiltrierenden regulatorischen T-Zellen und der Überlebenszeit festgestellt werden.
In der vorliegenden Arbeit konnte dies weder vor, noch nach der Immunisierung mit Abagovomab bestätigt werden: Die gemessenen Treg-Frequenzen waren mit denen gesunder Probanden vergleichbar. Hierbei ist jedoch zu bedenken, dass in dieser Arbeit mit Proben aus peripherem Blut gearbeitet wurde, die nicht zwangsweise die intratumorale Situation reflektieren. Somit erscheint ein direkter Vergleich als schwierig. Bezüglich des Überlebens kann keine vergleichende Aussage gemacht werden, da der Einfluss durch Abagovomab retrospektiv nicht ausgeschlossen werden kann.
In diesem Zusammenhang kann auch die beobachtete transiente Response in der zugrunde liegenden AGO-Studie betrachtet werden. Es stellt sich die Frage, inwiefern diese durch den Einfluss regulatorischer T-Zellen erklärt werden kann. Unter der Annahme, dass sich die höchsten Treg-Konzentrationen in der direkten Tumornähe finden lassen, könnte die Antikörper-induzierte Migration tumorinfiltrierender regulatorischer T-Zellen in den peripheren Kreislauf und eine damit verbundene reduzierte Response

einen möglichen Erklärungsansatz darstellen. Zur Überprüfung dieser Hypothese müsste man jedoch Treg-Frequenzen im Verlauf einer Immunisierung mit Abagovomab in beiden Kompartimenten messen: sowohl im peripheren Blut als auch intratumoral. Somit könnten Veränderungen der Treg-Frequenz und möglicherweise auch der T-Zellantwort im Verlauf einer Immunisierung festgestellt werden.

Weiterhin gibt es Hinweise, dass die einzelnen Populationen der regulatorischen T-Zellen keine stabile Einheit darstellen, sondern sowohl extrinsischen als auch intrinsischen Modulatoren unterliegt. Es konnte gezeigt werden, dass nicht nur eine Aktivierung, bzw. Neuinduktion der Tregs aus naiven T-Zellen möglich ist, sonder auch eine induzierte Reduktion und vollständiger Verlust des FoxP3 und somit der suppressiven Funktion (Zhou, 2009). Vor diesem Hintergrund erscheint also die Modifikation der Treg-Population in den untersuchten Patientenproben durch externe Modulatoren, wie z.B. Abagavomab, zumindest als möglich. Ob und welchen Einfluss Abagovomab oder das Ovarialkarzinom selbst in diesem Zusammenhang haben, konnte im Rahmen der Zielsetzung dieser Arbeit jedoch nicht weiter überprüft werden.

Vor dem Hintergrund, dass in dieser Arbeit eine spezifische T-Zellantwort auf ein definiertes Antigen detektiert wurde, wäre eine weitere interessante Frage, ob eine hierzu korrelierende Antigenspezifität der untersuchten regulatorischen T-Zellen vorliegt. Einige Autoren gehen davon aus, dass Tumorgewebe in der Lage ist, spezifische Tregs zu induzieren, die eine Effektor-T-Zellantwort gegen Karzinomzellen inhibieren (Mao 2008). Diese Population soll sich in ihrem Phänotyp nicht von den *nat.* Tregs unterscheiden, jedoch nur gegen tumorspezifische T-Zellen gerichtet sein. So konnte die Arbeitsgruppe um Bonertz und Weitz 2009 bei Patienten mit kolorektalem Karzinom TAA-spezifische regulatorische T-Zellen mittels Treg-Spezifitäts-Assays nachweisen. Nach Depletion der Tregs mithilfe eines MACS-Systems war eine Antigen-spezifische, signifikante Zunahme der Effektor-T-Zell-IFNγ-Expression nachweisbar. Hingegen wird den natürlichen regulatorischen T-Zellen eine unspezifische und an allen Teffs gleichermaßen wirksame Suppression

zugeschrieben. Im Rahmen dieser Arbeit konnte jedoch aus technischen Gründen nicht weiter differenziert werden, ob die untersuchten Tregs tumorspezifisch sind oder nicht, da das limitierte Probenmaterial eine erforderliche Separation, Expansion und tumorspezifische Stimulation der einzelnen Treg-Klone nicht erlaubte.

IV.2.1.1.1. Mögliche Einflussfaktoren auf die regulatorischen T-Zellen

Mögliche Faktoren, die einen Einfluss auf die T-Zellen haben, sind, neben Abagovomab, zum einen Autoimmunerkrankungen. Des Weiteren zählen bakterielle und parasitäre Erkrankungen dazu, wie z.B. die Leishmaniose oder banale bakterielle Infekte. In beiden Fällen haben Tregs eine protektive Rolle durch Limitierung der Immunantwort. Sie gewähren somit Schutz vor überschießenden Reaktionen, wie sie zum Beispiel bei Erkrankungen des allergischen Formenkreises beobachtet werden. Obwohl klinisch relevante autoimmune und allergische Erkrankungen zu den Ausschlusskriterien der zugrunde liegenden AGO-Studie zählten, kann retrospektiv der gesundheitliche Zustand, insbesondere im Hinblick auf subklinische infektiöse Erkrankungen der Patientinnen zum Zeitpunkt der Abnahme nicht mehr differenziert beurteilt werden.

Von weitaus größerer Bedeutung könnte allerdings der Einfluss der vorausgegangenen zytostatischen Therapie sein. Alle Patientinnen der AGO-Studie haben entsprechend den Studieneinschlusskriterien postoperativ eine Chemotherapie erhalten. Es war zwar ebenfalls Voraussetzung, dass die Leukozyten vor Beginn der Vakzinierung im Normbereich liegen, jedoch sagt diese Angabe nichts über die immunologische Funktionalität der T-Zellen sowie deren einzelnen Subpopulationen und Frequenzen aus. Es ist bislang nicht ausreichend detailliert untersucht, jedoch Gegenstand laufender Forschung, ob und wie Zytostatika die einzelnen T-Zell-Populationen verändern könnten.
Wie von einigen Autoren bereits beschrieben (A.M. Wolf .2003; U.K. Liyabage 2002), konnte bei Patienten mit Mamma-, Pankreas- oder kolorektalem Karzinom eine im Vergleich zu gesunden Normalpersonen erhöhte Frequenzen

regulatorischer T-Zellen im peripheren Blut nachgewiesen werden. In diesen Studien haben die Patienten mindestens drei Monate zuvor keine Chemotherapie erhalten. Es kann also nicht ausgeschlossen werden, dass neben der Angabe einer normwertigen Gesamtanzahl der Lymphozyten zudem der zeitliche Abstand zwischen Beendigung der Chemotherapie und Probenentnahme im Rahmen der Studie eine Rolle spielte. Der Zeitfaktor könnte also ebenfalls eine mögliche Ursache dafür sein, dass sich in den Ergebnissen dieser Arbeit kein signifikanter Unterschied der Treg-Frequenzen in Patientenproben im Vergleich zu gesunden Kontrollpersonen finden lässt.
Weiterhin gibt es Hinweise, dass bestimmte Chemotherapeutika regulatorische T-Zellsubpopulation eliminieren können (Ghiringhelli F. 2006), was ebenfalls die fehlenden Unterschiede zu Normalpersonen in dieser Arbeit erklären würde. Veltman und Mitarbeiter konnten 2010 in *in vitro* Versuchen zeigen, dass es unter Cyclophosphamid zu einer signifikanten Reduktion regulatorischer T-Zellen kommt ($p<0,05$). Hier stellte sich ebenfalls heraus, dass insbesondere die Kombination zwischen einer Chemotherapie und einer auf dendritischen T-Zellen basierenden Immuntherapie zu einer gesteigerten tumorgerichteten Aktivität führte. Inwiefern dieser Ansatz auf *in vivo* Bedingungen übertragbar ist und eine klinische Relevanz spielt, muss jedoch noch weiter überprüft werden. Es zeigt jedoch klar, dass sich eine Tendenz dahingehend abzeichnet, unterschiedliche therapeutische Ansätze zu kombinieren, um eine Optimierung des klinischen Outcomes erreichen zu können.

Die initiale Annahme, dass der transiente Nachweis CA125-spezifischer T-Zellantworten während der Vakzinierung mit Abagovomab auf steigende Treg-Frequenzen unter der Immunisierung zurückzuführen sein könnte, konnte nicht bestätigt werden. Diese Beobachtung ist als positiv zu betrachten, da bereits in Arbeiten mit anderen Antikörpervakzinen ein reduziertes Ansprechen bedingt durch steigende Treg-Frequenzen beobachtet werden konnte (Wada J. 2009; Nakai N. 2009). Jedoch darf die Statistik aufgrund der kleinen Fallzahlen nicht überbewertet werden. Insbesondere da sich zumindest ein tendenzieller Treg-Anstieg bei 7 von 12 Patientinnen unter der Therapie mit Abagovomab verzeichnete, sollte dies kritischen Anlass geben, dies an einem größeren Kollektiv zu überprüfen. Weiterhin konnte in der vorliegenden Arbeit keine

signifikante Assoziation zwischen der Entwickelung einer tumorspezifischen T-Zellresponse nach Vakzinierung mit Abagovomab und den gemessenen Treg-Frequenzen beobachtet werden.

IV.2.1.1.2. Korrelation der gemessenen Treg-Marker

Wie im Ergebnisteil gezeigt werden konnte, korrelieren die einzelnen Treg-Marker insbesondere in den Follow-up-Abnahmen sehr hoch miteinander. Im Gegensatz dazu ist der Korrelationskoeffizient in den prä-immunen Abnahmen mit 0,1119 niedrig und praktisch nicht von Relevanz. Das bedeutet, dass die markierte Population alle hier verwendeten Antigene erst im Verlauf der Immunisierung zunehmend an ihrer Oberfläche exprimiert.
Eine mögliche Erklärung der beschriebenen Korrelation im Follow-up wäre, dass die Immunisierung mit Abagovomab im Verlauf zur Induktion von Treg-Subpopulationen geführt hat, die sowohl FoxP3 als auch CTLA-4 exprimieren.
Ein weiterer Ansatz wäre die Neuinduktion regulatorischer T-Zellen aus naiven CD4+ Zellen im Verlauf der Vakzine. In diesem Fall würde es sich bei den dargestellten Populationen um *aquired* Tregs handeln, die phänotypisch den *natural* Tregs gleichen. In der Literatur finden sich zur Generierung induzierter Tregs mehrere Untersuchungen. Eine davon beschreibt, dass es unter dem Einfluss von TGFß zu einer Steigerung der FoxP3-Expression auf naiven T-Zellen und somit der Generierung neuer regulatorischer T-Zellen kommen kann (Zheng 2006). Diese Gruppe weist den gleichen Phänotyp auf, wie die *nat.* Tregs. Eine standardisierte Möglichkeit diese phänotypisch voneinander zu unterscheiden gibt es jedoch zum heutigen Zeitpunkt noch nicht. Da im Rahmen der Zielsetzung dieser Arbeit die Generierung neuer Treg-Subpopulationen keine Rolle spielte, kann dieser Ansatz mit den vorliegenden Ergebnissen nicht unterstützt werden.

Die geringe Korrelation der gemessenen Parameter in den prä- und perimmunisierten Abnahmen könnte darüber hinaus auch dadurch bedingt sein, dass insbesondere CD25 und CTLA-4 aber auch FoxP3 transient auf aktivierten Effektorzellen nachweisbar sind. So könnte eine Aktivierung der

Teffs zum Zeitpunkt der Probenentnahme zu einer gesteigerten Expression des CTLA-4 geführt haben. Das wiederum könnte die Korrelation zu den anderen Markern negativ verändert haben. Um diese Annahme zu überprüfen, wäre eine zusätzliche Phänotypisierung der Teffs mit CD127 zur Differenzierung von regulatorischen T-Zellen möglich (Simonetta 2010).
Letztendlich sagt der alleinige quantitative Nachweis des FoxP3 und CTLA-4 nichts über das suppressive Potenzial der entsprechenden T-Zellpopulationen aus. Aufschluss hierüber können nur funktionale Treg-Suppressorassays geben.

IV. 2.1.2. Rolle der Effektor-T-Zellen

Im Gegensatz zu den regulatorischen T-Zellen wurden in dieser Arbeit signifikante Veränderungen in den CD4+ und den CD4- T-Zellpopulationen im Vergleich zu Gesunden zu allen drei Zeitpunkten beobachtet: Es konnten wesentlich weniger CD4+ und stattdessen mehr CD8+ T-Zellen detektiert werden. Diese Beobachtung könnte, neben den genannten möglichen Einflussfaktoren, auf die Karzinomerkrankung selbst zurückzuführen sein. Wie bereits mehrfach beschrieben, lässt sich sowohl in *in vitro*-Bedingungen als auch *in vivo* bei Mäusen eine Expansion CD8+ T-Zellen nach Injektion von Tumorgewebe nachweisen (Kilinc M.O. 2009). Diese Ergebnisse sprechen dafür, dass neoplastische Zellen als fremd erkannt werden und eine immunologische Antwort induzieren. In den Ergebnissen dieser Arbeit zeigte sich, dass Patientinnen, die eine CA125-spezifischen T-Zellresponse nach Applikation von Abagovomab entwickelt haben, bereits vor der Immunisierung signifikante Unterschiede in den ratios CD8+/CD4+ und CD8+/Treg zugunsten CD8+ T-Zellen aufweisen. Daraus könnte man schlussfolgern, dass insbesondere diejenigen Patientinnen von einer Vakzine mit Abagovomab profitieren und eine CA125-spezifische T-Zellantwort entwickeln, die bereits prä-immun deutlich mehr CD8+ T-Zellen präsentieren und deren T-Zell-Quotient zugunsten der CD8+ T-Zellen liegt. Umgekehrt lässt sich in den Ergebnissen dieser Arbeit keine direkte Korrelation zwischen Treg-Frequenzen und einer CA125-spezifischen Response nachweisen. Diese Beobachtung

spricht für die Annahme, dass weniger die Treg-Frequenzen alleine, sondern vielmehr die Balance zwischen Teffs / Tregs für die Entwickelung einer immunologischen Antwort auf ein Antigen relevant zu sein scheint.
Zu einem ähnlichen Ergebnis kam auch die Arbeitsgruppe von E. Sato 2005. Diese konnte anhand von 117 Proben von Patientinnen mit epithelialem Ovarialkarzinom zeigen, dass eine hohe CD8+/Treg-ratio und intraepitheliale, tumorinfiltrierenden CD8+ T-Zellen mit einer längeren Überlebensdauer und somit einer besseren Prognose korrelieren. In Bezug auf diese Arbeit und die weitere klinische Entwicklung wäre es interessant zu überprüfen, ob Patientinnen, die bereits vor der Immunisierung mit Abagovomab eine hohe CD8+/Treg-ratio aufweisen, tatsächlich im Hinblick auf die klinisch relevanten Endpunkte, wie progressionsfreies Intervall und Überlebensdauer, von einer Vakzinierung mit dem Antikörper profitieren. Hierzu müssten die Daten jedoch anhand eines größeren Kollektivs überprüft werden. Die Vergleichsgruppe müsste in diesem Fall natürlich ebenfalls einen hohen CD8+/Treg- Quotienten aufweisen, jedoch keine Antikörpervakzine erhalten haben, um die gewünschte Effektivität nachweisen zu können.

Weiterhin konnte von Nishikawa 2006 gezeigt werden, dass sich so genannte *high* und *low avidity* Effektorzellen im Blut von Karzinompatienten nachweisen lassen. Als *high avidity* T-Zellen wurden diejenigen bezeichnet, die nur eine geringe Konzentration eines Antigens benötigen, um ihre volle immunologische Reaktion gegen dieses Antigen und die entsprechenden präsentierenden Zellen (z.B. APCs) zu entfalten. *Low avidity* T-Zellen hingegen benötigen eine höhere Anzahl dieser MHC-Antigen-Komplexe und sind somit schwieriger zu stimulieren.
Folglich wäre es denkbar, dass nicht nur die Gesamtfrequenz der Effektorzellen ausschlaggebend für die Entwickelung einer T-Zellantwort ist, sondern diese wiederum vielmehr differenziert in *low* und *high avidity* Subsets betrachtet werden sollten. Die Existenz dieser beiden Effektorzellsubtypen bietet einen möglichen Erklärungsansatz, warum bei manchen Patientinnen bereits vor einer Therapie mit Abagovomab eine T-Zellantwort auf CA125 nachweisbar war: Es könnte sich um hierbei *high avidity* Teffs handeln, die trotz einer geringen Immunogenität des neoplastischen Gewebes stimuliert werden

konnten. Da durch die Therapie mit dem anti-Idiotyp Abagovomab die Steigerung, bzw. Neuinduktion einer Response möglich war, wäre es folglich denkbar, dass unter dessen Einfluss l*ow avidity* Teffs stimuliert und rekrutiert werden konnten.

In einer aktuellen Arbeit von 2009 postulierte die Arbeitsgruppe um Darras-Jéze an einem Mausmodell, dass es im Rahmen der Tumorregression, bzw. des Progresses weniger um die Gesamtanzahl oder den Quotienten der Tregs und Teffs geht, sondern vielmehr um ihren *memory status.* Demnach ginge es im Hinblick auf die Effektivität der tumorgerichteten Immunantwort um die relative Geschwindigkeit, in der sich eine Immunantwort durch CD44*high memory* Teffs innerhalb der ersten Tage entwickelt. Parallel sollen jedoch auch CD44*high memory* Tregs generiert werden. Entscheidend für den Progress oder Regress einer Tumorerkrankung sei, welche dieser beiden Populationen innerhalb dieser kritischen Zeit überwiegt. Und um einen Bezug zu vorausgegangenen Arbeiten schließen zu können, wäre es möglich, dass es sich bei diesen sensitiven und schnell reagierenden Effektor-T-Zellen um die als *high avidity* postulierten T-Zellen von Nishikawa handelt. So spricht vieles dafür, dass die frühe Generierung hochspezifischer T-Zellsubsets im Rahmen der Onkogenese von entscheidender Bedeutung für die Entwicklung und Aufrechterhaltung einer tumorspezifischen Immunantwort ist.

Ein direkter Vergleich sowie Rückschlüsse zur vorliegenden Arbeit lassen sich jedoch nicht ziehen, da in diesem Rahmen mit T-Zell-Proben aus peripherem Blut gearbeitet wurde. Hingegen imitierten die Untersuchungen von Darras-Jéze die zellulären Verhältnisse einer tumornahen Lokalisation. Weiterhin wurden im Rahmen der Fragestellung die einzelnen T-Zellpopulationen nicht weiter differenziert, wie über das z.B. genannte CD44.

In einem Gesamtsystem mit den regulatorischen T-Zellen betrachtet, stellt sich dann auch die Frage, welche Auswirkungen die *nat.* und die *aquired* Tregs auf die *high* und *low avidity* Teffs haben und ob es gegebenenfalls Präferenzen und Unterschiede bezüglich der Suppression gibt.

IV. 2.2. Der Block des CTLA-4- Rezeptors

IV. 2.2.1. CTLA-4 und Tregs

Der konstitutive Nachweis des CTLA-4 in regulatorischen T-Zellen führte schon früh zu der Annahme, dass es eine zentrale Rolle in der Zellkontakt-abhängigen Suppression einer T-Zellantwort spielt (Chambers, 2001). Der Einsatz eines CTLA-4-gerichteten Antikörpers konnte bereits bei verschiedenen Tumorentitäten im Rahmen klinischer Studien einen Benefit im Hinblick auf Tumorregress und Überlebenszeit zeigen (Ribas 2007; Yang 2007; Hodi 2003). In einer aktuellen Arbeit konnten Zhou und Mitarbeiter anhand von TRAMP-Mäusen aufweisen, dass eine Immuntherapie mit einem anti-CTLA-4-Antikörper sogar die Treg/Teff-ratio zugunsten der Teffs verändern kann. Die Arbeitsgruppe konnte zeigen, dass ein Progress des induzieren Prostatakarzinoms gestoppt und eine Regression der Metastasen hierdurch erreicht werden konnte (Zhou 2009).
Weiterhin gibt es auch mittlerweile Untersuchungen zu Kombinationstherapien zwischen einem CTLA-4-Antikörper und einem weiteren Immunmodulator. Quezada beschrieb 2006 einen veränderte intratumorale Teff/Treg-ratio in Mäusen mit Ovarialkarzinomzellen bzw. Melanomzellen nach Immunisierung mit zunächst GM-CSF und anschließend einem anti-CTLA-4-Antikörper. Die Arbeitsgruppe konnte eine deutliche Zunahme der ratio zugunsten der Teffs nach der Immunisierung nachweisen. Weiterhin konnten Ribas et al 2009 in einer Phase I-Studie an einem kleinen Patientenkollektiv zeigen, dass Patienten mit metastasiertem Melanom von einer Kombinationstherapie von CTLA-4-Antikörper und spezifisch beladenen DCs profitieren könnten.

Über die genauen Mechanismen der Treg-vermittelten Suppression gibt es bis heute kontroverse Meinungen. Die Einteilung erfolgt in Zellkontakt-abhängige und Zellkontakt-unabhängige Interaktionen. Die Letztere erfolgt über Zytokine wie das Interleukin 10 und TGFß. Laut Literatur sind es vor allem *aquired* Tregs, die über liquide Faktoren inhibitorisch wirken. *Natural* Tregs wird hingegen der Zellkontakt-abhängige Weg zugeschrieben. In diesem

Zusammenhang wird die Interaktion zwischen dem CTLA-4-Rezeptor und seinem Liganden B7 zur Initialisierung einer zellsuppressiven Kaskade beschrieben und als mögliche Ursache der Treg-vermittelten Suppression diskutiert. Wing nannte demgemäß zwei Optionen bezüglich der Lokalisation des CTLA-4-Rezeptors (Wing, 2003):

1. CTLA-4 wird direkt auf den Tregs exprimiert. Über Bindung an den Zielzellen über seinen Liganden B7, welches sowohl Teffs als auch DCs präsentieren, wird über intrazelluläre Kaskaden die Aktivierung der jeweiligen Zelle gestoppt.

2. CTLA-4 wird transient aktivierten Effektor-Zellen exprimiert. Über Bindung an Tregs, die das B-7 präsentieren, wird die weitere Aktivierung der Teffs und Entwicklung einer Response gehemmt.

Bei beiden Ansätzen ist hier die Anwesenheit von Tregs für die Inhibition einer Immunantwort essenziell. Dabei scheint es nebensächlich zu sein, ob der Rezeptor an den regulatorischen oder an den Effektorzellen exprimiert wird. Wichtig ist die alleinige Interaktion mit seinem Liganden.

In dieser Arbeit sollte nun eruiert werden, welche Rolle die Zellkontakt-abhängige Suppression über den CTLA-4-Rezeptor bei Patientinnen der AGO-Studie gespielt hat. Es wurde untersucht, ob sich eine bereits existierende Immunantwort verstärken bzw. neu induzieren lässt, wenn man den negativen Aktivierungsmodulator mit einem entsprechenden Antikörper blockiert.
Insgesamt wurde bei sechs von zwölf Patientinnen im Verlauf mindestens ein Mal ein Anstieg des IFNγ nach einem Block des CTLA-4-Rezeptors beobachtet. Zwei davon gehörten zu der Gruppe der Responder. Obwohl sich sicherlich keine statistisch relevanten Aussagen aufgrund der geringen Fallzahl machen lassen, scheint es anhand der vorliegenden Daten doch eher so zu sein, dass der applizierte CTLA-4-Antikörper eine Immunantwort neu induziert, als dass er eine bereits vorhandene verstärkt. Zudem konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass sich sowohl eine CD4+ als auch eine CD8+ T-Zellantwort nach Blockade des CTLA-4 induzieren lässt. Das zeigt, dass sich die Wirkung,

bzw. die resultierenden Effekte einer CTLA-4-Blockade nicht nur auf eine T-Zell-Population beschränken, sondern auf mehreren Zellebenen wirksam sind.

In der vorliegenden Arbeit konnte jedoch im Gegensatz zu der Annahme, die Treg-vermittelte, Zellkontakt-abhängige Suppression sei CTLA-4-induziert, keine signifikante Assoziation zwischen der Effizienz eines CTLA-4-Blocks und den gemessenen Treg-Frequenzen beobachtet werden. Es scheint also ein Treg-unabhängiger Mechanismus der CTLA-4-Blockade wahrscheinlicher zu sein und bestätigt die Annahme, dass eine Blockade des CTLA-4-Rezeptors über eine verstärkte Aktivierung der Teffs wirkt, als durch Treg-Suppression.

IV.2.2.2. CTLA-4 und Effektor-T-Zellen

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass CTLA-4 auch auf T-Zellen nachweisbar ist, die nicht FoxP3 exprimieren und somit nicht primär zu der Gruppe der untersuchten Tregs zählten. Da weiterhin keine Korrelation zwischen einem positiven Blockeffekt und den gemessenen Treg-Frequenzen bestand, sprechen diese Ergebnisse für die Annahme, dass die Suppression über CTLA-4 nicht von regulatorischen T-Zellen abhängig oder für diese spezifisch ist (Maker A. V. 2005).

In einer früh-klinischen Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Applikation eines CTLA-4-Antikörpers nicht nur zu einer Aktivitätssteigerung der Effektor-T-Zellen führt. Es kam hierunter auch zu einer Zunahme der Treg-Frequenzen. Differenziert betrachtet konnte festgestellt werden, dass der aktivitätssteigernde Effekt auf Teffs erst bei höheren Antikörperdosierungen auftrat, während es unter niedriger Dosis primär zu einer Frequenzsteigerung der FoxP3+ regulatorischen T-Zellen kam. Trotz des applizierten CTLA-4-Antikörpers, waren es voll funktionsfähige suppressive Tregs (Kavanagh B. 2008).
Im Rahmen der Protokolletablierung wurden Titrationsversuche mit dem verwendeten Antikörper durchgeführt. Hier ließen sich keinerlei Unterschiede in der resultierenden Immunantwort mittels FACS-Analyse feststellen. Ein Vergleich dieser Beobachtung mit den Ergebnissen aus der Arbeit von

Kavanagh sollte jedoch nur kritisch erfolgen, da in der vorliegenden Arbeit nicht die T-Zell-Frequenzen unter den verschiedenen Antikörperkonzentrationen gemessen wurden, sonder das IFNγ als Indikator einer T-Zellantwort. Weiterhin erfolgte hier die Stimulation der Zellkulturen mit dem spezifischen CA125, welches in der genannten Literatur nicht zur Anwendung kam.

Weiterhin wurde der Effekt eines CTLA-4-Blocks in den einzelnen T-Zell-Kompartimenten durch Peggs und seine Mitarbeiter untersucht. Die Gruppe zeigte eine deutliche tumorgerichtete Aktivität im Kompartiment der Effektor-T-Zellen nach einer Immunisierung mit einem anti-CTLA-4-Antikörper. Nach identischer Antikörperapplikation im Kompartiment der Tregs konnte jedoch keine signifikante Steigerung beobachtet werden (Peggs 2009).

Im Hinblick auf den Funktionsmechanismus des aktivitätssteigernden Effekts eines anti-CTLA-4-Antikörpers ist es denkbar, dass die Blockade zu einer verstärkten Wirkung des konkurrierenden Costimulators CD28 am gleichen Liganden (B7) führt. Durch dessen zellaktivierenden Charakter wäre somit in Kombination mit einem stimulierenden Antigen-Komplex die Induktion eine Effektor-T-Zellantwort möglich. Dieser Mechanismus beschreibt einen möglichen Treg-unabhängigen Effekt des CTLA-4-Blocks und könnte erklären, warum keine Korrelation zwischen den gemessenen Treg-Frequenzen und einem Blockeffekt in der vorliegenden Arbeit bestand.

Darüber hinaus konnte in der genannten Arbeit von Peggs und Mitarbeitern in einer weiteren Untersuchungen beobachtet werden, dass der anti-tumorale Effekt am ausgeprägtesten war, wenn beiden T-Zell-Populationen simultan ein anti-CTLA-4-Antikörper appliziert wurde. Die Arbeitsgruppe folgerte hieraus, dass sich der Effekt unter diesen Bedingungen potenzieren und ein maximales therapeutisches Ergebnis erreichen lässt. Durch bereits vorausgegangene Arbeiten konnte dieser Effekt bestätigt werden. Hier zeigte sich, dass sich die Depletion regulatorischer T-Zellen und ein zusätzlicher Block des CTLA-4 in ihrer Wirkung potenzieren (Sutmuller 2001). Es lässt sich also vermuten, dass es sich um zwei synergistisch wirkende Mechanismen der Immuninhibition handelt, die nicht direkt voneinander abhängen.

IV.3. Kritik der Methode

In dieser Arbeit wurde mit T-Zellen *ex vivo* gearbeitet, die den gesamten Prozess von der ersten Blutentnahme, über Separation, Einfrieren, Lagerung sowie Auftauen durchmachen mussten, bevor sie überhaupt mithilfe der Fluoreszenzantikörper markiert, identifiziert und in Kurzzeitkulturen stimuliert werden konnten. Es ist davon auszugehen, dass die Vitalität und Funktionalität der Zellen im Vergleich zu *in vivo* Bedingungen reduziert war.
Inwiefern dieser ganze Prozess auch die Oberflächenstruktur verändert, lässt sich hier zwar nicht nachweisen, ist jedoch im Hinblick auf die Instabilität mancher Proteine zu vermuten. Vor diesem Hintergrund ist im Vergleich mit den Ergebnissen der AGO-Studie sicherlich die Varianz der Werte höher. Insbesondere die Einstufung der Response ist hierbei kritisch zu betrachten und muss insgesamt als schwach eingestuft werden, da die meisten hier gemessenen Werte unter 0,5% lagen.

Weiterhin ist auch die Charakterisierung von Zellen über Antikörper mit einer gewissen Vorsicht zu betrachten, da die Messmethode über Zählung im FACS nur eine quantitative Aussage gibt, jedoch nichts über die funktionalen Eigenschaften der charakterisierten Zellen aussagt. Entsprechende T-Zell-Suppressorassays konnten aufgrund der limitierten Verfügbarkeit von Patientenproben im Rahmen dieser Arbeit nicht durchgeführt werden.

An der Auswertung der Daten am FACS ist sicherlich die Subjektivität beim Setzen der Gates zu erwähnen. Um hier entsprechende Unterschiede in der Auswertung zu vermeiden, wurde die Geräteeinstellung anhand entsprechender Kontrollen vorgenommen und die Analysen durchgehend nur von einer Person vorgenommen.

Kritisch zu hinterfragen ist an dieser Stelle auch die Auswahl der Treg-markierenden Antikörper und der Entscheidung, die Response anhand eines IFNγ Anstiegs zu quantifizieren. In der gesetzten Fragestellung sollten die *natural* Tregs betrachtet werden. In den Recherchen fand sich, dass es insbesondere FoxP3 sei, welches diese Population am spezifischsten

charakterisiert. Unter der Annahme, dass *nat* Tregs ihre Suppression Zellkontakt-abhängig über CTLA-4 ausüben und dieses in Kurzzeitkulturen blockiert werden sollte, wurde auch dieser Antikörper zur Markierung und Differenzierung hinzugezogen.
Aktuell gibt es Arbeiten, die FoxP3 in geringen Frequenzen auch auf anderen Populationen nachweisen konnten. Weiterhin sollen sowohl *adoptive* als auch *natural* Tregs dieses Antigen exprimieren. Trotzdem ist FoxP3 nach wie vor der Marker mit der höchsten Treg-Spezifität und mit dem sich diese heterogene Population noch am besten charakterisieren lässt.
CTLA-4 wird zwar konstitutiv auf Tregs exprimiert, gehört jedoch zum heutigen Zeitpunkt nicht mehr zu den präferierten Markerantigenen. Die Spezifität des CTLA-4 ist zu gering, da es ebenfalls in zum Teil hohen Frequenzen auf Teffs, DCs und in geringen Mengen sogar auf B-Zellen nachzuweisen ist. Weiterhin sprechen sowohl die Ergebnisse dieser Arbeit als auch die Recherchen der aktuellen Forschungsergebnisse für eine Treg-unabhängige CTLA-4-vermittelte Suppression.

Die Effektivität des CTLA-4-Komplexes, dem antikörperinduzierten Block und des CD 28 ist möglicherweise nicht nur von ihrer molekularen Struktur und der Gesamtkonzentration abhängig, sondern auch von ihrem Liganden B7, seinen Untereinheiten CD80 und CD86 und den weiteren intrazellulären Signalkaskaden, bis hin auf RNA-Ebene. Um gegebenenfalls Unterschiede, bzw. Gemeinsamkeiten von Patientinnen mit oder ohne einen Effekt der CTLA-4-Blocks herausarbeiten zu können, müsste dieser Funktionsweg vollständig bekannt sein, um die Proben darauf untersuchen und vergleichen zu können. Da die Forschung in diesem Bereich gerade mal am Anfang steht, bedarf es sicherlich noch weitere Zeit intensiver Arbeit.

Zu diskutieren sind hier sicherlich auch die Konzentrationen der einzelnen Antigene: sowohl des CA125, als auch des Costimulus CD28. Einige Autoren konnten in ihren Versuchen nachweisen, dass sich der inhibitorische Effekt der Tregs durch entsprechend hohe Konzentrationen des Antigens aufheben lässt. Es müsse also „nur“ eine adäquate „Menge“ des Antigens vorliegen, die dann zur Überwindung der Suppression und zur gewünschten Aktivierung führen soll

(George et al, Eur J Immunol, 2003).
In Vorversuchen dieser Arbeit (nicht aufgezeigt) im Rahmen der Protokolletablierung zur Zellstimulation ließ sich diese These durch Titration des CA125 und Costimulus CD28-MAK nicht bestätigen. Dabei wurden von den verwendeten Standardkonzentrationen 2500U CA125, bzw. 1µl CD28-MAK sowohl größere als auch geringere Mengen eingesetzt. Ein Effekt in der resultierenden Zytokinproduktion konnte allerdings in diesen Versuchen nicht nachgewiesen werden.

IV. 4. Ausblick

Der Stellenwert der Immuntherapie in der Onkologie ist unumstritten. Bei einigen Tumoren sind bereits standardisierte Therapieschemata vorhanden. Bei soliden Tumoren spielt sie insbesondere in der Adjuvanz eine wichtige Rolle, da hier das operative Eingreifen nach wie vor Mittel der Wahl in der Primärtherapie ist.
In den Recherchen nach Ansätzen der Immuntherapie lässt sich eine Vielzahl an Optionen finden.
Grob unterscheiden kann man hier ein konventionelles Konzept und neuere Ansätze.
Zu den konventionellen therapeutischen Strategien zählt die Vakzinierung mit Tumorpeptiden, dendritischen Zellen, T-Zell-Transfer, die Zytokin-basierte Therapie mit Interferonen sowie die Vakzinierung mit zielgerichteten Antikörpern. Zu den Letzteren zählen monoklonale Antikörper, wie zum Beispiel gegen CA125.
Die neueren Ansätze zielen weniger auf eine direkte Immuninduktion ab, sondern greifen auf Ebene der Tregs ein. Hier zielen die laufenden Arbeiten auf zwei Ebenen ab: Zum einen ist es möglich direkt regulatorische T-Zellen in ihrer Funktion zu hemmen, z.B. durch funktionelle Depletion. Zum anderen sind suppressive Signalkaskaden regulatorischer T-Zellen das Target der Immuntherapie, wie z.B. das CTLA- 4, VEGF und das IL-10.
Es scheint jedoch sicher zu sein, dass das Therapiekonzept der Zukunft sich

nicht auf eine einzige der vielen Optionen beschränken wird. Vielmehr wird die sinnvolle Kombination verschiedener Ansätze in der nächsten Zeit die Wahl sein. Studien zu Kombinationstherapiekonzepten sind bereits in zum Teil fortgeschrittenen Phasen. So werden Vakzinen mit monoklonalen Antikörpern mit einer Radiatio kombiniert und Interleukine mit Chemotherapeutika. Signifikante Erfolge sind jedoch hier noch nicht immer zu verzeichnen und weitergehende Arbeiten sind notwendig. Da die Kombination verschiedener Konzepte nicht immer zu einem signifikanten Vorteil führt, müssen zunächst aus dem entstandenen Angebot sowohl der konventionellen als auch der neueren Therapeutika die entsprechend sinnvollen Kombinationen erarbeitet werden, die tatsächlich ein Benefit bringen.

Die Vielfalt der entwickelten Ansätze der Immuntherapie macht es dann aber auch nicht unbedingt einfach, wenn es darum geht, das Optimum für den individuellen Patienten zu finden. Daher ist sicherlich weitere Forschung notwendig um diejenigen Gruppen zu identifizieren, die von der jeweiligen Therapie profitieren. Die Analysen der Subgruppen in den einzelnen Studien im Hinblick auf die Immunantwort sowie die gruppenspezifischen Eigenschaften und Unterschiede sind hierbei sicherlich hilfreich und zielführend.

Jedoch sollte auch kritisch mit der Anwendung von Immunmodulatoren umgegangen werden. So ist denkbar, dass die langfristige Suppression, bzw. Depletion regulatorischer T-Zellen im Verlauf zu autoimmunen Reaktionen mit gravierenden Folgen führt. Zwar sind nach Angaben der Literatur schwerwiegende Nebenwirkungen selten und die meisten Reaktionen seien allgemeiner Natur, wie z.B. gastrointestinale Beschwerden, Schlaflosigkeit und lokale Hautreaktionen, und klinisch nur transient. Ergebnisse zu den Langzeitfolgen liegen zum heutigen Zeitpunkt jedoch nicht vor und müssen noch erarbeitet werden.

Auf längere Sicht betrachtet wird es in Zukunft ein weitläufiges Angebot der multimodalen Tumortherapie geben. Diese wird nach Analyse der individuellen Voraussetzungen, die der / die Patient/ -in mitbringt, entsprechend individuell angepasst sein. Ziel sollte es sein, mit dem geringsten Nebenwirkungsprofil der eingesetzten Therapeutika und der bestmöglichen Lebensqualität, das Maximum an Heilungschancen und Lebensverlängerung bieten zu können.

Zusammenfassung

Aufgrund aktueller Publikationen wurde postuliert, dass das immunologische Ansprechen auf die Abagovomab-Therapie in Form einer CA125-spezifischen T-Zellresponse durch körpereigene immunsuppressive Mechanismen limitiert werden könnte.

Aus diesem Grund wurde zum einen die Frequenz immunsuppressiver Tregs im Verlauf der Therapie bestimmt, zum anderen das suppressive Potential von CTLA-4 anhand einer selektiven Blockade mit anti-CTLA-4 Antikörper in vitro untersucht. Ziel war es festzustellen, ob ein zusätzliches Management immunsuppressiver Mechanismen eine Steigerung des immunologischen Ansprechens bewirken könnte und somit eine mögliche Option für weiterführende Studien mit Abagovomab darstellen könnte.

Es konnte festgestellt werden, dass es keinen Unterschied der Treg-Frequenzen im Vergleich zu Normalpersonen gab. Im Verlauf der Vakzinierung konnte zwar bei 7 der 12 untersuchten Patientinnen eine Tendenz zu höheren Treg-Frequenzen nach 5/6 Immunisierungen gemessen werden, eine signifikante Korrelation zur Phase der Immunisierung oder einer CA125-spezifischen T-Zellresponse konnte jedoch im Gesamtkollektiv nicht festgestellt werden. Hier darf die Statistik aufgrund der kleinen Fallzahlen weder im positiven noch im negativen Sinne überbewertet werden. Es sollte vielmehr Anlass zu Studien mit einem größeren Kollektiv geben, um die vorliegenden Tendenzen überprüfen zu können.

Der Block des CTLA-4-Rezeptors führte zu einer Steigerung der CA125-spezifischen T-Zellresponse. Es fand sich jedoch kein Zusammenhang zu den gemessenen Treg-Frequenzen oder der CA125-spezifischen T-Zellresponse ohne einen CTLA-4-Rezeptor-Block.

Bei der Auswertung der Effektor-T-Zellen wurde gezeigt, dass Patientinnen, die schon vor der Vakzinierung eine hohe CD8+ Effektor T-Zellen / CD4+FoxP3+ Treg -ratio hatten, sich im weiteren Verlauf zu mindestens einem Zeitpunkt eine Response entwickelt hat.

Aus den vorliegenden Ergebnissen lässt sich folgern, dass die CTLA-4-

abhängige Suppression nicht Treg-abhängig zu sein scheint. Für die Entwicklung einer CA125-spezifischen T-Zellresponse scheint vielmehr das Verhältnis zwischen Effektor-T-Zellen und regulatorischer T-Zellen entscheidend zu sein und nicht die Frequenz der regulatorischen T-Zellen alleine.

Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass die immunologische Wirksamkeit von Abagovomab durch immunsuppressive Mechanismen bei einzelnen Patienten gehemmt werden könnte. Bei diesen wäre in Zukunft möglicherweise eine Kombinationstherapie zwischen einer Immunisierung einerseits und einer Blockade der immunsuppressiven Mechanismen anderseits, eine therapeutische Option zur Verbesserung des Outcomes.

Danksagung

Mein Dank geht an Prof. Dr. med. Wagner für die Ermöglichung dieser Arbeit und all dem, was ich im Verlauf meiner studienbegleitenden, praktischen Ausbildung bei ihm lernen durfte.

Mein größter Dank geht an meine Betreuerin Dr. rer. nat. Silke Reinartz für die herausragende Unterstützung, die anregenden Diskussionen und insbesondere die ansteckende Begeisterung für das naturwissenschaftliche Arbeiten und ihre Geduld in den vielen Momenten der kurzen Leitung. In gleichem Atemzug zu erwähnen sind an dieser Stelle die Mitarbeiter des zytologischen Labors der Klinik für Gynäkologie Traute und Achim, die mir stets zur Seite standen und mich praktisch in die „Geheimnisse“ der Laborarbeit eingeführt haben.

Mein Dank geht auch an die Patientinnen und freiwilligen Probanden ohne deren die praktische Durchführung dieser Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Selbstverständlich danke ich auch meiner Familie und meinen Freunden für ihren moralischen Beistand und ihr Verständnis. Ganz besonders danke ich hier meinem Vater für die nahezu heldenhaften Rettungen der elektronischen Medien und Daten.

Erklärung

Ich erkläre, dass ich die dem Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg zur Promotion eingereichten Arbeit mit dem Titel „Untersuchungen zur physiologischen Rolle regulatorischer T-Zellen in Patientinnen mit fortgeschrittenem Ovarialkarzinom nach Immuntherapie mit Anti-Idiotyp Abagavomab“ an der Klinik für Gynäkologie, Gynäkologische Endokrinologie und Onkologie ohne sonstige Hilfe durchgeführt und bei der Abfassung der Dissertation keine anderen als die dort angeführten Hilfsmittel benutzt habe. Bei der Abfassung der Dissertation sind Rechte Dritter nicht verletzt worden.

Ich habe bisher an keinem in- oder ausländischen Medizinischen Fachbereich ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht, noch die vorliegende oder eine andere Arbeit als Dissertation vorgelegt.

Ich übertrage der medizinischen Fakultät das Recht, weitere Kopien meiner Dissertation herzustellen und zu vertreiben.

Ergebnisse aus dieser Arbeit wurden im folgenden Publikationsorgan veröffentlicht: *Human Immunology,* Vol. 71, Issue 1, Januar 2010

Bielefeld, den 22.12.2010 (Daria Wirch)

Akademischen Lehrer

Meine akademischen Lehrer waren

Dr. J. Adamkiewicz, Prof. Dr. phil. Dr. med. habil. H.-D. Basler, Prof. Dr. med. E. Baum, Dr. med. K. Baumann, Dr. med. Boudriot, Prof. Dr. Y. Cetin, Prof. Dr. F. Czubayko, Dr. med. Dietz, Prof. Dr. M Eilers, Dr. med. H. Franz, Prof. Dr. phys. Fuchs, Dr. med. v. Garrel, Prof. Dr. med. B.Gerdes, Dr. Grundmann, Prof. Dr. K.-H. Grzeschik, PD Dr. med. R. Gust, Prof. Dr. med. C. Herrmann-Lingen, Dr. med. S. Jakowski-Dohrmann, Dr. med. Kanngiesser, Dr. med. C. Kill, Prof. Dr. med. W. Krause, Prof. Dr. med. J.-C. Krieg, Prof. Dr. Koolman, Dr. U. Kutschenreuter, Prof. Dr. med. H. Jungclas, Prof. Dr. R.E. Lang, PD Dr. med. R. Lenz, Prof. Dr. R. Lill, Prof. Dr. med. M. Lohoff, Dr. Dr. R. Mandrek, Prof. Dr. med. Maier, Prof. Dr. med. R. Moll, Prof. Dr. Dr. U. O. Müller, Dr. med. M.Peters, Dr. rer. nat. S. Reinartz, Prof. Dr. med. H. Remschidt, Prof. Dr. med. H. Renz, Prof. Dr. med. G. Richter, Prof. Dr. med. G. Rümenapf, Prof. Dr. med. H. Schäfer, Prof. Dr. med. S. Schmidt, Prof. Dr. Schrader, Prof. Dr. med. P. Schuster, Dr. med. Schwerk, Prof. Dr. J. Seitz, Prof. Dr. med. C. Vogelmeier, Prof. Dr. med. U. Wagner, Prof. Dr. med. Weiler, Prof. Dr. med. F. Willeke, PD. Dr. R. Westermann, Dr. med. E. Wollmer, Prof. Dr. med. H. Wulf

Literaturverzeichnis

Adrianifahanana M., Moniaux N., Batra S.K., et al.: “Regulation of mucin expression: mechanistic aspects and implications for cancer and inflammatory diseases” Biochim Biophys Acta 2006; 1765(2): 189-222

Alberts DS, Marth C, Alvarez RD, et al.: “Randomized phase 3 trial of interferon gamma-1b plus standard carboplatin/paclitaxel versus carboplatin/paclitaxel alone for first-line treatment of advanced ovarian and primary peritoneal carcinomas: results from a prospectively designed analysis of progression-free survival”; Gynecol Oncol, 2008 May;109(2):174-81

Anderson P. O., Sundstedt A. et all: “IL-2 overcomes the unresponsiveness but fails to reverse the regulatory function of antigen-induced T regulatory cells”; The Journal of Immunology, 2005, 174: 310-319

Asano M., Toda M., Sakagushi N., Sakagushi S.: “Autoimmune diseases as a consequence of delevelopmental abnormality of a t cell subpopulation” J Exp Med 1996; 184(2): 387-396

Barnett B., Kryczek I.: „ Regulatory T cells in ovarian cancer: Biology and therapeutic potential“ ; American Journal of Reproductive Immunology, 54, 2005, 396-377

Beatty J.D. et al.: “Immunotheapy of colorectal cancer” Cancer 1992; 70(5): 1425-1433

Beissert S., Schwarz A., Schwarz T.: “Regulatory t cells” J Invest Dermatol 2006; 126(1): 15-24

Berrino F., Sant M., Verdecchia A., et al.: “World Health Organiation, International Agency for Research on Cancer European Commission. Survival of cancer patients in Europe, the EUROCARE study” IARC Publication, No 132, Lyon 1995

Bettelli E., Dastrange M., Oukka M.: “FoxP3 interacts with nuclear factor of activated T Cells and NF-kB to repress cytokine gene expression and effector functions of T helper cells”; PNAS, 205, 102(14): 5138-5143

Beyer M., Schultze J. L. 2006: „Regulatory T cells in cancer“ ; Blood 2006, Vol. 108, No3, 804-811

Bisikirska B, Colgan J., Luban J., Bluestone J. A., Herold K. C.: “TCR stimulation with modified anti-CD3 mAb expands CD8+ T Cell population and induces CD8+CD25+ Tregs”; The Journal of Clinical Invistigation, 2005, 225(10): 2904-2913

Bonertz A., Weitz J., Pietsch D.K., et al.: “Antigen-specific Tregs control T cell responses against a limited repertoire of tumor antigens in patients with colorectal carcinoma” J Clin Invest, 2009; 119(11): 3311-3321

Braly P, Nicodemus CF, Chu C, et al.: “The Immune adjuvant properties of front-line carboplatin-paclitaxel: a randomized phase 2 study of alternative schedules of intravenous oregovomab chemoimmunotherapy in advanced ovarian cancer”; J Immunother, 2009 Jan;32(1):54-65.

Brossart P., Wirths S., Stuhler G., et al.: “Induction of cytotoxic T-lymphocyte responses in vivo after vaccination with peptide-pulsed dendritic cells”; Blood, 2000, 96: 3102-3108

Burchill M.A., Yang J., Vang K.B., Farrar M.A.: “Interleukin-2 receptor signaling in regulatory t cell development and homeostasis” Immunol Lett 2007; 114(1): 1-8

Burger R.A.: “Experience with bevacizumab in the management of epithelial ovarian cancer” J Clin Oncol, 2007, 25: 2902-2908

Cannon M. J., Santin A. D., O I Brian T. J.; “Immunological treatment of ovarian cancer”; Current Opinion in Obstetrics and Gynecology, 2004, 16: 87-92

Carreno B.M., Bennett F. et. al: „CTLA-4 (CD154) can inhibit T cell activation by two different mechanisms depending on its level of cell surface expression“; The Journal of Immunology, 2000, 165: 1352-1356

Casares N., Arribillaga L. et al: “ CD4+/CD25+ regulatory T Cells inhibit activation of tumor-primed CD4+ T Cells with IFN-y-dependent antiangiogenetic activity, as well as long-lasting tumor immunity elicited by peptide vaccination”; The Journal of Immunology, 2003, 171: 5931- 5939

Chambers C. A., Kuhns M. S., Egen J. G., Allison J. P.: „CTLA-4-mediated inhibition in regulation of T cell responses: Mechanisms and manipulation in tumor immunotherapy“; Annu. Rev. Immunol., 2001, 19: 565-594

Chang C.C., Ciubotariu R., Manavalan J.S., et al.: “Tolerization of dendritic cells by T(S) cells: the crucial role of inhibitory receptors IL T3 and IL T4” Nat Immunol 2002; 3(3): 237-243

Chen M-L., Pittet M. J., Gorelik L. et al: „Regulatory T cells suppress tumor-spezific CD8 T cell cytotoxity through TGF- signals in vivo“; PNAS, 2005, 102(2): 419-424

Chikuma S., Abbas A. K., Bluestone J. A.: „B7-independent inhibition of T cells by CTLA-4“; The Journal of Immunology, 2005, 175: 177-181

Coenen J. J. A., Koenen H. J. P. M., van Rijssen E.,Boon L., Joosten I., Hilbrands L. B.: „CTLA-4 engagement and regulatory CD4+ CD25+ T cells

independently control CD8+ mediated responses under costimulation blockade“; The Journal of Immunology, 2006, 176: 5240-5246

Cortesini R., LeMaoult J., Ciubotariu R., Cortesini N.S.: “CD8+CD28- regulatory t suppressor cells and the induction of antigen-specific, antigen-presenting, cell-mediated suppression of Th reactivity” Immunol Rev 2001; 182: 201-206

Curiel T. J., Coukos G., Zou L. et al: “Specific recruitment of regulatory T Cells in ovarian cacinoma fosters immune privilege and predicts reduced survival”; Nature medicine, 2004, 10(9): 942-949

Dang Y., Knutson K.L., Goodell V., et al.: “Tumor antigene-specific T-cell expansion is greatly facilitated by in vivo priming” Clin Cancer Res 2007; 13: 1883-1891

Darra-JézeG., Bergot A.S., Durgeau A., et al.: “Tumor emergence is sensed by self-specific CD44hi memory Tregs that create a dominant tolerogenic environment for tumors in mice” J Clin Invest 2009; 119(9): 2648-2662

Disis M.L., Berhard H., Jaffee E.M.: “Use of tumor responsive T cells as cancer treatment” Lancet 2009; 373: 673-683

Disis M.L., Goodell V.,Schiffman K., Knutson K.L.: “Humoral epitope-spreading following immunization with a her2/neu peptide based vaccine in cancer patients” J Clin Immunol 2004; 24: 571-578

du Bois A., Pfisterer J., Kellermann L.: “Die Therapie des fortgeschrittenen Ovarialkarzinoms in Deutschland” Gynäkologe, 2001; 34: 1029-1040

Duvic M., Talpur R. “Optimizing denileukin diftitox (Ontak) therapy” Future Oncol. 2008, 4(4): 257-469

Ehlen T.G., Hoskins P.J., Miller D., et al.: “A pilot phase 2 study of oregovamab monoclonal antibody to CA125 as an immunotherapeutic agent for recurrent ovarian cancer” Int J Gynecol Cancer, 2005, 15: 1023-1034

Faria A.M.C., Weiner H.L.: “Oral tolerance: Therapeutic implications for autoimmune disease” Clin Dev Immunol 2006; 13(2-4): 143-157

Fattorossi A., Battaglia A.: „Neoadjuvant therapy changes the lymphocyte composition of tumor-draining lymph nodes in cervical carcinoma“; Cancer,2004, Vol. 100 Nr 7, 1418-1428

Fehervari Z., Sakaguchi S.: “ Control of FoxP3+CD25+CD4+ regulatory cell activation and function by dendritic cells”; International Immunology, 2004, 16(12): 1769-1780

Fehr T., Takeuchi Y., Kurtz J., Wekerle T., Sykes M.: “Early regulation of CD8 t cell alloreactivity by CD4+CD25- T Cells in recipients of anti-CD154 antibody and allogeneic BMT is followed by rapid peripheral deletion of donor-reactive

CD8+ T Cells. Precluding a role for sustained regulation"; Eur. J. Immunol., 2005, 35: 2679-2690

Feng Y, Xiao X, Zhu Z, Streaker E, Ho M, Pastan I, Dimitrov DS.: "A novel human monoclonal antibody that binds with high affinity to mesothelin-expressing cells and kills them by antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity"; Mol Cancer Ther 2009;8(5):1113-1118

Frauwirth K. A., Thompson C. B.: „Activation and inhibition of lymphocytes by costimulation"; J. Clin. Invest., 2002, 1009(3): 295-299

Foon K.A., Testa J.R., Handel L.M., et al.: "Are solid tumor anti-idiotype vaccines ready for prime time?" Commentary re: U. Wagner et al: Immunological consolidation of ovarian carcinoma recurrences with monoclonal anti-idiotype antibody ACA 125: immune responses and survival in palliative treatment. Clin Cancer Res 2001; 7 : 1154 -1162" Clin Cancer Res 2001; 7(5): 1112 -1115

Gao J-Q., Okada N., Mayumi T., Nakagawa S.: "Immune cell recruitment and cell-based system for cancer therapy" Pharmaceutical Research 2008; 25: 752-768

George T.C., Bilsborough J., Veney J., Norment A. M.: "High antigen dose and activated dendtritic cells enable Th cells to escape regulatory T Cell-mediated suppression in vitro"; Eur. J. Immunol.,2003, 33: 502-511

Gilboa E.: "DC-based cancer vaccines" J Clin Invest, 2007, 117: 1195-1203

Godfrey W. R., Spoden D. J., Ge Y. G., et al: "Cord blood CD4+CD25+ -derived T regulatory cell lines express FoxP3 protein and manifest potent suppresser function"; Blood, 2005, 105(2)750-758

Gordon M.S., Matei D., Aghajanian C., et al.: "Clinical activity of Pertuzumab (rhu MAB2C4), a HER dimerization inhibitor, in advanced ovarian cancer: potential predictive relationship with tumor HER2 activation status"; J Clin Oncol, 2006, 24: 4324-4332

Gross D.-A., Graff-Dubois S., Opolon P.: „High vaccination efficiency of low-affinity epitopes in antitumor immunotherapy"; J. Clin. Invest. 113: 425-433

Hiura T., Kagamu H et al: "Both regulatory T Cells and antitumor effector T Cells are primed in the same draining lymph nodes during tumor progression"; The Journal of Immunology, 2005, 175: 5058-5066

Hodi F. S., Mihm M. C., Soiffer R. J.: „ Biologic activity of cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 antibody blockade in previosly vaccinated metastatic melanoma and ovarian carcinoma patients"; PNAS, 2003, 100(8): 4712-4717

Hodi F.S., Butler M., Oble D.A., et al.: "Immunologic and clinical effectsof

antibody blockade of cytotoxic T-lymphocyte associated antigen-4 in previously vaccinated cancer patients" PNAS, 2008, 105(8): 3005-3010

Hori S.,Nomura T., Sakaguchi S.: „Control of regulatory T cell development by the transcription factor FoxP3"; Science 2003 Vol. 299
Hybridoma. 1999 Feb;18(1):41-5.Journal of Immunology, 174: 4803-4811

Hung C.F., Wu T.C., Monie A., Roden R.: "Antigen-spezific immunotherapy of cervical and ovarian cancer" Immunol Rev, 2008; 222(4): 43-69

Janson P.C., Winderal M.E., Marits P., et al.: "FoxP3 promoter demethylation reveals the committed treg population in humans" PloS One 2008; 3(2): e 1612

Kataoka H., Takahashi S., Takase K. et. al: „CD25+ CD4+ regulatory T cells exert in vitro suppressive activity independent of CTLA-4"; International Immunology, 2005, 17(4): 421-427

Kaufman H.L., Lenz H-J., Marshal J., et al.: "Combination chemotherapy and ALVAC-CEA/B7.1 vaccine in patients with metastatic colorectal cancer" clin Cancer Res, 2008, 14(15): 4843-4849

Kavanagh B., O´Brien S., Lee D., et al.: " CTLA4 blockade expands FoxP3 regulatory T cells and activated effector CD4+ T cells in a dose dependent fashion" Blood, 2008; 112(4): 1175-1183

Keler T., Halk E., Vitale L. et al: "Activity and safety of CTLA-4 blockade combined with vaccines in cynomolgus macaques"; The Journal of Immunlogoy, 2003, 171: 6251-6259

Kemper C., Chan A.C., Green J.M.: "Activation of human CD4+ cells with CD3 and CD46 induces a T-regulatory cell type 1" Nature 2003; 421(6921): 388-392

Khazaie K., von Boehmer H.: „The impact of CD4+ CD25+ Treg on tumor specific CD8+ cytotoxicity and cancer"; Seminars in Cancer Biology, 16:124-136

Kiechle M.: "Das hereditäre Ovarialkarzinom" Heidelberg, Springer Verlag, 2001

Kilinc M.O., Gu T., Harden J.L.,Virtuoso L.P., Egilmez N.K.: "Central role of tumor-associated CD8+ effector / memory cells in restoring systemic antitumor immunity"; J. Immunol., 2009; 182: 4217-4225

Kishimoto K., Dong V. M., Issazadeh S.: „The role of CD154-CD40 versus CD28B7 costimulatory pathways in regulating allogeneic Th1 and Th2 responses in vivo"; J. Clin. Invest., 2000, 106: 63-72

Ko K., Yamazaki S. et al: " Treatment of advanced tumors with agonistic anti-

GITR mAb and its effects on tumor-infiltrating FoxP3+CD25+CD4+ regulatory T Cells"; JEM, 2005, 202(7): 885-891

Kondélková K., Vokurková D., Krejsek J., et al.: "Regulatory t cells (TREG) and their roles in immune system with respect to immunepathological disorders" Acta Medica, 2010; 53(2): 73-77

Lenschow D.J., Walunas T.L., Bluestone J.A.: „CD28/B7 system of t cell costimulation"; Annu. Rev. Imunnol. 14: 233-258

Leveque L, Deknuydt F, Bioley G, Old LJ, Matsuzaki J, Odunsi K, Ayyoub M, Valmori D: "Interleukin 2-mediated conversion of ovarian cancer-associated CD4+ regulatory T cells into proinflammatory interleukin 17-producing helper T cells"; J Immunother, 2009 Feb-Mar;32(2):101-8

Levings M.K., Roncarolo M.G.: "T-regulatory 1 cells: a novel subset of CD4 T cells with immunoregulatory properties" J Allergy Clin Immunol 2000; 106: 109-112

Li Y., Liu S. Margolin K., Hwu P.: "Summery of the primer on the tumor immunology and biological therapy of cancer" J Translational Med 2009; 7:11

Lindley S., Dayan C.M., Bishop A., et al.: "Defective suppressor function in CD4+CD25+ t-cells from patients with type I diabetes" Diabetes 2005; 54(1): 92-99

Liyanage U. K., Moore T. T. et al: "Prevalence of regulatory T Cells is increased in peripheral blood and tumor microenvironment of patients with pancreas or breast adenocarcinoma"; The Journal of Immunology, 2002, 169: 2756-2761

Madrenas J., Chau L. A., Teft W. A.: „ Conversion of CTLA-4 for inhibitor to activator of T cells with a bispecific tandem single-chain Fv ligand"; The Journal of Immunology, 2004, 172: 5948-5956

Mahnke K., Schönfeld K., Fondel S. et all: "Depletion of CD4+ CD25+ human regulatory T cells in vivo: Kinetics of Treg depletion and alteration in immune functions in vivo and in vitro"; Int. J. Cancer, 2007, 120: 2723-273

Maker A. V., Attia P., Rosenberg S. A.: " Analysis of the cellular mechanism of antitumor responses and autoimmunity in patients treated with CTLA-4 blockade"; J Immunol., 2005, 175: 7746-7754

Martin M., Schneider H., Azouz A., Rudd C. E.: „Cytotoxic T lymphozyte antigen 4 and CD28 modulate cell surface raft expression in their regulation of T cell function"; JEM, 2001, 194(11): 1675-1682

Mead K. I., Zheng Y. 2005: „Exocytosis of CTLA-4 is dependent on phospholipase D and ADP ribosylation factor-1and stimulated during activation of regulatory T cells";

Miotti S., Negri D.R.,Valota O., et al.:"Level of anti-mouse-antibody response induced by bispecific monoclonal antibody OC/TR in ovarian carcinoma patient is associated with longer survival"; Int J Cancer, 1999, 24: 62-68

Munn D. H., Mellor A. L. 2007: „Indoleamine 2,3-dioxygenase and tumor-induced tolerance"; J. Clin. Invest. 117: 1147-1154

Murakami M., Sakamoto A., Bender J., Kappler J., Marrack P: "CD25+CD4+ T Cells contribute to the control of memory CD8+ T Cells"; PNAS, 2002, 99(13): 8832-8837

Nagorsen D., Marincola F.M., Kaiser H.E."Bacteria-related spontaneous and therapeutic remission of human malignancies" In vivo,2002; 16: 551-556

Nair S., Boczkowski D., Fassnacht M., Pisetski D., Gilboa E.: "Vaccination against the Forkhaed family transcription factor FoxP3 enhances tumor immunity"; Cancer Research, 2007, 67(1): 371-380

Nakai N., Katoh N., Kitagawa T., et al.: "Immunoregulatory T cells in peripheral blood of melanoma patients treated with melanoma antigen-pulsed mature monocyte-derived dendritic cell vaccination" J Dermatol Sci., 2009; 54(1): 31-37

Nakamura T., Sonoda K.H., Faunce D.E., et al.: "CD4+NKT cells, but not conventional CD4+ t cells, are required to generate efferent CD8+ regulatory cells following antigen inoculation in an immune-privileged site" J Immunol 2003; 171: 1266-1271

Narod S.A., Risch H., Moslehi R., et al.: "Oral contraceptives and the risk of hereditary ovarian cancer" N Engl J Med 1998; 339: 424-428

Ng W.F., Duggan P.J., Ponchel F., et al.: "Human CD4(+)CD25(+) cells: a naturaly occuring population of regulatory t cells" Blood, 2001; 98(9): 2736-2744

Nicolson K.S., Wraith D.C.: "Natural and induced regulatory t cells: targets in immunotherapy of autoimmune disease and allergy" Inflamm Allergy Drug Targets 2006; 5(3): 141-148

Nishikawa H., Qian F., Tsuji T.: „Influence of CD4+ CD25+ regulatory T cells on low / high avidity CD4(+) t cells following peptide vaccnation" J Immunol 2006; 176(10): 6340-6346

O´Brien T.J., Beard J.B., Underwood L.J., et al.: "The CA125 gene: an extracellular superstructure dominated by repeat sequences" Tumor Biol 2001; 22(6): 348-366

Ochs H.D., Gambineri E.,Torgerson T.R.: "IPEX, FOXP3 and regulatory t cells: a model for autoimmunity" Immunol Res 2007; 38(1-3): 112-121

Oderup C., Cederbom L.: „ Cytotoxic T – lymphocyte antigen -4- dependent

down-modulation of costimulatory molecules on dentritic cells in CD4+ CD25+ regulatory T- cell- mediated suppression“ ; Immunology,118, 240-249

Odunsi K., Qian F., Matsuzaki J., et al.: “Vaccination with an NY-ESO-1 peptide of HLA-class I/II specificities induces integrated humoral and T cell responses in ovarian cancer”; PNAS, 2007, 104(31): 12837-12842

Oei AL, Sweep FC, Thomas CM, Boerman OC, Massuger LF.: “The use of monoclonal antibodies for the treatment of epithelial ovarian cancer” Int J Oncol,2008 Jun;32(6):1145-57.

Oida T.,Xu L., WeinerH. L., Kitani A., Strober W.: “TGFβ-mediated suppression by CD4+CD25+ T Cells is facilitated by CTLA-4 signaling”; The Journal of Immunology, 2006, 177: 2331-2339

Oldenhove G., de Heusch M. et all. : “CD4+CD25+ regulatory T Cells control T helper cell type 1 responses to foreign antigens induced by mature dentritic cells in vivo”; J. Exp. Med., 2003, 198(2): 259-266

Palena C., Schlom J.: “Vaccines angainst human carcinomas: Strategies to improve immune response” J of Biomed and Biotech, 2010, Article-ID:380697

Patankar M.S., Jing Y., Morrison J.C., et al.: “Potent suppression of natural killer cell responses mediated by the ovarian tumor marker CA 125” Gynecol Oncol 2005; 99(3): 704-713

Peggs K.S., Querzada S.A., et al.: “Blockade of CTLA-4 on both effector and regulatory T cell compartments contributes to the antitumor activity of anti-CTLA-4 antibodies”; J. Exp. Med., 2009, 206: 1717-1725

Pfisterer J., du Bois A.: „Das Ovarialkarzinom – Therapeutische Standards – Klinische Empfehlungen“ ; Georg Thieme Verlag

Powell B.R., Biust N.R., Stenzel P.: „An X-linked syndrome of diarrhea, polyendocrinopathy and fatal infection in infancy“ J Pediatr 1982; 100(5): 731-737

Quezada S.A., Peggs K.S., et al.: “CTLA4 blockade and GM-CSF combination immunotherapy alters the intratumoral balance of effector and regulatory T cells” J Clin Invest, 2006; 116(7): 1935-1945

Randolph D. A., Fathman C. G.: “CD4+CD25+ regulatory T Cells and their therapeutic potential”; Anu. Rev. Med., 2006, 57: 381-402

Reinartz S, Boerner H, Koehler S, Von Ruecker A, Schlebusch H, Wagner U.: „Evaluation of immunological responses in patients with ovarian cancer treated with the anti-idiotype vaccine ACA 125 by determination od intracellular cytokines – a preliminary report”

Reinartz S. 2004: „Vaccination of patients with advanced ovarian cancinoma with the anti-idiotype ACA 125: Immunological response and survival (Phase Ib/II)“ ; Clinical Cancer Research, 2004 Vol. 10, 1580-1587

Ribas A., Butterfield L. H., Glaspy J. A., Economous J. S.: “Current development in cancer vaccines and cellular immunotherapy”; J Clin Oncol, 2003, 21: 2415-2432

Ribas A., Comin-Anduix B., Chmielowski B., et al.: “Dendritic cell vaccination combined with CTLA-4-blockade in patients with metastatic melanoma” Clin Cancer Res 2009; 15(19): 6267-6276

Ribas, A: “Anti-CTLA4 Antibody Clinical Trials in Melanoma” Update Cancer Ther., 2007; 2(3): 133-139

Roncador G., Brown P. J., Maestre L. et all: “Analysis of FoxP3 protein expression in human CD4+CD25+ regulatory T Cells at the single-cell level2; Eur J Immunol, 2005, 35:1681-1691

Ronchetti S., Zollo O., Bruscoli S., et al.: “GITR, a member of the TNF receptor superfamily, is costimulatory to mouse T lymphocyte subpopulation” Eur J Immunol 2004; 34(3): 613-622

Rose P.G., Nerenstone S., Brady M., et al.: “A phase III randomized study of interval secondary cytoreduction in patients with advanced stage ovarian carcinoma with suboptimal residual diseas: a Gynecologic Oncology Group study” Proc Am Clin Oncol 2002; 21: Abstract 802

Rump A., Morikawa Y., Tanaka M., et al.: “Binding of ovarian cancer antigen CA125 / MUC16 to mesothelin mediates cell adhesion” J Biol Chem 2004; 279(10): 9190-9198

Sabbatini P., Dupont J., Aghajenian C.,et al.: “Phase I study of abagovomab in patients with epithelian ovarian, follopian tube or primary peritonel cancer” Clin Cancer Res 2006; 12(18): 5503-5510

Sakaguchi S., Sakagushi N., Asano M., et al.: “Immunologic self-tolerance maintainted by activated t cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes varios autoimmune diseases”, J Immunol 1995; 155: 1151

Sato E., Olson S. H. et all: “Intraepithelial CD8+ tumor-infiltrating lymphocytes and a high CD8+/regulatory T Cell ratio are associated with favorable prognosis in ovarian cancer”; PNAS, 2005, 102(51): 18538-18543

Schadendorf D., Ugurel S.,Schuler-Thurner B., et al.: “Decabacine (DTIC) versus vaccination with autologous peptide-pulsed dendritic cells (DC) in first-line treatment of patients with metastatic melanoma: a randomized phase-III tial of the DC trial group of the DeCOG” Annals of Oncology 2006; 17: 563-570

Schlebusch H, Reinartz S, Kaiser R, Grünn U, Wagner U.: „Production of a single-chain fragment of the murine anti-idiotypic antibody ACA 125 as phage-displayed and soluble antibody by recombinant phabe antibody technique“; Hybridoma. 1997 Feb;16(1):47-52.

Schlebusch H, Wagner U, Grünn U, Schultes B.: „A monoclonal antiidiotypic antibody ACA 125 mimicking the tumor-associated antigen CA 125 for immunotherapy of ovarian cancer“; Hybridoma. 1995 Apr;14(2):167-74.

Schmolling J, Reinsberg J, Wagner U, Krebs D. : „Antiidiotypic antibodies in ovarian cancer patients treated with the monoclonal antibody B72.3“; Hybridoma. 1995 Apr;14(2):183-6.

Schmolling J, Reinsberg J, Wagner U, Krebs D.:“Anti TAG-72 Antibody B72.3 – immunological and clinical effects in ovarian carcinoma“; Hybridoma. 1997 Feb;16(1):53-8.

Scholler N., Urban N.: “CA125 in ovarian cancer”; Biomark Med 2007; 1(4):513-523

Simvanetta F., Chiali A., Cordie C., et al.: “Increased CD127 expression on activated FoxP3+ regulatory t cells” Eur J Immunol 2010; 40(9): 2528-2538

Smith J.W. 2Nd, Walder E.B., Fox B.A., et al.: “Adjuvant immunization of HLA-A2-positive melanoma patients with a modified gp100 peptide induces peptide-specific CD8+ T cell responses” J Clin Oncol 2003; 21: 1562-1573

Sojka D. K., Hughson A., Sukiennicke T. L., Fowell D. J.: “Early kinetic window of target T Cell susceptibility to CD25+ regulatory T Cell activity”; The Journal of Immunology, 2005, 175: 7274-7280

Somasundaram R., Jacob L., Swoboda R. et all: „Inhibition of cytolytic T lymphocyte proliferation by autologous CD4+/CD25+ regulatory T cells in a colorektal cacinoma patient is mediated by Transforming Growth Factor”; Cancer Research, 2002, 62: 5267-5272

SpeiserD.E., Lienard D., Rufer N., et al.: “Rapid and strong human CD8+ T cell responses to vaccination with peptide, IFA and CpG oligodeoxynucleotide 7909” J Clin Invest 2005, 115: 739-746

Spolski R, Leonard W. J.: “ The yin and yan of interleukin 21 in allergy, autoimmunity and cancer”; Current Opinion in Immunology, 2008, 20: 295-301

Sulica A., Morel P., Metes D., et all.: “Ig-binding receptors on human NK-cells as effector and regulatory molecules” Int Rev Immunol, 2001, 20: 371-414

Sutmuller RP, van Duivenvorde LM, van Elsas A, et al.: “Synengism of cytotoxicT lymphocyte-associated antigene 4 blockade ande depletion of CD25 (+) regulatory T cells in antitumor therapy reveals alternative pathways for suppression of autoreactive cytotoxic T lymphocyte responses” J Exp Med, 2001; 194: 823-832

Takahashi T., Kuniyasu Y., Toda M., et al.: “Immunologic self-tolerance maintained by CD4+CD25+ naturally anergic and suppressiv t cells: induction of autoimmune diseases by breaking their anergic/suppressive state” Int Immunol 1998; 10(12): 1969-1980

Tang Q., Boden E. K. et all: “Distinct roles of CTLA-4 and TGFβ in CD4+CD25+ regulatory T Cell function”; Eur. J. Immunol., 2004, 34: 2996-3005

Tellier J., van Meerwijk J.P,, Romagnoli P.: “An MHC-linked locus modulates thymic differentiation of CD4+CD25+FoxP3+ regulatory t lymphocytes” Int Immunol 2006; 18(11): 1509-1519

Teng M.W.L., Swan J.B., Koebel C.M., Schreiber R.D., Smyth M.J.: “Immune-mediated dormancy: an equilibrium with cancer” J Leukoc. Biol 2008;

van der Burg M.E.L.,van Lent M., et al.: “The effect of debulking surgery after induction chemotherapy on the prognosis in advanced ovarian cancer” N Engl J Med 1995; 332: 629-634

Vasu C, Prabhakar B.S., Holtermann M. J.: „Targeted CTLA-4 engagement induces CD4+ CD25+ CTLA-4 high T regulatory cells with target (allo)antigen specifity“; The Journal of Immunology, 2004, 173: 2866-2876

Veldman C.M., Gebhard K., Uter W., et al.: “T cell recognition of desmoglein 3 peptides in patients with pemphigus vulgaris and healthy individuals” J Immunol 2004; 172: 3883-3892

Veltman J.D., Lambers M.E.H., et al.: “Low-dose cyclophosphamide synergizes with dendritic cell-based immunotherapy in antitumor activity”; J Biomed Biotechnol, 2010, Article ID: 798467

Viani G.A., Afonso S.L., Stefano J.E., et all: “Adjuvant trastuzumab in the treatment of her-2 positive early breast cancer: a meta-analysis of published randomized trials” BMC Cancer 207; 7:153

Viehl C. T., Moore T. T., Liyanage U. K.: „Depletion of CD4+ CD25+ regulatory T cells promotes a tumor-specific immune response in pancreas cancer-bearing mice“; Ann Sur. Oncol. 13(9): 1252-1258

Vieira P.L., Christensen J. R., Minaee S. et all: “IL-10-secreting regulatory T Cells do not express FoxP3 but have comparable regulatory function to

naturally occurring CD4+CD25+ regulatory T Cell"; The Journal of Immunlogy, 2004, 172: 5986-5993

Viguier M., Lemaitre F. et all: "FoxP3 expressing CD4+CD25+ regulatory T Cells are overrepresented in human metastatic melanoma lymph nodes and inhibit the function of infiltrating T Cells"; The Journal of Immunology, 2004, 173, 1444-1453

Von Boehmer H.: „Mechanisms of suppression by suppressor T cells"; Nature immunology 2005, 6(4): 338-344

Wada J., Suzuki H., Fuchino R., et al.: "The contribution of vascular endothelial growth factor to the induction of regulatory T-cells in malignant effusions" Anticancer Res. 2009; 29(3): 881-888

Wagner U, Schlebusch H, Köhler S, Schmolling J, Grünn U, Krebs D.: „ Immunological responses to the tumor-assosiated antigen CA 125 in patients with advanced ovarian cancer induced by the murine monoclonal anti-idiotype vaccini ACA125"; Hybridoma. 1997 Feb;16(1):33-40.

Wagner U.: „Immunological Consolidation of Ovarian Carcinoma Recurrences with Monoclonal anti-idiotype Antibody ACA 125: Immune responses and Survival in palliative treatment" ; Clinical Cancer Research, 2001 Vol. 7, 1154-1162

Wagner U.: „Antitumor antibodies for immunotherapy of ovarian carcinomas"; Hybridoma. 1993 Oct;12(5):521-8.

Waldmann T. A.: "Effective cancer therapy through immunomodulation"; Annu. Rev. Med., 2006, 56: 65-81

Wang H. Y., Wang R.-F.: „Regulatory T cells and cancer"; Current Opinion in Immunology 2007, 19:1-7

Wang H., Lee D. A et all: "Tumor-specific human CD4+ regulatory T Cells and their ligands: Implications for immunotherapy"; Immunity, 2004, 20: 107-118

Wei W.-Z., Morris G. P., Kong Y. M.: "Anti-tumor immunity and autoimmunity: a balancing act of regulatory T Cells"; Cancer Immunol. Immunother., 2004, 53: 73-78

Weiner L.M., Dhodapkar M.V., Ferrone S.: "Monoclonal antibodies for cancer immunotherapy" Lancet 2009, 373: 1033-1040

Willet C.G.,Boucher Y., di Tomaso E., et all: "Direct evidence that the VEGF-specific antibody bevacizumab has antivascular effects in human rectal cancer" Nat Med 2004; 10: 145-147

Wing K, Onishi Y, Prieto-Martin P, Yamaguchi T, Miyara M, Fehervari Z, Nomura

T, Sakaguchi S.: “CTLA-4 control over Foxp3+ regulatory T cell function”; Science, 2008 Oct 10;322(5899):271-5

Wing K., Fehévári Z., Sakagushi S.: “Emerging possibilities in the development and function of regulatory t cells” Int Immunol 2006; 18(7): 991-1000

Wing K., Larsson P., Sandström K. et all: “CD4+CD25+ regulatory T Cells from human thymus and cord blood suppress antigen-specific T Cell responses”; Immunology, 2005, 115: 516-525

Wolf A. M., Wolf D. et all: “Increase of regulatory T Cells in the peripheral blood of cancer patients”; Clinical Cancer Research, 2003, 9: 606-612

Wolf D., Wolf A.M., Rumphold H., et al.: “The expression of the regulatory t cell specific forkhead box transcription factor FoxP3 is associated with poor prognosis in ovarian cancer” Clin Cancer Res 2005; 11(23): 8326-8331

Yamazaki S., Iyoda T., Tarbell K. et all: “Direct expansion of functional CD25+CD4+ regulatory T Cells by antigen-processing dentritic cells”; J. Exp. Med., 2003, 198(2): 235-247

Yang J.C., Hughes M.,Kammula M., et al.: “Ipilimumab (Anti-CTLA-4-Antibody) causes regression in renal cancer associated with enteritis and hypophysitis” J Immunother, 2007; 30(8): 825-830

Yang J.C., Sherry R.M., Steinberg S.M., et al: “Randomized study of high-dose and low-dose inter leukin-2 in patients with metastatic renal cancer” J Clin Oncol, 2003; 21: 3127-3132

Zheng S. G., Wang J. H. et all: “TGF-˚ requires CTLA-4 early after T Cell activation to induce FoxP3 and generate adaptive CD4+CD25+ regulatory cell”; The Journal of Immunology, 2006, 176: 3321-3329

Zheng Y., Manzotti C. N., Liu M.: „CD86 and CD80 differentially modulate the suppressive function of human regulatory T cells“; The Journal of Immunology, 2004, 172: 2778-2784

Zhou G., Levitsky: „Natural regulatory T cells and de novo-induced regulatory T cells contribute indepentently to tumor-specific tolerance“; The Journal of Immunology, 2007, 178: 2155-2162

Zhou P., Zheng X., et al.: “B7 Blockade alters the balance between regulatory T cells and tumor-reactive T cells for immunotherapy of cancer”; Clin Cancer Res., 2009, 15(3): 960-970

Zhou X., Bailey-Bucktrout S., Jeker L.T., Bluestone J.A.: “Plasticity of CD4+ FoxP3+ T cells”; Curr Opin Immunol, 2009, 21(3): 281-285