



Technische Universität München

Urologische Klinik und Poliklinik

Klinikum rechts der Isar

**Charakterisierung der tumorspezifischen T-Zell-vermittelten
Immunität beim muskelinvasiven Urothelkarzinom**

Julia Schusdziarra

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

Vorsitzender:

Prof. Dr. Ernst J. Rummeny

Prüfer der Dissertation:

1. Priv.-Doz. Dr. Thomas Horn

2. Prof. Dr. Florian Bassermann

Die Dissertation wurde am 30.01.2018 bei der Technischen Universität München
eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 07.11.2018 angenommen.

Inhaltsverzeichnis

1. Verzeichnis häufig verwendeter Abkürzungen	3
2. Einleitung	5
2.1 Das Urothelkarzinom und seine Therapie	5
2.2 Das menschliche Immunsystem	8
2.2.1 Rolle der regulatorischen T-Zellen im Immunsystem	11
2.3 Tumorimmunologie	14
2.3.1 Allgemeine Tumorimmunologie.....	14
2.3.2 Rolle der regulatorischen T-Zellen in der Tumorimmunologie.....	17
2.3.3 Tumorimmunologie des UC	18
2.4 Immuntherapie.....	21
2.4.1 Allgemein etablierte Methoden.....	21
2.4.2 Immuntherapeutische Ansätze bei malignen Tumoren.....	21
2.4.3 Immuntherapeutische Ansätze beim UC.....	24
2.5 Zielsetzung.....	25
3. Material und Methoden	27
3.1 Patienten	27
3.2 Lymphozytenisolierung	28
3.3 Durchflusszytometrie.....	30
3.4 Zellkultur und Separation der Zellpopulationen.....	33
3.4.1 Treg-Selektion und -Depletion:	34
3.5 ELISpot (Enzyme linked Immunospot Technique).....	35
3.5.1 Antigene.....	36
3.5.2 Zellen	38
3.5.3 Durchführung der ELISpot-Tests.....	38

3.6 Spezifitäts-Assay für regulatorische T-Zellen (Treg-Spezifitäts-Assay)	40
3.7 Statistik	42
4. Ergebnisse	44
4.1 Patienten	44
4.2 PBMC-Subpopulationen.....	46
4.2.1 Das Vorkommen regulatorischer T-Zellen	48
4.2.2 Das Vorkommen CD25 ⁺ FOXP3 ⁻ T-Zellen.....	48
4.3 Tumor-Immunantwort und die Rolle der Treg.....	49
4.4 Änderungen unter Therapie	54
4.5 Spezifität regulatorischer T-Zellen	57
5. Diskussion	60
5.1 Patienten	60
5.2 Häufigkeiten der PBMC-Subpopulationen.....	60
5.3 Tumorimmunantwort.....	65
5.4 Änderungen unter Therapie	68
5.5 Spezifität regulatorischer T-Zellen.....	73
6. Zusammenfassung	75
7. Literaturverzeichnis.....	77
8. Danksagung.....	90

1. Verzeichnis häufig verwendeter Abkürzungen

Abkürzung	Bedeutung
APC	Antigen-präsentierende Zellen
BCG	Bacillus Calmette-Guerin
BPH	Benigne Prostatahyperplasie
CD	Cluster of differentiation
CTA	Cancer testis antigen
Cx	Zystektomie
DC	Dendritische Zelle(n) / dendritic cell(s)
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyriboneukleinsäure
ELISpot	Enzyme linked Immunospot Technique
FOXP3	Forkhead-Box-Protein P3
IDO	Indoleamine 2,3-Dioxygenase
IFN γ	Interferon γ
HCC	Hepatozelluläres Karzinom
HIV	Human Immunodeficiency Virus
HLA	Human Leukocyte Antigen
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
MHC	major histocompatibility complex
PD-1	Programmed death - Ligand 1-Rezeptor
PD-L1	Programmed death - Ligand 1
SLP	Synthetic Ion peptide(s)
TAA	Tumorantigen (tumor associated antigen)
TC	T-Zellen(n)
Tcon	Konventionelle T-Zellen (alle T-Zellen außer Treg)
Teff	Effektor-T-Zellen
TGF- β	Tumor growth factor β
TIL	Tumor infiltrating lymphocyte(s)
TNF α	Tumornekrosefaktor α

Treg	Regulatorische T-Zellen(n)
TURB	transurethraler Elektroresektion der Blase
TURP	transurethraler Elektroresektion der Prostata
UC	Urothelkarzinom

2. Einleitung

2.1 Das Urothelkarzinom und seine Therapie

Das Urothelkarzinom (UC) ist in Europa der sechsthäufigste maligne Tumor. Männer erkranken ungefähr dreimal häufiger als Frauen, beim Mann stellt es die vierthäufigste Tumorerkrankung dar (European-Cancer-Observatory, 2012).

Das UC stellt vor Plattenepithelkarzinomen und Adenokarzinomen mit 90% den größten Anteil maligner Tumoren der ableitenden Harnwege dar. Neben Nierenbecken, Ureter und Urethra tritt es am häufigsten in der Harnblase auf. Es werden papilläre (exophytisch wachsende) von soliden (flachen) Tumoren unterschieden. Risikofaktoren sind vor allem Zigarettenrauch (vierfach erhöhtes Risiko) und aromatische Amine aus der Farbstoffindustrie. (Böcker, 2008)

Das mittlere Alter bei Erstdiagnose des UC beträgt 65 Jahre (Longo, 2012).

Die Stadieneinteilung des UC erfolgt nach TNM-Klassifikation (s. Tabelle 1).

In Deutschland liegt die 5-Jahres-Überlebensrate des UC über alle Stadien hinweg bei Männern bei 47%, bei Frauen bei 41% (Robert-Koch-Institut/Krebsregister, 2013). Patienten mit einem nicht muskelinvasiven UC haben eine 5-Jahres-Überlebensrate von um die 80% (91% für pTis, 79 % für pTa und 83% für pT1) (Stein, 2001). Beim muskelinvasiven UC liegt die 5-Jahres-Überlebensrate für pT2-Tumore bei 89%, für pT3a bei 78%, pT3b bei 62% und für pT4 Tumore zwischen 50% und 24%. Diese Zahlen wurden für die Tumorstadien pTa bis pT3 nach einer Behandlung mittels Zystektomie erzielt. Bei Vorliegen von Lymphknotenmetastasen liegt die 5-Jahres-Überlebensrate zwischen 35% und 14% je nach Tumorstadium. (Stein, 2001; Jost, 2003). Patienten mit Fernmetastasen haben ein medianes Überleben zwischen 6 und 12 Monaten (Jost, 2003; Witjes, 2014). Für das nicht muskelinvasive UC liegen die Ergebnisse mit Behandlung durch TURB (transurethrale Elektroresektion der Blase) und BCG (Bacillus Calmette-Guerin)-Instillation in sehr ähnlichen Bereichen wie für das muskelinvasive UC nach Zystektomie im Tumorstadium pT2. Für lokal fortgeschrittene Tumore (pT3/pT4) zeigt die Zystektomie allerdings weniger ausgeprägte Effekte mit deutlich erniedrigten Überlebensraten. (Stein, 2001).

Stadium	Befund
pT0	Kein Tumornachweis
pTa	Papilläres nicht invasives Karzinom
pTis	Carcinoma in situ (auf Mucosa oberhalb der Lamina propria beschränkt)
pT1	Infiltration des subepithelialen Bindegewebes
pT1a	Infiltration der Lamina propria oberhalb der Muscularis mucosae
pT1b	Infiltration über Muscularis mucosae hinaus
pT2	Infiltration der Muscularis propria
pT2a	Infiltration der inneren, oberflächlichen Hälfte der Muscularis propria
pT2b	Infiltration der äußeren, tiefen Hälfte der Muscularis propria
pT3	Infiltration von perivesikalem Gewebe
pT3a	Mikroskopisch
pT3b	Makroskopisch
pT4	Infiltration angrenzender Organe
pT4a	Infiltration von Prostata, Samenblasen, Uterus oder Vagina
pT4b	Infiltration von Becken- oder Bauchwand
pN0	Keine regionalen Lymphknoten-Metastasen
pN1	einzelner Lymphknoten im kleinen Becken (hypogastrisch, obturatorisch, präsakral, A. iliaca ext.)
pN2	Mehrere Lymphknoten im kleinen Becken (hypogastrisch, obturatorisch, präsakral, A. iliaca ext.)
pN3	Lymphknoten im Bereich der A. iliaca communis befallen
pM0	Keine Fernmetastasen
pM1	Fernmetastasen vorhanden

Tabelle 1:

TNM-Klassifikation des Urothelkarzinoms (nach EAU-Guidelines (Witjes, 2014) und der deutschen S3-Leitlinien des Harnblasenkarzinoms (Awmf, 2016))

Die Therapie richtet sich gemäß der Europäischen Leitlinie (Stenzl, 2011) bzw. der deutschen Leitlinie (Awmf, 2016) nach dem Tumorstadium (TNM-Klassifikation s. Tabelle 1).

Initial werden alle Tumoren mittels transurethraler Elektroresektion (TUR) möglichst vollständig entfernt. Die transurethrale Resektion dient vor allem einem lokalen Staging. Je nach Tumorstadium und WHO-Differenzierungsgrad (low grade – high grade) erfolgt die weitere Behandlung.

Der solitäre pTa, low grade-Tumor ist mit einer transurethralen Elektroresektion der Blase (TURB) suffizient behandelt. Alle andern nicht-muskelinvasiven oberflächlichen Tumoren werden mit einer adjuvanten Instillationstherapie nachbehandelt, um Rezidiv- und Progressionsrisiko zu senken. Dafür werden entweder Zytostatika (Doxorubicin, Mitomycin C)

oder der Immunmodulator Bacillus Calmette-Guerin (BCG) verwendet. (Witjes, 2014) Letzterer hat zwar ein größeres Nebenwirkungsprofil, senkt aber vor allem das Rezidivrisiko stärker (Shelley, 2003) und kommt bei Tumoren mit hohem Rezidiv- und Progressionsrisiko (G3, Rezidiv) sowie zum Teil bei intermediärem Rezidiv- und Progressionsrisiko zur Anwendung (Dr. Med. Bröcheler, 2007; European-Cancer-Observatory, 2012). Dieses wird mittels des Scores des EORTC (European Organization of Research and Treatment of Cancer) je nach Tumoranzahl, -größe, -stadium, -Grading und Anzahl der stattgehabten Rezidive ermittelt (Babjuk, 2013).

BCG ist ein Stamm des Mycobacterium bovis und verursacht nach Aufnahme in Urothel- und Immunzellen eine starke Immunantwort, die in der Lage ist, Tumorzellen abzutöten (Kresowik, 2009). Der genaue zugrundeliegende Mechanismus bleibt noch vollständig zu klären, es wurde aber bereits neutrophilen Granulozyten und dem von ihnen gebildeten tumor necrosis factor(TNF)-related apoptosis-induced ligand (TRAIL) eine wichtige Rolle in der Anti-Tumor-Antwort nach BCG-Instillation zugewiesen (Rosevear, 2009).

Für muskelinvasive Tumore (ab pT2) ist nach der TUR die chirurgische Entfernung der Harnblase, die Zystektomie, der zentrale Bestandteil der weiteren Therapie. Diese beinhaltet - neben der Entfernung der Harnblase - eine pelvine Lymphadenektomie sowie die Entfernung von Prostata und Samenblasen beim Mann bzw. Adnexen, Uterus sowie Vaginaldach und Urethra bei der Frau (Dr. Med. Bröcheler, 2007).

Die Harnableitung nach Zystektomie kann durch verschiedene Operationstechniken mit und ohne Kontinenzhaltung gewährleistet werden. Die einfachste, inkontinente Form ist das Ureter-Haut-Stoma. Aufgrund der hohen Stenosegefahr im Haut- und Faszienniveau, wird es allerdings nur in Situationen angewandt, in denen ein operativer Eingriff am Darm vermieden werden soll. Die häufigste inkontinente Form der Harnableitung ist das intestinale Ileum-Conduit. (Stenzl, 2011)

Für die kontinente Form der Harnableitung gibt es grundsätzlich drei Möglichkeiten: ein Harnreservoir aus einem meist ileozökalen Darmanteil mit kontinentem Hautstoma. Hier erfolgt die Harnentleerung über Einmalkatheterismus. Bei der Uretersigmoideostomie wird der anale Schließmuskel zur Kontinenzhaltung genutzt; sie findet allerdings aufgrund des deutlich erhöhten Risikos für ein Kolonkarzinom an der Implantationsstelle und rezidivierender Harnwegsinfektionen kaum mehr Anwendung. Die am häufigsten angewandte Form der kontinenten Harnableitung ist die orthotope Neoblase. Ein detubularisierter Teil des terminalen Ileums wird an die intakte Harnröhre angeschlossen. (Stenzl, 2011)

Bei Vorliegen von Lymphknoten- oder Fernmetastasen finden multimodale Therapieansätze Anwendung.

Aufgrund randomisierter prospektiver Studien und somit bestehender Level I-Evidenz zum Nutzen der neoadjuvanten Chemotherapie besteht eine Grad B-Empfehlung der deutschen S3-Leitlinie zu einer - der Zystektomie vorangehenden - Verabreichung einer neoadjuvanten Cisplatin-basierten Kombinations-Chemotherapie bei allen Patienten mit muskelinvasivem, nicht-metastasiertem UC (ab Tumorstadium pT2) (Awmf, 2016). Diese bringt einen 5-Jahres-Überlebensvorteil von 5% (5-Jahres-Überlebensrate von ca. 50% (Witjes, 2014)) im Vergleich zur alleinigen Zystektomie (Vale C.L., 2005).

Eine cisplatinhaltige, adjuvante Chemotherapie soll bei organüberschreitenden Tumoren (ab pT3) oder Lymphknotenmetastasierung (pN+) unter Berücksichtigung individueller Faktoren in Erwägung gezogen werden (Witjes, 2014; Awmf, 2016). Eine Cisplatin-haltige adjuvante Chemotherapie bringt eine Risikoreduktion zu versterben von 26% bei einem medianen Follow-up von 2,5 - 5,75 Jahren gegenüber der alleinigen Zystektomie (Leow, 2014). Zusätzlich zeigte sich eine verlängerte progressionsfreie Zeit. Im Vergleich mit der Standard-MVAC-Chemotherapie aus Methotrexat, Vinblastin, Doxorubicin und Cisplatin hat sich eine Zweifach-Kombination aus Gemcitabine und Cisplatin als genauso wirksam, aber nebenwirkungsärmer herausgestellt (Von Der Maase, 2000).

Als palliative Chemotherapie für fortgeschrittene, organüberschreitende und metastasierte Tumoren zeigt eine cisplatinhaltige Kombination ein mittleres Überleben von etwa 14 Monaten (13,8 bei Gemcitabine/Cisplatin und 14,8 bei MVAC) (Von Der Maase, 2000) und eine 5-Jahres-Überlebensrate von ca. 15% (13% für Gemcitabine/Cisplatin und 15,3% für MVAC) (Von Der Maase, 2005). Ohne Chemotherapie überleben Patienten mit fortgeschrittenem UC im Mittel drei bis sechs Monate, mit der Gabe eines einzelnen Zytostatikums (z.B. Gemcitabine) wird ein medianes Überleben von sechs bis neun Monaten erreicht (Witjes, 2014).

Immuntherapeutische Verfahren beim muskelinvasiven UC sind derzeit in Europa noch nicht Bestandteil der leitliniengerechten Standardtherapie, Studien zeigen aber vielversprechende Ergebnisse (s. 2.4.3).

2.2 Das menschliche Immunsystem

Das menschliche Immunsystem besteht aus dem angeborenen und dem adaptiven Immunsystem. Beide Systeme haben zelluläre und humorale Komponenten und interagieren.

Das angeborene Immunsystem wehrt Pathogene unspezifisch ab und besteht aus einem zellulären Teil, den Granulozyten (neutrophile, basophile und eosinophile Granulozyten), den mononukleären Phagozyten (Monozyten, Makrophagen, dendritische Zellen) und den natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) sowie humoralen Bestandteilen. Diese bilden die sogenannte Komplementkaskade, die in der Lyse pathogener Erreger und deren Phagozytose durch Makrophagen resultiert. Das angeborene Immunsystem kann über verschiedene Wege aktiviert werden, z.B. direkt durch die Oberfläche eines Pathogens selbst oder aber durch antigengebundene Antikörper des adaptiven Immunsystems. Ebenso kann das angeborene Immunsystem über Zytokine oder Zell-Zell-Kontakte das adaptive Immunsystem aktivieren. (Böcker, 2008)

Das adaptive Immunsystem eliminiert Erreger durch spezifische Antikörper sowie zytotoxische Zellen. Seine zellulären Bestandteile werden in B- und T-Lymphozyten (im Folgenden B- und T-Zellen) unterteilt.

Die vorwiegend Antikörper-produzierenden B-Zellen (10 bis 20% aller peripheren Lymphozyten) werden im Knochenmark gebildet, wo sich durch Gen-Reearrangierung des Antikörper-Rezeptors und zentrale Selektion aus der Pro B-Zelle über die Prä B-Zelle und die frühe B-Zelle eine reife B-Zelle entwickelt. Diese wandert als naive B-Zelle mit membrangebundenen B-Zell-Rezeptoren vom IgM und IgD-Typ in sekundäre lymphatische Gewebe aus. Dort differenzieren sich die naiven B-Zellen nach Antigen-Erkennung weiter zu Antikörper-produzierenden Plasma-Zellen (kurzlebige, parafollikuläre, IgM-produzierende Plasmazellen und langlebige follikuläre Plasmazellen) sowie B-Gedächtniszellen. (Böcker, 2008)

Die T-Zellen (2/3 aller peripheren Lymphozyten) reifen im Thymus und werden aufgrund ihrer T-Zell-Rezeptoren aus zwei Eiweißketten in zwei Gruppen unterteilt: bereits aus der Prä-T-Zelle entstehen $\gamma\delta$ -T-Zellen (0,5 bis 5% aller T-Zellen), die den Thymus verlassen und vor allem in Haut und Gastrointestinaltrakt Nichtpeptidantigene MHC (major histocompatibility complex)-unabhängig rasch erkennen können. Alle anderen T-Zellen werden zu T-Zellen mit einem $\alpha\beta$ -T-Zell-Rezeptor. Zusätzlich exprimieren T-Zellen den CD3-Komplex für die Signaltransduktion. Die $\alpha\beta$ -T-Zellen differenzieren sich weiter in CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen, die in die sekundären lymphatischen Organe einwandern. Nach Antigen-Erkennung differenzieren sie sich weiter in CD4⁺ T-Helfer-Zellen (Th1 und Th2), welche eine wichtige Rolle bei der Aktivierung der B-Zellen spielen, und CD8⁺ zytotoxische T-Zellen. (Böcker, 2008)

Alle genannten Zellen des adaptiven Immunsystems tragen an ihrer Oberfläche Antigen-spezifische Rezeptoren. In der Embryonalzeit entsteht eine Vielzahl spezifischer Immunzellen,

deren Rezeptoren sich gegen unterschiedlichste Oberflächenmerkmale richten. Die Vielfalt dieser Rezeptoren (bei B-Zellen ca. 10^{11} unterschiedliche Rezeptoren (Rassow, 2006), die membranständigen Antikörpern entsprechen), entsteht durch somatische Rekombination ihrer Gene. Die Entwicklung der B-Zellen erfolgt im Knochenmark, T-Zellen wandern nach ihrer Bildung im Knochenmark zur Reifung in den Thymus aus. In beiden Organen wird durch negative Selektion die Entwicklung von Zellen gegen körpereigene Antigene verhindert. Epithelzellen präsentieren körpereigene Peptidfragmente an ihrer Oberfläche. Immunzellen, die diese erkennen, gehen durch Apoptose zugrunde. Im Thymus sorgt zusätzlich eine positive Selektion dafür, dass alle überlebenden T-Zellen MHC-I- (über CD8) und MHC-II-Moleküle (über CD4) erkennen. So stehen Immunzellen zur Aktivierung bereit, die sich gegen eine große Bandbreite körperfremder aber nicht gegen körpereigene Strukturen richten. (Böcker, 2008)

Für eine Antwort des adaptiven Systems werden Pathogene von speziellen Antigen-präsentierenden Zellen (APC), meist dendritischen Zellen (DC), aufgenommen und prozessiert. Die entstehenden antigenen Peptidfragmente werden an der Oberfläche der meist interdigitierenden DC mittels MHC II-Molekülen den B- und T-Zellen präsentiert. Für das jeweilige Antigen spezifische B- bzw. T-Zellen binden an die DCs. Durch diese Bindung und die dadurch initiierte Interleukin-Ausschüttung werden sowohl B-Zellen als auch $CD4^+$ und $CD8^+$ T-Zellen aktiviert. (Böcker, 2008)

$CD4^+$ naive T-Zellen differenzieren nach der Aktivierung durch Antigen-beladene DCs abhängig vom Typ des Antigens und durch die Antigenstimulierung bereitgestellten Zytokine entweder zu T-Helfer 1-(Th1) oder T-Helfer 2 (Th2)-Effektorzellen und proliferieren. Beide Zelltypen vermitteln eine Aktivierung von B-Zellen und unterscheiden sich durch den Typ der Immunantwort und der Immunglobuline, die sie induzieren. Th2-Zellen induzieren eher eine Reaktion vom allergischen Typ bzw. eine humorale Immunantwort, während Th1-Zellen eher eine zelluläre Antwort induzieren und vor allem durch ihre Produktion von $IFN\gamma$ (Interferon γ) eine wichtige Rolle in der Abwehr von Tumorzellen spielen. (Böcker, 2008)

B-Zellen können entweder auf gleichem Weg APC-abhängig aktiviert werden, sie sind aber auch in der Lage selbst das Antigen aufzunehmen und es wiederum auf MHCII-Molekülen an ihrer eigenen Oberfläche zu präsentieren und damit T-Zellen zu aktivieren.

Treffen aktivierte B-Zellen nun auf aktivierte T-Helfer-Zellen der gleichen Antigen-spezifität werden die B-Zellen zur Proliferation und Reifung und somit zur Antikörperproduktion angeregt. Dies geschieht durch die Bindung der beiden Zellen aneinander über CD40 und CD40L (Ligand) sowie durch die Ausschüttung der Interleukine 4, 5 und 6 durch die T-Zellen.

Das Binden von CD40 an CD40L bewirkt eine Differenzierung der B-Zellen zu Plasmazellen und einen Antikörperklassenwechsel, sodass lösliche Antikörper der Klassen IgA, IgE und IgG gebildet werden anstatt der membranständigen B-Zellrezeptoren der Klasse IgM. Die Aktivierung der B-Zellen geschieht vor allem durch Th2-Zellen, die eine vorwiegende Bildung von IgE initiieren. Auch Th1-Zellen können an B-Zellen binden, sie produzieren Interferon γ (IFN γ), welches sowohl die gebundene B-Zelle als auch andere B-Zellen in der Umgebung zur Bildung von IgG anregt. (Rassow, 2006; Böcker, 2008)

Im Rahmen ihrer Proliferation bilden sowohl B- als auch T-Zellen Gedächtniszellen aus, die über Jahre im Organismus überleben und im Falle einer erneuten Konfrontation mit demselben Antigen zu einer schnelleren Immunantwort als beim Erstkontakt führen. (Böcker, 2008)

Der andere Teil des adaptiven Systems sind die CD8⁺ zytotoxischen T-Zellen. Naive CD8⁺ T-Zellen werden - wie die CD4⁺ - durch die spezifische Bindung an Antigen-präsentierende DCs aktiviert, wodurch sie sich zu zytotoxischen T-Effektorzellen differenzieren. Sie erkennen infizierte körpereigene Zellen und töten diese ab. Mittels MHC I-Molekülen können alle kernhaltigen Körperzellen Antigene aus dem Zellinneren an ihrer Oberfläche präsentieren. Körperfremde präsentierte Antigene werden von den T-Zell-Rezeptoren der zytotoxischen T-Zellen erkannt, welche dann die Apoptose der infizierten Zelle auslösen. (Rassow, 2006)

Die Präsentation von Antigenfragmenten auf APCs über MHC II ist allerdings nur für intrazelluläre Antigene der APCs möglich. Einige Antigene, v.a. solche von Viren, die keine APCs befallen, sowie Tumorantigene, gelangen nicht ins Innere von APCs. Durch den Mechanismus der „Crosspresentation“ werden sie trotzdem den CD8⁺ T-Zellen zu deren Aktivierung zugänglich gemacht. Hierbei können APCs Peptide extrazellulärer Antigene nach Endozytose MHC I- abhängig präsentieren und somit auch CD8⁺ naive T-Zellen aktivieren. (Sigal, 1999; Lüllmann-Rauch, 2006)

2.2.1 Rolle der regulatorischen T-Zellen im Immunsystem

Zum adaptiven Immunsystem gehören nicht nur Zellen, die eine Immunantwort induzieren, sondern auch solche, die eine Immunantwort beenden bzw. verhindern oder abschwächen.

Trotz weitgehender klonaler Deletion unreifer autoreaktiver Immunzellen im Thymus und im Knochenmark, liegen im menschlichen Organismus nicht nur B- und T-Zellen gegen Fremdartigene, sondern auch gegen Selbstantigene vor (Sakaguchi, 2008). Diese führen aber nur

in seltenen Fällen zu Autoimmunerkrankungen, was für die Existenz eines Mechanismus spricht, der Immunreaktionen unterdrücken kann.

Als ein solcher wurden regulatorische T-Zellen (Treg) identifiziert, die CD4⁺ und CD8⁺ T-Effektor-Zellen (Teff), sowie NK-Zellen, B-Zellen und APCs in ihrer Aktivierung, Proliferation und Funktion unterdrücken (Sakaguchi, 2008).

Die Treg entstehen und reifen im Thymus. Sie sind CD4⁺, CD25⁺ und FOXP3⁺ und CD127⁻ negative T-Zellen.

CD 25 ist die alpha-Kette des Interleukin2 (IL2)-Rezeptors. IL2 ist ein essentieller Faktor für das Überleben von Treg. Dieses produzieren sie allerdings nicht selbst, sodass sie auf die IL2-Bildung ihrer Umgebung angewiesen sind. IL2 wird in hohem Maße von aktivierten T-Effektor-Zellen sezerniert und ist für die Proliferation aller T-Zellen essentiell.

FOXP3 (Forkhead-Box-Protein P3), der spezifischste Marker für Treg (Fontenot, 2003), ist ein Transskriptionsfaktor, der für die supprimierende Funktion der Treg nötig ist. Er dimerisiert mit dem nuclear factor von aktivierten T-Zellen (NF-AT) und unterdrückt die Bildung von IL2, 4 und IFN γ und führt somit zu einem Mangel an essentiellen Wachstumsfaktoren für T-Zellen. Außerdem stimuliert er die Produktion Treg-spezifischer Oberflächenmerkmale wie CD25, CTLA4 (cytotoxic T lymphocyte antigen 4) und GITR (glucocorticoid induced tumor necrosis factor receptor). (Wu, 2006) CTLA-4 ist ein CD28-ähnliches Molekül, das CD80/CD86 auf APC bindet (Nizar, 2010). CD28 kommt auf T-Zellen vor und wirkt durch seine Interaktion mit CD80/86 kostimulatorisch. CTLA-4 verhindert im Gegensatz dazu die Aktivierung einer Immunantwort (Takahashi, 2000), möglicherweise durch eine Reduktion der IL2-Sekretion (Krummel, 1996). GITR wird auf allen T-Zellen, besonders nach T-Zell-Rezeptor-Aktivierung, exprimiert. Seine Aktivierung auf Teff verhindert eine Suppression durch Treg, auf den Treg trägt diese wohl eher zu deren supprimierender Funktion bei. (Nizar, 2010) Zudem exprimieren Treg PD-L1 (programmed death ligand 1), über dessen Bindung an PD-1 auf T-Zellen die Treg ebenfalls eine Suppression der Effektor-T-Zellen vermitteln. Außerdem stimuliert PD-L1 die Treg-Proliferation. (Francisco, 2010)

CD127 ist die alpha-Kette des IL7-Rezeptors, welcher auf allen aktivierten Effektor-T-Zellen exprimiert wird, auf Treg aber nicht oder nur in geringem Ausmaß gefunden wird. (Mougiakakos, 2010)

Für die immunsupprimierende Wirkung der Treg spricht das Auftreten von Autoimmunerkrankungen und Allergien bei Defekten der Treg (Sakaguchi, 2008). In Mausversuchen induzierte die Inaktivierung von FOXP3 diverse Autoimmunerkrankungen

(Lopes, 2007). Auch beim Menschen wurde ein Zusammenhang zwischen mangelnder Treg-Aktivität und Autoimmunität gezeigt, z.B. für: Multiple Sklerose (Viglietta, 2004), Diabetes mellitus Typ I (Lindley, 2005), Psoriasis (Sugiyama, 2005), Rheumatoide Arthritis (Wang, 2014), Myasthenia gravis (Thirupathi, 2012).

Bei Patienten mit T-Zell-vermitteltem Typ I-Diabetes ist zwar die Häufigkeit der Treg gegenüber gesunden Kontrollen nicht erniedrigt, ihre Funktion, die Suppression von Effektorzellen, ist allerdings deutlich geringer ausgeprägt. Außerdem schütten sie mehr IFN γ und weniger IL10 aus, was zu einem proinflammatorischen Milieu führt. (Lindley, 2005)

Bei Patienten mit rheumatoider Arthritis wurden höhere Treg-Zahlen im peripheren Blut gefunden als bei Gesunden. Die Funktion dieser Zellen war nicht eingeschränkt. In der Synovialflüssigkeit befallener Gelenke war die Treg-Funktion allerdings deutlich herabgesetzt, was möglicherweise zur Krankheitsentstehung beiträgt. (Wang, 2014)

Die essentielle physiologische Funktion der Treg ist demnach die Unterdrückung autoreaktiver Immunzellen. Treg sind allerdings nicht nur im Zusammenhang mit Autoimmunität von Bedeutung, durch ihre immunsupprimierenden Eigenschaften scheinen sie auch maßgeblich am Verlust der Tumormunität beteiligt zu sein (Schreiber, 2011) (s. 2.3 Tumormunologie).

Die oben beschriebenen immunsupprimierenden, FOXP3⁺ natürlichen Treg (nTreg) sind nicht die einzigen regulatorischen T-Zellen. Im menschlichen Körper kommen noch weitere – für die hier durchgeführten Untersuchungen weniger bedeutende - Untergruppen vor: Induzierbare Treg (inducible Treg, iTreg) sind den nTreg in Struktur und Funktion sehr ähnlich, entstehen aber auf TGF β -Stimulation hin aus FOXP3⁻ T-Zellen in der Peripherie. Außerdem gibt es zwei weitere peripher induzierbare Treg; Tr1Treg entstehen IL10-abhängig und sind FOXP3⁻, Th3Treg entstehen unter TGF β aus CD4⁺ CD25⁻ T-Zellen. Auch CD8⁺ T-Zellen zeigen zum Teil regulatorische Funktion. Es gibt verschiedene Unterarten, die z.T. im Thymus, z.T. in der Peripherie entstehen. Sie üben ihre supprimierende Funktion Zellkontakt-abhängig oder durch TGF β - und IL10-Sekretion aus. (Mougiakakos, 2010; Nizar, 2010)

Im Folgenden beziehen sich alle Aussagen zu Treg auf nTreg, bzw. nTreg und iTreg, da diese nach ihrer Entwicklung nicht mehr voneinander zu unterscheiden sind.

2.3 Tumorimmunologie

2.3.1 Allgemeine Tumorimmunologie

Tumorzellen sind körpereigene, entartete Zellen, die durch Mutationen entstandene, besondere Strukturen besitzen, die einerseits Voraussetzung für die Tumorentstehung sind, die sie aber auch von normalen Körperzellen unterscheiden und grundsätzlich unterscheidbar machen. Die Mutationen können entweder spontan auftreten, durch den Einbau von Virus-DNA ins Genom bei Virusinfektionen oder durch die Einwirkung sonstiger mutagener Substanzen auf die Zelle entstehen. Sie bewirken die Entstehung von Onkogenen aus Protoonkogenen, den Verlust von intakten Tumorsuppressorgenen oder die abnorme Expression normaler Gene. Die veränderten Genprodukte sind die sogenannten Tumorantigene (TAAs). Diese Antigene sind für das Immunsystem wie Fremdartigene, sodass der menschliche Organismus, wie auf infektiöse Krankheitserreger, auch auf maligne Tumorzellen mit einer Immunantwort reagiert (Vesely, 2011). Allerdings kann diese die Entstehung, Ausbreitung und Metastasierung eines Tumors nicht immer verhindern; teilweise ist sie dafür sogar förderlich:

Ein gängiges und in Expertenkreisen weltweit anerkanntes Modell der Tumorentstehung ist das Prinzip des Immunoediting (Abb. 1) (Schreiber, 2011). Danach durchlaufen entartete Zellen drei Phasen der Interaktion mit dem Immunsystem - Elimination, Equilibrium und Escape - bevor es zum manifesten malignen Tumor kommt. Bei der Elimination sind - neben tumorspezifischer Aktivierung des angeborenen und adaptiven Immunsystems - hauptsächlich die bekannten Mechanismen der Abwehr pathogener Krankheitserreger aktiv, die sich hier gegen TAAs richten und entartete Zellen vernichten, bevor ein Tumor entsteht. Bei Equilibrium und Escape treten bislang deutlich schlechter verstandene Mechanismen in Kraft, die sowohl von Seiten des Tumors als auch vom Immunsystem ausgehen und beide Bestandteile so verändern, dass der Tumor nicht mehr erkannt und eliminiert wird, sondern sich ausbreitet. Im Equilibrium befinden sich Tumorzellen, die der Elimination entgangen sind und latent persistieren, aber keinen invasiven Tumor bilden. Sie werden ausschließlich durch Bestandteile des adaptiven Immunsystems, wie IL12, IFN γ , CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen, supprimiert und an der Proliferation gehindert. Escape beschreibt die Phase der Tumorzelle, in der sie die Mechanismen des Immunsystems im Equilibrium, z.B. durch weitere Mutationen, umgangen hat und sich invasiv sowie metastasierend ausbreitet. (Schreiber, 2011)

Während dieser beiden Phasen spielen neben Veränderungen der Tumorzellen selbst Veränderungen des umgebenden Milieus eine große Rolle für den Verlust der Tumorimmunität.

Zum einen produzieren Tumore immunsuppressive Zytokine und Enzyme, wie VEGF (vascular endothelial growth factor), TGF- β (transforming growth factor β) oder IDO (Indoleamine 2,3-Dioxygenase). Außerdem bewirken Myeloid-derived-suppressor-cells und Treg eine Immunsuppression. Erstere sind unreife Knochenmarkszellen, die TGF- β sezernieren, T-Zell-Rezeptoren von tumorspezifischen T-Zellen nitrieren und damit inaktivieren, für die Funktion von Effektor-T-Zellen essentielle Aminosäuren sequestrieren sowie Treg induzieren. Treg produzieren die immunsuppressiv wirkenden Zytokine IL10 (Interleukin 10) und TGF- β und verbrauchen für ihre eigene Funktion IL2, welches auch für zytotoxische T-Zellen essentiell ist. (Schreiber, 2011)

Die Hypothese des Immunoediting entstand auf dem Boden von Tierversuchen, die ergaben, dass Tumoren von immundefizienten Mäusen weniger immunogen sind, als solche von immunkompetenten. Hierzu wurden durch Karzinogene bei gesunden und bei immundefizienten Mäusen (Mäuse mit Gendefekten im angeborenen oder erworbenen Immunsystem bzw. Mäuse, die mit monoklonalen Antikörpern gegen T-Effektorezellen oder Interferon γ behandelt wurden) Tumoren induziert. Tumorzellen dieser beiden Gruppen wurden jeweils wieder gesunden Mäusen injiziert. Die Tumorzellen der immunkompetenten Gruppe induzierten erneut Tumore in 100% der Fälle. Die Tumorzellen der immundefizienten Mäuse induzierten in den gesunden Mäusen nur zu 50% erneut Tumore. Daraus wurde geschlossen, dass das Immunsystem unveränderte Tumorzellen vernichten kann, die Tumorzellen aus einem immunkompetenten Organismus allerdings durch das Vorhandensein des Immunsystems schon so verändert sein müssen, dass sie nicht mehr abgewehrt werden können. Unter dem Selektionsdruck des funktionierenden Immunsystems verändern sich die Tumorzellen immer weiter bis sie schließlich nicht mehr erkannt und eliminiert werden können. (Schreiber, 2011) Ebenfalls für die Elimination von Tumorzellen durch das Immunsystem spricht das häufigere Auftreten von Malignomen bei Mäusen, denen bestimmte Immunzellen fehlen (Vesely, 2011). Beim Menschen ist für einige Tumorentitäten eine Korrelation zwischen tumorinfiltrierenden immunkompetenten Zellen und dem Überleben der Patienten gezeigt worden, z.B. beim malignen Melanom (Clemente, 1996) und dem kolorektalen Karzinom (Galon, 2006), (Mlecnik, 2011). Das Erkennen von Tumorantigenen durch Immunzellen bedeutet allerdings nicht zwingend einen effektiven Schutz vor dem Tumor, was dadurch deutlich wird, dass TAA-Immunantworten in hohem Maße während der Tumorprogression auftreten (Schreiber, 2011). Der fehlende Abwehr-Effekt trotz vorhandener spezifischer Immunreaktion ist im Modell durch die Phasen Equilibrium und Escape und der darin vorkommenden Entwicklung protektiver Faktoren durch die Tumorzellen erklärt.

Daran beteiligte Mechanismen, die in einer Hemmung der Immunantwort resultieren, werden häufig als Checkpoints bezeichnet. Als einen wichtigen derartigen Checkpoint konnte erst in der jüngsten Zeit der programmed death-Ligand 1 (PD-L1) und sein Rezeptor PD-1 identifiziert werden. PD-L1 ist ein Transmembranprotein, das eine wichtige Rolle bei der Inhibition von Immunreaktionen spielt. Durch die Bindung an den Rezeptor PD-1, der von T-Zellen exprimiert wird, kommt es zum Verlust von Proliferation und Aktivität (Produktion von $\text{IFN}\gamma$, IL-2 und $\text{TNF}\alpha$) der T-Zellen. PD-L1 wird von Immunzellen des angeborenen und des adaptiven Immunsystems (NK-Zellen, dendritischen Zellen, B-Zellen, T-Zellen) - auf Stimulation des T-Zell-Rezeptors hin bzw. durch bestimmte Zytokine vermittelt - exprimiert. Zum Beispiel chronische virale Infektionen (wie Hepatitis) oder Autoimmunerkrankungen lösen die Bildung von PD-L1 aus, um die - hier Gewebe-schädigende - Aktivität zytotoxischer T-Zellen zu vermindern. Auch Tumorzellen können PD-L1 exprimieren und dadurch gegen den Tumor gerichtete T-Zell-Aktivität verhindern. (Wang, 2016) Entsprechend dieser Funktion von PD-L1 gibt es viele Tumorentitäten bei denen eine hohe PD-L1-Expression mit einer schlechten Prognose korreliert. z.B. beim Nierenzellkarzinom (Frigola, 2011), Pankreaskarzinom (Nomi, 2007), Mammakarzinom (Muenst, 2014) und auch beim Urothelkarzinom (Nakanishi, 2007). Bei einigen Tumorentitäten ließ sich diese Theorie allerdings nicht bestätigen. Zum Beispiel zum nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinom gibt es widersprüchliche Ergebnisse. Einige Arbeiten zeigen hier eine Korrelation zwischen PD-L1-Überexpression und besserer Prognose (Velcheti, 2014). Über PD-L1 kann es auch zu einer T-Zell-Stimulation kommen, auf welche Weise und wodurch die unterschiedlichen Auswirkungen bewirkt werden ist noch unklar, vermutlich aufgrund unterschiedlicher Kostimulation bzw. der Bindung von PD-L1 an einen anderen Rezeptor. (Wang, 2016)

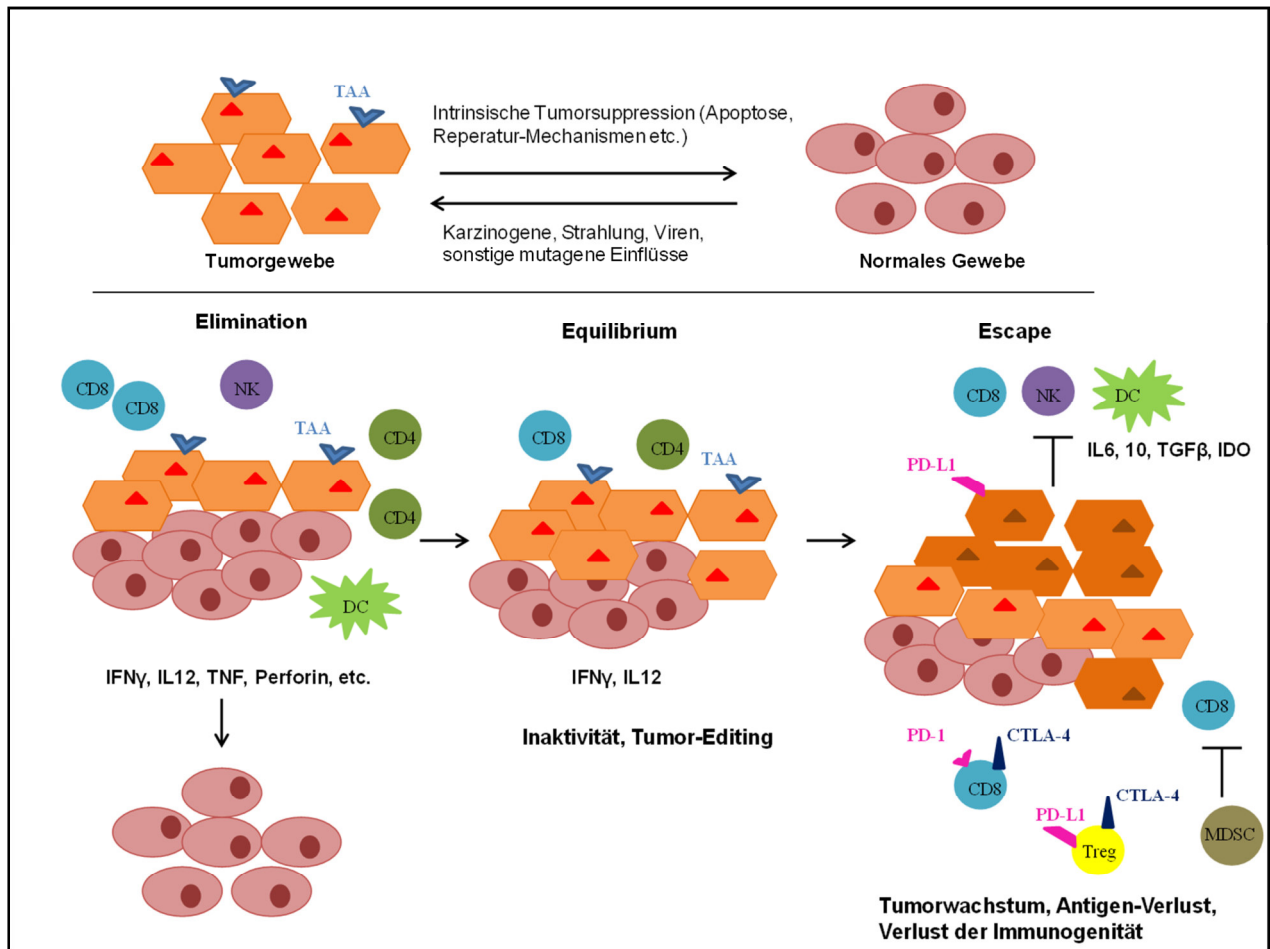


Abbildung 1

Prinzip des Immunoediting nach Schreiber et al (Schreiber, 2011)

DC = dendritische Zelle, CD8 = CD8⁺ T-Zelle, CD4 = CD4⁺ T-Zelle, NK = Natürliche Killerzelle, TAA = Tumorantigen, MDSC = Myeloid-derived suppressor cell, Treg = regulatorische T-Zelle

2.3.2 Rolle der regulatorischen T-Zellen in der Tumorummunologie

Die - im Modell beschriebene - Rolle der Treg beim Verlust der Tumorummunität lässt vermuten, dass erhöhte Treg-Häufigkeiten mit dem Auftreten bzw. Fortschreiten von Tumorerkrankungen korrelieren. Dahingehende Erkenntnisse gibt es z.B. beim Prostatakarzinom (Miller, 2006), Kolonkarzinom (Clarke, 2006), Mamma- und Pankreaskarzinom (Liyanage, 2002), Magen- und Oesophaguskarzinom (Ichihara, 2003) und Kopf/Hals-Tumoren (Schaefer, 2005), wo signifikant höhere Treg-Level im Blut der Patienten als in dem gesunder Probanden gefunden wurden. Eine solche Häufung von Treg im peripheren Blut gegenüber gesunden Kontrollen wurde auch für das UC gefunden (Loskog, 2007).

Erhöhte Treg sind nicht nur mit dem Auftreten von Tumoren sondern auch mit fortschreitendem Tumorstadium assoziiert, z.B. beim Ovarialkarzinom (Curiel, 2004) (erhöhte Treg-Häufigkeit im Tumorgewebe) und dem hepatozellulären Karzinom (erhöhte Treg-Häufigkeit im Tumorgewebe und im peripheren Blut) (Zhang, 2010).

Ein hohes Treg-Vorkommen korreliert bei vielen Tumoren mit einer schlechten Prognose. So wurde z.B. beim Ovarialkarzinom gezeigt, dass die Häufung tumorinfiltrierender Treg mit einem reduzierten Überleben vergesellschaftet ist (Curiel, 2004). Gleiches wurde für das Mamma-Karzinom (Takenaka, 2013), das Magenkarzinom (Kono, 2006; Kashimura, 2012), das Oesophaguskarzinom (Kono, 2006) und das hepatozelluläre Karzinom (HCC) (Gao, 2007) gefunden. Im Gegensatz dazu korreliert beim Kolonkarzinom ein vermehrtes Treg-Vorkommen im Tumorgewebe mit besseren Überlebenszeiten (Salama, 2009). (s. 5. Diskussion, Tab. 7) Auch beim UC wurde eine Assoziation tumorinfiltrierender Treg mit einer besseren Prognose gefunden (Winerdal, 2011). Dieses Ergebnis ist aufgrund geringer Patientenzahlen allerdings nur eingeschränkt aussagekräftig.

2.3.3 Tumorimmunologie des UC

2.3.3.1 Beschriebene Tumorantigene des UC

Beim UC sind bereits einige TAAs bekannt. Bislang wurde kein TAA identifiziert, das als Tumormarker für Diagnose oder Verlaufskontrolle des UC eingesetzt werden kann, da keines dieser TAAs konstant in allen oder nahezu allen Tumoren exprimiert wird.

Eines der am besten untersuchten Tumorantigene ist p53. Ein homozygoter Defekt dieses Tumorsuppressorgens ist an 50% aller Tumorerkrankungen beteiligt (Rassow, 2006). Das intakte Genprodukt ist ein Protein, das bei DNA-Defekten den Zellzyklus anhält und bei fehlender DNA-Reparatur die Zelle der Apoptose zuführt, indem es als Transskriptionsfaktor für proapoptotische Proteine fungiert. Im UC wird ein mutiertes p53 in 55% der Fälle exprimiert (Stadler, 2011). Das Produkt des mutierten p53-Gens ist nicht funktionsfähig und führt zur Anhäufung von DNA-Schäden und somit zur Zellentartung. Das veränderte Protein häuft sich in den Zellen an, weshalb ein erhöhter Spiegel in Tumorzellen gefunden wird.

Survivin ist eines der „Inhibitors of Apoptosis Proteins“ (IAPs). Diese verhindern den programmierten Zelltod und sind Transskriptionsfaktoren für Gene, deren Genprodukte die invasive Ausbreitung von Tumorzellen fördern. Normalerweise kommt es fast ausschließlich in der Embryonal- und Fetalzeit zur Expression von Survivin. Beim Erwachsenen findet man es in gesunden Zellen, wenn überhaupt, in nur sehr geringem Ausmaß. In Tumorzellen kommt es

allerdings deutlich vermehrt vor. Shariat et al fanden in ihrer Studie bezüglich des UC Survivin in 64% der Zystektomie-Präparate und in 94% der Lymphknotenmetastasen. Außerdem wurde die Überexpression von Survivin mit dem Tumorstadium, der Rezidivrate und der Mortalität des UC positiv korreliert. (Shariat, 2007)

NY-ESO-1 und MAGE-A4 sind „Cancer-testis-antigen (CTAs)“ (Sharma, 2003; Bergeron, 2009). Diese werden außer von embryonalen Stammzellen und dem Trophoblast der Plazenta physiologischerweise ausschließlich im Hoden exprimiert. (Dyrskjot, 2012) In Tumorzellen des malignen Melanoms, Lungen-, Leberzell-, und Mamma-Karzinoms, sowie auch des UCs kommen CTAs allerdings auch vor. (Dyrskjot, 2012). Gemeinsamkeiten von Gameten und Tumorzellen sind Hypomethylierung der DNA, Angiogenese, Fehlen der Immunogenität und die Expression von Chorion-Gonadotropin. Bei Keimzellen bzw. Zellen des Trophoblasten führen diese Mechanismen zur Immortalisierung, Implantation, Meiose und Migration, bei der Tumorgenese zur Transformation, Invasion, Aneuploidie und Metastasierung (Simpson, 2005). NY-ESO-1 wird in 35% der UC exprimiert (Dyrskjot, 2012). Bergeron et al untersuchten UC-Patienten und fanden MAGE-A4 in 48% der Gewebeproben aus muskelinvasiven Karzinomen und in 73% der Lymphknotenmetastasen überexprimiert (Bergeron, 2009).

Muzine sind Glykoproteine, die sich als Transmembranmoleküle an epithelialen Zelloberflächen, wie z.B. am Urothel in der Blase, befinden und die Anhaftung von Bakterien verhindern. MUC1 ist eines von neun bekannten Muzinen, welches in malignen Tumoren überexprimiert und vermindert glykosyliert wird (Simms, 1999). Man nimmt an, dass es maßgeblich an Signalkaskaden beteiligt ist, die zur Tumorentstehung beitragen (Schroeder, 2004). Bekannt ist dies beim Lungen- (Nagai, 2006), Mamma- (Zaretsky, 2006), Ovarial- (Deng, 2013), Kolon- (Kimura, 2013) sowie beim Urothelkarzinom (Simms, 1999). Bei diesem wurde das veränderte MUC1 von Simms et al in 47% der untersuchten T4-Tumore gefunden (Simms, 1999).

Für Invasion und Metastasierung ist für Tumorzellen das Durchdringen von Extrazellulärmatrix und Gefäßen notwendig. Wesentlicher Bestandteil dieser Strukturen sind Heparansulfate und Heparansulfat-Proteoglykane. Heparanasen sind Enzyme, die diese Moleküle abbauen. Sie werden u.a. von Tumoren in hohem Maße produziert. Heparanase wird in 68% aller muskelinvasiven UCs exprimiert. (Gohji, 2001)

Zwei weitere klassische Onkogene sind Epidermal growth factor receptor (EGFR) und human epidermal growth factor receptor 2 (HER2). Beide sind Tyrosinkinase, die an Signalkaskaden der Steuerung von Proliferation und Zellzyklus beteiligt sind (Sato, 2013), (Lae, 2010). Bei einigen malignen Erkrankungen werden sie überexprimiert. Im UC kommt dies in 74% der Fälle vor (Chaux, 2012). Bei HER2 gibt es mehrere Studien, die beim UC eine Häufigkeit zwischen

9,2% (Lae, 2010) und 80% (Gardmark, 2005) fanden. Eine inkonstante Überexpression von HER2 ist unter anderem auch beim Mamma-Karzinom bekannt (Goldhirsch, 2007).

Im Rahmen der Zellproliferation führt eine Vielzahl von durchlaufenen Mitosen letztendlich zum Zelltod. Durch den stetigen DNA-Verlust an den Telomeren der Chromosomen, wo eine vollständige Replikation durch die DNA-Polymerase nicht möglich ist, führt zu zunehmender Verkürzung der Chromosomen. Bei Verlust von Exons mit lebenswichtigen Geninformationen kommt es zum Absterben der Zelle. Die Telomerase ist ein Enzym, das die Telomere der Chromosomen nach der Mitose wieder verlängert und so eine endlose Replikation der DNA ermöglicht. Physiologischerweise kommt sie ausschließlich in Stammzellen vor, die lebenslang persistieren sollen. Auch Tumorzellen entziehen sich dem Zelltod durch die Expression der Telomerase. (Rassow, 2006) Für das UC zeigten Studien die Expression von Telomerase in fast allen Fällen, zwischen 96% (Muller, 1996) und 97,5% (Lin, 1996).

Die oben beschriebene Expression von PD-L1 durch Tumorzellen und die dadurch hervorgerufene unterdrückte Aktivierung von T-Zellen wird auch beim UC gefunden und korreliert mit der Aggressivität des Tumors (Nakanishi, 2007) sowie mit schlechter Prognose (Wang, 2016).

2.3.3.2. Tumordinfiltrierende Lymphozyten beim UC

Das Vorkommen tumordinfiltrierender Lymphozyten sowie ein Zusammenhang zwischen deren Menge mit der Prognose der Tumorpatienten spricht auch beim UC für das Vorliegen einer relevanten Tumor-Immunreaktion. Die meisten Untersuchungen ergaben dass tumordinfiltrierende Lymphozyten mit einer günstigen Prognose assoziiert sind (Liakou, 2007).

2.3.3.3 Regulatorische T-Zellen beim UC

Bezüglich Treg gibt es auch beim UC erste Erkenntnisse. Wie bei vielen anderen, z.T. oben erwähnten Tumorarten, fanden Loskog et al sowie Chi et al auch bei UC-Patienten ein gegenüber Kontrollpatienten erhöhtes Treg-Vorkommen im peripheren Blut bzw. auch im Tumorgewebe (Loskog, 2007) (Chi, 2010). Winerdal et al ordnete diesen im Tumorgewebe vorkommenden Treg, aufgrund ihrer Assoziation mit verlängertem Überleben, eine am ehesten protektive Funktion zu (Winerdal, 2011). Eine eindeutige Bestätigung dieser Ergebnisse gibt es bislang nicht. Ein erwähnenswertes Ergebnis von Winerdal et al ist auch, dass die Expression von FOXP3 durch Tumorzellen - und nicht durch Immunzellen - mit einer schlechten Prognose zusammenhängt (Winerdal, 2011).

2.4 Immuntherapie

2.4.1 Allgemein etablierte Methoden

Bei der Behandlung zahlreicher Erkrankungen wird auf viele unterschiedliche Arten das Immunsystem beeinflusst oder verändert. Die wohl bekannteste und älteste Methode ist die Impfung. 1796 entwickelte Edward Jenner die erste Impfung, die sich gegen das Pockenvirus richtete (Groß, 2009). Bei der aktiven Impfung wird das Immunsystem durch die Exposition gegenüber abgeschwächten Krankheitserregern sensibilisiert und baut so mit Hilfe der Gedächtniszellen eine langanhaltende Immunität gegen diese Erreger auf. Bei Autoimmunerkrankungen ist die medikamentöse Immunsuppression mittlerweile ein Standardverfahren. Die Immunzellen werden nicht nur mittels Chemotherapeutika supprimiert, sondern es liegen mittlerweile auch spezifische Substanzen vor, die gezielt im Immunsystem eingreifen. Bei Vergiftungen werden spezifische Antikörper als Antidot gegeben bzw. wird bei akuten Infektionen passiv geimpft.

2.4.2 Immuntherapeutische Ansätze bei malignen Tumoren

Der erfolgreiche Therapieansatz der Impfung wurde auch auf Tumorerkrankungen zu übertragen versucht, zumal das Immunsystem auf maligne Zellen ganz ähnlich wie auf Krankheitserreger reagiert (s. 2.3.1 allgemeine Tumorummunologie).

Ein Malignom, das mittlerweile durch eine standardmäßig durchgeführte Impfung zu vermeiden ist, ist das Cervix-Karzinom. Die aktive Impfung richtet sich hier allerdings nicht gegen den Tumor selbst, sondern gegen das Papillomavirus. Die Infektion mit den Typen 16 und 18 dieses Virus sind Voraussetzung für die Entstehung von etwa 70% aller Cervix-Karzinome (Fisher, 2013). Eine vom Virus unabhängige Entstehung des Karzinoms ist extrem selten, sodass der Effekt einer Tumor-Impfung entsteht. Ein ähnliches Beispiel ist die Reduktion des Risikos für ein hepatozelluläres Karzinom durch die Hepatitis B-Impfung. Vom Mechanismus allerdings lässt sich diese Impfung nicht auf andere Krebsarten, die nicht virusassoziiert sind, übertragen.

Tumorspezifische Impf-Ansätze sehen die Exposition des Immunsystems mit TAAs und die Bildung spezifischer Antikörper dagegen vor. Bekannte TAAs werden allerdings nicht konstant von allen Tumoren einer Tumorart und auch innerhalb eines Tumors nicht von allen Tumorzellen exprimiert. Neben anderen Problemen der Tumorimpfstoffentwicklung, -verträglichkeit und -effektivität ist auch dies ein Grund dafür, dass es bislang keine prophylaktische Tumor-Impfung gibt. Sie werden erst nach Tumorentstehung verabreicht und

die entstehende Immunität soll die bereits vorhandenen Tumorzellen bekämpfen. Im Tiermodell sind solche Impfungen hoch effektiv (Kimura, 2013), vorausgesetzt man impft gegen ein TAA, das von bestimmten Malignomzellen konstant exprimiert wird. Beim Menschen gibt es viele Studien in Kombination mit Standard-Therapieverfahren und bei weit fortgeschrittenen Tumorstadien. Die Beurteilbarkeit der Impfeffektivität ist in diesen Studien drastisch eingeschränkt. Einerseits können positive Effekte auch durch die Standard-Therapie bedingt sein, andererseits könnte ein fehlende Wirksamkeit auch auf dem immunsupprimierenden Mikromilieu des Tumors beruhen, das in späten Tumorstadien möglicherweise deutlich ausgeprägter ist, als in frühen oder gar vor Tumorentstehung (Schreiber, 2011). Die Einführung prophylaktischer Impfungen gegen TAAs ist umstritten, da TAAs ursprünglich Autoantigene sind und somit die Induktion von Autoimmunität zu befürchten ist. Trotz dieser Umstände zeichnen sich auf diesem Gebiet erste Erfolge ab: MUC 1 ist, wie oben beschrieben, in Tumoren derartig verändert, dass es kein Autoantigen mehr, sondern ein erfolgsversprechendes Ziel einer Impfung gegen epitheliale Tumore darstellt. Kimura et al untersuchten Patienten mit bekannten Kolon-Karzinom-Vorstufen in der Vorgeschichte. Auf die Impfung mit MUC1 bildeten diese zu 43,6% hohe Anti-MUC1-IgG-Spiegel. (Kimura, 2013)

Da der Hoden eine immunprivilegierte Zone im menschlichen Organismus ist, sind besonders auch die CTAs ein Ziel vieler Tumor-Impfmodelle. Obwohl es sich auch hier um körpereigene Antigene handelt, werden sie möglicherweise besser als fremd erkannt, da sie normalerweise außerhalb der Reichweite von Immunzellen vorkommen. Beim malignen Melanom gibt es Ansätze einer CTA-Impfung, die in Kombination mit 5-ASA (5-Aminosalicylsäure) effektiv wird, welches durch DNA-Hypomethylierung eine konstantere Expression der CTAs und damit des Angriffspunktes der induzierten Immunzellen und Antikörper bewirkt (Sigalotti, 2004).

Ein möglicher Grund für das häufige Versagen von Tumor-Impf-Modellen bzw. das Fehlen ihrer durchschlagenden Wirkung könnte möglicherweise bei immunsupprimierenden Mechanismen liegen, zum Beispiel den Treg, die die Ausbildung einer TAA-Immunantwort verhindern.

Neben der Impfung gibt es andere immunologische Ansätze der Tumortherapie, die auf der Expression von Tumorantigenen beruhen.

Trastuzumab, ist ein monoklonaler Antikörper, der sich gegen die extrazelluläre Domäne des HER2/neu-Rezeptors richtet und die über HER2 vermittelte Zellproliferation blockiert. Er wird standardmäßig beim HER2 positiven Mammakarzinom in Kombination mit einer Chemotherapie eingesetzt. Diese Kombination führt zu einer Ansprechrate von 40%. (Karow, 2012) Ähnliche Methoden sind die Rituximab-Therapie (Anti-CD20-Antikörper) des B-Zell-Non-Hodgkin-

Lymphoms und die Bevacizumab-Therapie (Anti-VEGFR-Antikörper) u.a. des metastasierten kolorektalen Karzinoms.

Eine direkte Beeinflussung regulatorischer T-Zellen ist ein weiterer Versuch der Tumorthherapie. Bei Mäusen führt eine Treg-Depletion durch einen monoklonalen CD25-Antikörper zur Elimination von Leukämien, Sarkomen und Melanomen (Onizuka, 1999). Obwohl der CD25-Antikörper Daclizumab nicht selektiv Treg eliminiert sondern auch auf T-Effektor-Zellen wirken könnte, eliminiert er beim metastasierten Mammakarzinom langfristig CD25⁺ FOXP3⁺ Treg und bewirkt eine effektive Bildung zytotoxischer T-Zellen auf eine TAA-Tumorvakkzine hin (Rech, 2009). Bei Kolonkarzinom-Patienten legt eine Treg-Depletion der PBMCs (peripheral blood mononuclear cells) in vitro eine TAA-spezifische CD4-T-Zell-Antwort frei (Clarke, 2006).

Der Durchbruch der letzten Jahre in der Immuntherapie einiger Tumorentitäten besteht in den sogenannten Checkpoint-Inhibitoren. Ein monoklonaler Antikörper gegen CTLA-4 (Ipilimumab) zeigte erste Erfolge in der Behandlung des malignen Melanoms (Hodi, 2010; Wolchok, 2013). CTLA-4 ist ein Rezeptor auf zytotoxischen T-Zellen, dessen Aktivierung in der Unterdrückung der T-Zell-Aktivität resultiert (s. 2.3 Tumorummunologie). Antikörper gegen das in Malignomen oft überexprimierte Molekül unterstützen somit die T-Zell-Aktivität. Noch bessere Ergebnisse konnten durch die Inhibition von PD-L1 bzw. PD-1 erzielt werden (Ärzteblatt, 2015). Monoklonale Antikörper gegen beide Strukturen verhindern letztendlich die Unterdrückung von Anti-Tumor-T-Zell-Aktivität und unterstützen somit die Tumor-Abwehr. Zum Beispiel beim malignen Melanom erhöht ein PD-1-Antikörper (Pembrolizumab) in vitro die Anzahl und Aktivität tumorantigen-spezifischer Lymphozyten (Wong, 2007). Auch in vivo zeigt Pembrolizumab in der Behandlung des malignen Melanoms eine progressionsfreies Überleben nach 6 Monaten von 46,4% bis 47,3% (je nach Dosis) im Vergleich zu 26,5% unter Ipilimumab-Therapie. Die Überlebensrate nach einem Jahr lag bei 68,4% bis 74,1% im Vergleich zu 58,2%. (Robert, 2015) Nicht nur zur Behandlung des malignen Melanoms, sondern auch für das fortgeschrittenen nicht-kleinzellige Bronchialkarzinom ist Pembrolizumab in den USA und in Europa bereits zugelassen (European-Medicines-Agency, 2016; Food-and-Drug-Administration, 2016). In den USA ist es ebenso zur Behandlung fortgeschrittener Plattenepithelkarzinome im Kopf-/Hals-Bereich zugelassen (Food-and-Drug-Administration, 2016). Beim kolorektalen Karzinom mit hoher Mikrosatelliten-Instabilität (Le, 2015) und beim therapierefraktären Hodgkin-Lymphom (Ansell, 2015) zeichnen sich in Studien vielversprechende Ergebnisse von PD-1-Inhibitoren ab.

2.4.2.1 Immunologische Effekte herkömmlicher Tumor-Therapeutika

Auch von primär nicht auf immunologischen Wirkmechanismen beruhenden Therapeutika, die in der Malignomtherapie eingesetzt werden, sind immunologische Effekte bekannt. Grundsätzlich ist die Theorie des durch Chemotherapeutika hervorgerufenen immunogenen Zelltodes anerkannt. Durch den Untergang von Tumorzellen werden TAAs leichter erreichbar für Immunzellen, es kommt zu einer vermehrten Präsentation von TAAs durch APCs. Durch diesen und andere Mechanismen interagieren Chemotherapeutika mit dem Immunsystem, der letztendliche Effekt einer Chemotherapie entsteht somit aus der Kombination aus Wirkung an der Tumorzelle selbst, Veränderung der Sensitivität der Tumorzelle gegenüber Immunreaktionen, Veränderungen an Immunzellen selbst und veränderter Aktivierung der Immunzellen (z.B. immunogener Zelltod). (Zitvogel, 2011)

Cyclophosphamid bewirkt bei verschiedenen fortgeschrittenen Tumoren neben dem antiangiogenetischen Effekt eine Reduktion von Treg und erhöht dadurch T- und NK-Zell-Immunantworten (Ghiringhelli, 2007).

Der Tyrosinkinase-Inhibitor Imatinib wird erfolgreich bei der BCR-ABL-positiven CML und AML angewandt. BCR-ABL ist ein gegenüber dem normalen ABL verstärkt aktives durch Translokation entstandenes Fusionsprotein, eine Tyrosinkinase, die zu ungehemmtem Zellwachstum führt, da sie im Gegensatz zur normalen ABL-Tyrosinkinase nicht vom Signaling eines Wachstumsfaktors abhängig ist. Imatinib kommt daneben auch bei der Behandlung von Gastrointestinalen Stromatumoren (GIST) zum Einsatz. Hier verlängert es die mediane Überlebenszeit von neun Monate auf über fünf Jahre. Es konnte gezeigt werden, dass nicht nur die Inhibition der Tyrosinkinase direkt sondern auch ein Einfluss auf das Immunsystem an diesem Effekt beteiligt ist. Unter der Therapie mit Imatinib kam es durch die reduzierte Expression von IDO in Tumorzellen zu einem Anstieg der CD8⁺ T-Zellen und zur vermehrten Apoptose von Treg im Tumorgewebe. (Balachandran, 2011)

2.4.3 Immuntherapeutische Ansätze beim UC

Das nicht muskelinvasive UC wird erfolgreich mittels einer Immuntherapie mit BCG behandelt. Wie oben beschrieben, wird bei nicht-muskelinvasiven Tumoren mit mittlerem und hohem Progressions- und Rezidivrisiko mittels intravesikaler Instillation des Immunmodulators BCG nach erfolgter TURB eine effektive Tumorummunantwort ausgelöst, die das Voranschreiten der Erkrankung bzw. das Auftreten eines Tumor-Rezidivs verhindern oder zumindest verzögern kann (Witjes, 2014; Awmf, 2016). Mit alleiniger TURB hat das nicht-muskelinvasive UC eine Progressionsrate von 30% und eine Rezidivrate von 70% (Rosevear, 2009). Unter einer BCG-

Erhaltungs-Therapie (ein bis drei Jahre) entwickeln sich signifikant weniger der nichtinvasiven Tumoren weiter zum invasiven UC als unter einer Chemotherapie mit Mitomycin C oder nur nach TURB. Das Progressionsrisiko wird von 13,8% unter Chemotherapie auf 9,8 % unter BCG-Therapie gesenkt (relative Senkung des Progressionsrisikos um 27%). (Sylvester, 2002)

Auch das Rezidivrisiko wird durch die BCG-Instillation mit Erhaltungstherapie um 32% gegenüber der Mitomycin C-Instillation gesenkt (Malmstrom, 2009).

Beim muskelinvasiven UC führte die Gabe von autologen dendritischen Zellen, die mit MAGE-A3 gepulst wurden, zur Verkleinerung von Lymphknoten- und Lebermetastasen des muskelinvasiven UC (Nishiyama, 2001). In der laufenden Phase II Placebo-kontrollierten Doppelblindstudie, MAGNOLIA, wird die Wirksamkeit einer Immunisierung durch rekombinantes MAGE-A3 in Kombination mit dem Immunstimulanz AS 15 (Adjuvant System) bezüglich krankheitsfreiem Überleben und Immunantworten bei MAGE-A3⁺ UC-Patienten nach Zystektomie untersucht (Clinicaltrials, 2014).

Erst vor kurzem wurden Erfolge durch Inhibitoren von PD-L1(programmed death-Ligand) bzw. von PD-1(PD-L1-Rezeptor) in der Behandlung des UC verzeichnet. Der monoklonale PD-L1-Antikörper Atezolizumab führte in einer klinischen Phase II-Studie bei Patienten mit therapierefraktärem lokal fortgeschrittenem oder metastasiertem UC zu einer Ansprechrates von 15 % unabhängig von der PD-L1-Expression. Bei mittlerer bis hoher PD-L1-Expression kam es zu einer Ansprechrates von 26%. (Rosenberg, 2016) In den USA ist er bereits für die Zweitlinien-Therapie beim fortgeschrittenen UC zugelassen (Food-and-Drug-Administration, 2016).

Ein weiterer therapeutische Ansatzpunkt ist der Rezeptor von PD-L1, PD1. Zur Behandlung des UC mit monoklonalen PD-1-Antikörper Pembrolizumab gibt es publizierte Daten einer Phase Ib-Studie (KEYNOTE-012) . Hier kam es bisher bei 27,6% der Probanden mit einem PD-L1-positiven lokal fortgeschrittenen UC zu einem Therapieansprechen, bei 10% kam es zu einer kompletten Remission. (Plimack E., 2015)

2.5 Zielsetzung

Das muskelinvasive Urothelkarzinom ist mit ca. 15.500 Neuerkrankungen im Jahr in Deutschland (Robert-Koch-Institut/Krebsregister, 2013) häufig und hat mit 5-Jahres-Überlebensraten zwischen 14 und 81% (Jost, 2003) eine mit zunehmendem Tumorstadium

schlechte Prognose. Seit langem war keine relevante Weiterentwicklung in der Therapie, vor allem des muskelinvasiven UC, eingetreten. Gleichzeitig ist das nichtmuskelinvasive Urothelkarzinom das Ziel der bislang erfolgreichsten und am häufigsten eingesetzten tumorgerichteten Immuntherapie, BCG, mit dem Ergebnis einer sehr effektiven Reduktion von Progressions- und Rezidivrisiko. Erst kürzlich konnte mit der Inhibition von PD-L1/PD-1 ein neuer Wirkmechanismus für die Therapie des muskelinvasiven UC etabliert werden. Weitere immuntherapeutische Ansätze wie die TAA-Immunisierung sind in der Versuchsphase. Voraussetzung für die Weiterentwicklung noch effektiverer immunologischer Therapieformen ist das bessere Verständnis der Rolle des Immunsystems und seiner einzelnen Komponenten beim UC.

In der vorliegenden Arbeit wurde eine prospektive Studie durchgeführt, die die T-Zell-vermittelte Immunität beim muskelinvasiven UC untersucht. Neben T-Effektorzellen werden dabei Treg beleuchtet, die möglicherweise am Verlust der Tumorimmunität und am Versagen bisheriger immuntherapeutischer Ansätze ursächlich beteiligt sein könnten.

Für eine Bestimmung der Häufigkeit von Treg in den verschiedenen Tumorstadien im peripheren Blut von UC-Patienten wurde die Treg-Population mittels Durchflusszytometrie der PBMCs quantifiziert.

Um (Therapie-)relevante Tumorantigene zu identifizieren wurde mittels IFN γ -ELISpot-Test die Häufigkeit und Stärke der Immunantwort auf verschiedene bekannte Tumorantigene des UC analysiert. Darüber hinaus wurde der Einfluss der Treg auf diese Tumor-Immunantwort durch Treg-Depletion charakterisiert.

Alle genannten Untersuchungen wurden vor und nach Standard-Therapie durchgeführt, um Interaktionen der Immunreaktionen mit der herkömmlichen Therapie zu erfassen.

Mittels eines im eigenen Labor entwickelten Assay wurden die Treg nicht nur hinsichtlich ihrer Zahl, sondern auch in Hinblick auf Ihre Antigen-spezifität untersucht. Hierfür wurde das gleiche Panel an beim UC bekanntermaßen relevanten TAA verwendet wie beim IFN γ -ELISpot. Die Spezifität von Teff und Treg innerhalb eines Patienten sollte verglichen werden und Aufschlüsse auf die Entstehung der Immunantwort geben.

3. Material und Methoden

Die Studie wurde als Kooperation zwischen dem Klinikum rechts der Isar, München und dem Deutschen Krebs-Forschungszentrum (DKFZ) in Heidelberg durchgeführt. Die Rekrutierung der Patienten, die Probengewinnung und Lymphozytenisolierung fand in der Urologischen Klinik des Klinikums rechts der Isar in München statt und wurde eigenständig durchgeführt, die weiteren Untersuchungen der gewonnenen Zellen wurden im Rahmen eines Forschungsaufenthalts von PD Dr. T. Horn im Department of Translational Immunology des DKFZ in Heidelberg unter der Leitung von Prof. Dr. P. Beckhove durchgeführt. Die vorliegende Arbeit beschreibt die Ergebnisse, die im Rahmen dieser Kooperation entstanden sind, und greift damit auf Material und Ergebnisse zurück, die nicht ausschließlich eigenständig generiert wurden. Die Ergebnisse wurden bereits im International Journal of Cancer publiziert (Horn, 2013).

3.1 Patienten

Untersucht wurde das Blut von Patienten mit der Diagnose eines invasiven Urothelkarzinoms (UC) und Kontrollpatienten mit einer benignen Prostatahyperplasie (BPH), die sich einer transurethralen Resektion der Prostata (TURP) unterzogen (s. Abb. 4). Die Patientenrekrutierung fand zwischen September 2010 und Dezember 2011 in der Urologischen Abteilung des Klinikums rechts der Isar, München statt. Die Karzinompatienten wurden gemäß ihrer Tumorstadien (s. 4. Ergebnisse, Tab. 5) mittels radikaler Zystektomie mit Lymphadenektomie, palliativer, neoadjuvanter (bei klinischem V.a. T3-Tumor oder Lymphknotenbefall cT3, cN+) oder adjuvanter (bei Tumorstadium \geq pT3 oder pN+) Chemotherapie mit Gemcitabine und Cisplatin (s. 2. Einleitung) (Schema s. Tab. 2) therapiert.

Gemcitabine, Cisplatin	28-Tages-Zyklus
Gemcitabine 1200mg/m ² KÖF	Tag 1, 8
Cisplatin 70mg/m ² KÖF	Tag 2

Tabelle 2:

Chemotherapie-Schema für Kombination aus Gemcitabine und Cisplatin; KÖF= Körperoberfläche

In einem Fall wurde wegen einer Niereninsuffizienz Paclitaxel statt Cisplatin verwendet (Witjes, 2014).

Bei allen Chemotherapie-Formen wurden initial zwei Zyklen durchlaufen, bei der neoadjuvanten Therapie wurde eine Fortführung der Therapie nur bei Ansprechen (CT-Kontrolle) und guter Verträglichkeit in Erwägung gezogen.

Die Kontrollpatienten erhielten alle eine TURP. Diese stellt eine operative Therapiemethode dar, die den Vergleich von Zystektomie-Patienten mit den Kontrollen ermöglicht. Desweiteren begünstigt das ähnliche Erkrankungsalter von UC-Patienten und BPH-Patienten die Vergleichbarkeit der beiden Gruppen.

Die Studie wurde von der zuständigen Ethikkommission genehmigt (Nr. 2835/10).

Einschlusskriterien waren Alter über 18 Jahre, Vorliegen eines muskelinvasiven Urothelkarzinoms (mind. Stadium pT2) bzw. einer therapiebedürftigen BPH, Hb >10mg/dl und eine unterschriebene Einverständniserklärung.

Ausschlusskriterien waren Immunsuppression, sei es erkrankungsbedingt oder medikamentös bedingt (außer der niedrig dosierten antiemetischen Steroid-Therapie während der Chemotherapie), sowie Zweitkarzinome von klinischer Bedeutung. Ein inzidentelles Prostata-Karzinom, das im OP-Resektat durch die Pathologie erstdiagnostiziert wurde, wurde beispielsweise als klinisch unbedeutend gewertet. Diese Definition beruht auf Autopsie-Studien, in denen festgestellt wurde, dass 80% der über 70-jährigen Männer ein latentes Prostatakarzinom haben (Breslow, 1977). Um also Probanden zu untersuchen, die die reale Population möglichst genau abbilden, wurden diese Patienten nicht ausgeschlossen.

Außerdem ist diese Definition sinnvoll, da auch bei der Kontrollgruppe in der TURP ein solches bislang unbemerktes, aber häufig gleichzeitig mit der BPH vorhandenes, Prostatakarzinom nicht sicher ausgeschlossen werden kann, da hier überwiegend Gewebe der zentralen Zone der Prostata gewonnen wird, die Karzinome entstehen allerdings überwiegend androgenabhängig in der peripheren Zone (Böcker, 2008).

3.2 Lymphozytenisolierung

Lymphozyten (T-Zellen, B-Zellen und NK-Zellen) gehören aufgrund ihres einzelnen runden Zellkerns zu den peripheral blood mononuclear cells (PBMCs). In diese Gruppe gehören außerdem Monozyten und dendritische Zellen. Zur Isolation von PBMCs aus peripherem Blut wird die Dichtegradienten-Zentrifugation angewendet. Hierbei wird das Separationsmedium, eine Mischung aus dem Polymer Ficoll (Saccharose-Epichlorhydrin-Copolymer) und dem jodhaltigen Metrizamid, mit dem Blut überschichtet und zentrifugiert.

Da das Biocoll-Separationsmedium eine geringere Dichte (1,077g/ml) als Erythrozyten hat, aber eine höhere als Lymphozyten und Monozyten, trennt es diese Blutfraktionen voneinander: Im Sediment finden sich kernlose Erythrozyten und auch polymorphkernige Granulozyten, in der Interphase auf dem Ficoll ist eine trübe Schicht mit PBMCs zu finden („buffy coat“), darüber das Plasma mit der geringsten Dichte (Abb.2)

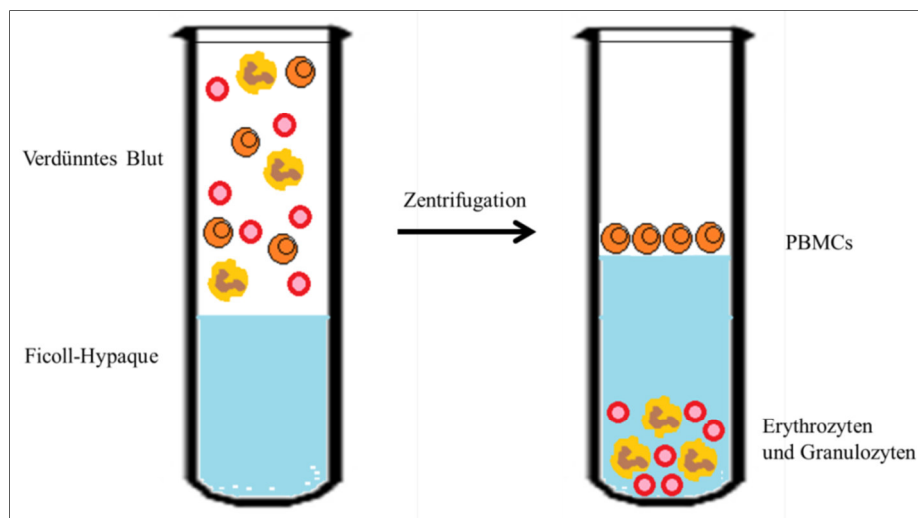


Abbildung 2

Dichtegradientenzentrifugation zur Isolierung der PBMCs (mononukleäre Zellen des peripheren Blutes); nach Janeway (Janeway, 2009)

Den Studienpatienten wurden jeweils zwischen 60 und 100ml venöses Blut abgenommen. Zur Antikoagulation wurden entweder 50 I.E. Heparin oder ca. 1,8mg EDTA (Ethylendiamintetraacetat) pro ml Blut verwendet.

Das Blut wurde maximal 10 Stunden nach Abnahme (Lagerung bei Raumtemperatur) wie folgt verarbeitet:

In 50ml-Röhrchen wurden je 15ml RPMI 1640-Medium (Roswell Park Memorial Institute Medium) mit je 20ml Blut vermischt. Mit diesem Gemisch wurden je 15ml Ficoll langsam überschichtet, sodass das Blut-Medium-Gemisch vollständig getrennt auf dem Ficoll schwimmt. Um nun die einzelnen Bestandteile des Blutes nach ihrer Dichte aufzutrennen, wurde bei 800g und 25°C 20 Minuten zentrifugiert.

Nun wurde die Interphase mit einer Pipette abgesaugt. Um die Zellen weitestgehend von Plasma und vor allem dem zellschädigenden Ficoll zu befreien erfolgten zwei weitere Waschstschritte mit RPMI und einer jeweils zehnminütigen Zentrifugation bei 320g und 25°C. Vor dem letzten Waschen wurden die Zellen alle in ein Röhrchen zusammengeführt und die Zellzahl mittels Neubauerzählkammer und Färbung mit Türk'scher Lösung ermittelt. Dazu wurden 10 µl der

Zellsuspension entnommen und mit 40 μl Türk'scher Lösung gemischt (1:5-Verdünnung). Die Neubauer Zählkammer fasst 0,1 μl pro Zählquadrat. Daher wurde der aus der Zählung in vier Quadraten errechnete Mittelwert der Zellzahl mit 5 und 10^4 multipliziert, um die Zellzahl pro ml zu erhalten. Die Gesamtzellzahl wurde nun mittels Multiplikation mit der gesamten Zellsuspensionsmenge in ml bestimmt.

Anschließend wurde das Zellpellet, das sich bei der letzten Zentrifugation abgesetzt hat, in einer entsprechenden Menge Einfriermedium resuspendiert, so dass dann jeweils 10^7 Zellen pro ml in 1-ml-Einheiten eingefroren wurden. Das Einfriermedium setzt sich aus Humanserum AB und DMSO (Dimethylsulfoxid) als Frostschutz, in einem Verhältnis von 8:1 zusammen.

Die Zellröhrchen wurden zunächst bei -80°C in einem speziellen Gefrierbehälter mit einer Abkühlungsrate von -1°C pro Minute (Mr. Frosty) eingefroren; nach ca. 24 h in flüssigen Stickstoff umgelagert und dort bis zur Weiterverarbeitung aufbewahrt.

3.3 Durchflusszytometrie

Um unterschiedliche Zellpopulationen innerhalb der PBMCs voneinander zu unterscheiden, macht man sich das Prinzip der Durchflusszytometrie zunutze: Hier werden Zellen anhand ihrer Größe und intrazellulären Granula unterschieden. Die Zellsuspension durchläuft eine Düse, wodurch ein feiner Flüssigkeitsstrom entsteht, der sich am Ende in Tröpfchen aufteilt, welche jeweils eine Zelle enthalten. Hier passieren die Flüssigkeitstropfen einen Laserstrahl. Beim Durchtritt der Zelle durch den Lichtstrahl wird das Licht je nach Zelleigenschaften unterschiedlich stark gestreut. Das Streulicht in Richtung des Strahls (forward scatter) hängt vom Volumen der Zelle ab, das Streulicht senkrecht zum Lichtstrahl (sideward scatter) von ihrer Granularität. Das Streulicht wird von Detektoren aufgenommen. Mit dieser Information, die zu einem Computer weitergeleitet wird, können die unterschiedlichen Zellpopulationen erkannt und quantifiziert werden. Auf ähnliche Art und Weise können Zelltypen mit Hilfe von Immunfluoreszenzmarkierung noch weiter unterteilt werden. Die Zellen werden mit Antikörpern gegen (mehrere) bestimmte bekannte Oberflächenmerkmale markiert. Diese Antikörper tragen Chromophore, die durch den Laserstrahl zur Lichtemission angeregt werden. Diese wird durch Linsen gesammelt und von Filtern in verschiedene Wellenlängenbereiche aufgespalten und zu Detektoren abgelenkt, welche die unterschiedliche Fluoreszenz quantifizieren. Die Fluoreszenz ist proportional zur Anzahl der gebundenen Antikörper und damit zur Anzahl der korrespondierenden Oberflächenmerkmale sowie zur Anzahl der Zellen, die diese Merkmale tragen. (s. Abb. 3)

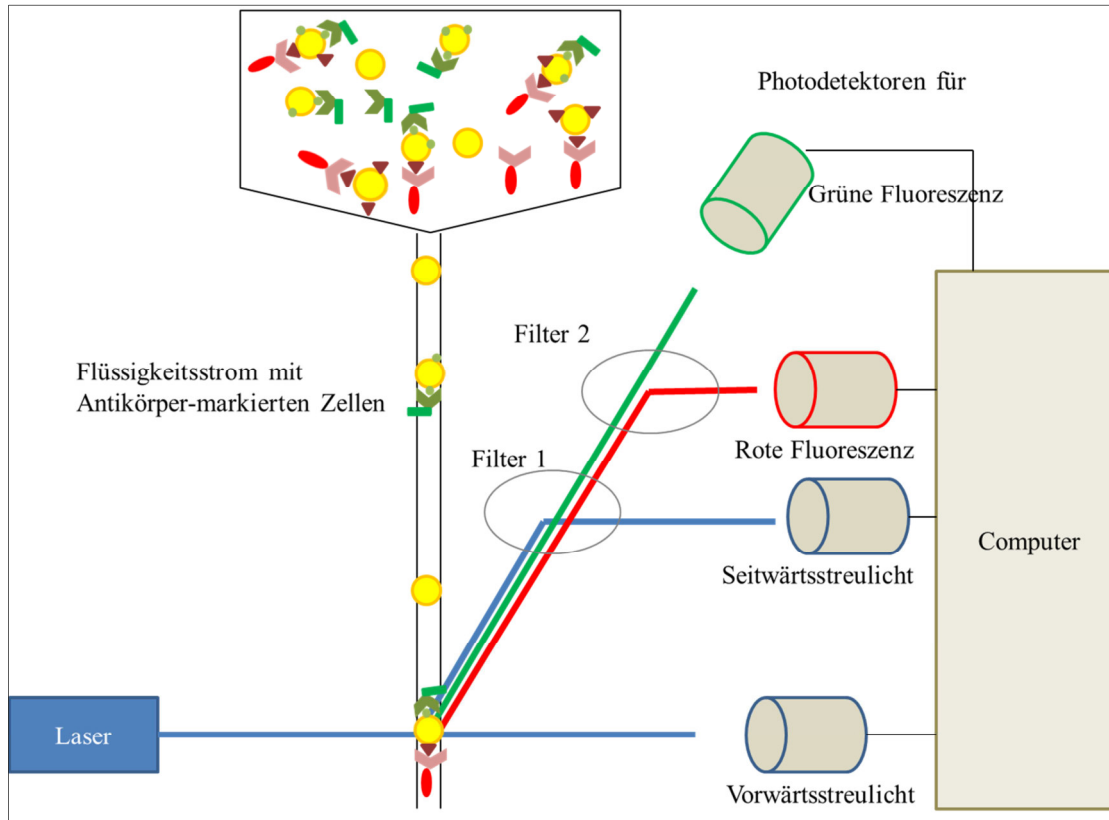


Abbildung 3
Prinzip der Durchflusszytometrie; nach Janeway (Janeway, 2009)

Da sich die Wellenlängenbereiche der Fluoreszenz von mehreren Chromophoren der Antikörper überschneiden können, muss bei jedem Patienten eine Kompensation mitgeführt werden. Hier werden die Zellen nur mit einem Antikörper markiert. Die hierbei gemessenen Werte in den anderen Wellenlängenbereichen entsprechen der Überschneidung und müssen dann von der tatsächlichen Messung jeweils abgezogen werden.

Für die Identifikation der unterschiedlichen Zellgruppen wurden für diese spezifische Oberflächenmoleküle markiert.

Die Funktion und das Vorkommen dieser Oberflächenmoleküle sowie die Einteilung der Zellpopulationen an Hand dieser sind aus folgender Tabelle (Tab. 3) ersichtlich.

Zellmerkmal	Funktion/Vorkommen	Zelltyp
CD3 ⁺	T-Zell-Rezeptor, Zelloberfläche	Alle T-Zellen
CD4 ⁺	Protein zur Bindung von MHC II	T-Helfer-Zellen
CD8 ⁺	Protein zur Bindung von MHC I	Zytotoxische T-Zellen
CD25 ⁺	Alpha-Kette des IL2-Rezeptors, Zelloberfläche	Alle aktivierten T-Zellen, bei Treg besonders hoch
CD127 ⁺	Alpha-Kette des IL7-Rezeptors, Zelloberfläche	hoch bei T-Effektorzellen, niedrig bei Treg
FOXP3 ⁺	Transskriptionsfaktor, intrazellulär	Treg
CD3 ⁺ , CD4 ⁺ , CD25 ⁺ , CD127 ^{low} , FOXP3 ⁺		Treg
CD3 ⁺ , CD25 ⁺ , FOXP3 ⁻		Aktivierte T-Effektor-Zellen

Tabelle 3

Zellmerkmale und ihre Verteilung auf unterschiedlichen Zellpopulationen (Janeway, 2009)

Für die Markierung dieser Moleküle wurden folgende Antikörper verwendet: Anti-CD3-PE 1:50 (*BD Biosciences*, Heidelberg), Anti-CD4-PerCP-Cy5.5 1:50 (*ebioscience*, Frankfurt), Anti-CD25-APC-Cy7 1:20 (*ebioscience*), Anti-CD127-FITC 1:10 (*BD Biosciences*) und Anti-FOXP3-APC (clone PCH101, 1:10; *ebioscience*).

Um lebende von toten Zellen zu unterscheiden, wurde der Fluoreszenzfarbstoff Pacific Orange (*Live/Dead® Fixable Yellow Dead Cell Stain Kit (Invitrogen, Darmstadt)*) verwendet, das nur in tote Zellen diffundiert, deren Zellmembranbarriere nicht mehr intakt ist, und diese deutlich stärker färbt als die lebenden.

Für die Kompensation wurden jeweils dieselben markierten Antikörper verwendet außer bei Anti-FOXP3. Hier wurde das verwendete Chromophor APC an einen CD4-Antikörper gekoppelt, da bei einem geringen Anteil FOXP3⁺ Zellen ein schwaches Signal von FOXP3-APC zu erwarten war.

Die Zellen wurden über Nacht zytokinfrei in X-VIVO 20 (*Lonza*, Basel) in Kultur genommen.

Die Zellen aus der Kultur wurden mit PBS gewaschen, in 1ml PBS aufgenommen und auf 10⁶/ml eingestellt (s. oben). Nun wurde 1ml der Zellsuspension mit 1ml Dead/Live Cell-Kit (Pacific Orange) gemischt und 30 Min bei Raumtemperatur unter Lichtschutz stehen gelassen. Um die störende Bindung von Antikörpern an unspezifische Bindungsstellen zu verhindern, wurden diese mit polyvalentem humanen IgG geblockt. Anschließend wurde das Antikörper-Gemisch zugegeben und für 20 Minuten auf Eis gefärbt. Nach einem Waschschrift wurde bei den

Proben die intrazelluläre Färbung von FOXP3 durchgeführt. Hierzu wurde die Zelle mit einem Permeabilisierungspuffer reversibel durchlässig gemacht und mittels eines Fixierungspuffers ihr Zytoskelett stabilisiert (*Foxp3 Fixation/Permeabilization Concentrate and Diluent, ebioscience*). Die Proben wurden nun mit Anti-FoxP3-APC 30 Min auf Eis inkubiert. Dann wurde noch einmal gewaschen, zentrifugiert und in 200 µl FACS-Puffer (fetales Kälberserum) resuspendiert. Nun erfolgte die Messung nach oben beschriebener Methode. Es wurde ein FACS Canto II-Gerät (*BD Biosciences*) und die *FloJo*® Software verwendet. Pro Fall wurden mindestens 10^5 Zähl-Ereignisse (Zellen) gemessen. Die Proben eines Patienten vor und nach Therapie wurden nach Möglichkeit gemeinsam untersucht.

3.4 Zellkultur und Separation der Zellpopulationen

Die isolierten PBMCs werden direkt aus dem Stickstoff auf Eis genommen und im 37°C warmen Wasserbad zügig aufgetaut, am Ende wird warmes X-Vivo-Medium tröpfchenweise zugegeben, um den osmotischen DMSO-Stress (DMSO aus Einfriermedium) für die Zellen so gering wie möglich zu halten. Die Zellen werden komplett in X-Vivo aufgenommen und zentrifugiert, der Überstand, der auch das DMSO enthält, wird abpipettiert. Die Zellen werden wiederum in 15ml X-Vivo resuspendiert und kultiviert. Nach ca. einer Stunde können die adhären von den nicht adhären Zellen getrennt werden. Auf der beschichteten Platte adhären v.a. Monozyten, die Vorläuferzellen der DC. Das Medium mit den nicht adhären PBMCs wird abgenommen und zentrifugiert. Die adhären Zellen werden mit 12ml eines speziellen Mediums versehen, das obligate Wachstumsfaktoren für DCs enthält. Es setzt sich aus 50ml X-Vivo (*Lonza*), 100µl GM-CSF (280000 U/ml) und 200 µl IL-4 (5000 U/ml) zusammen. Die nicht adhären PBMCs werden zur Gewinnung der TC (T-Zellen) in 12ml eines anderen für TC speziell zusammengesetzten Mediums aufgenommen, das aus 50ml X-Vivo mit 50 µl IL-2 (10000 U/ml) und 12 µl IL-4 (5000 U/ml) als Wachstumsfaktoren besteht.

Beide Zellpopulationen werden für vier bis sieben Tage in Kultur genommen, bei den DCs wird deren Reife mikroskopisch kontrolliert. Diese ist an Kernkonfiguration (heller häufig gewundener Kern) und Bildung verzweigter Zytoplasmaausläufer erkennbar (Lüllmann-Rauch, 2006).

Da in der TC-Kultur immer noch alle nicht adhären PBMCs enthalten sind, mussten nun die TCs noch aufgereinigt werden. Dies erfolgte mittels magnetic cell sorting (MACS).

Hier werden paramagnetische Teilchen (beads) an Antikörper gegen bestimmte Oberflächenantigene gebunden. Diese Antikörper werden zu einem Zellgemisch in einer Säule

mit Stahlwolle gegeben, wo sie die entsprechenden Zellen binden. Bei Anlegen eines Magnetfelds an die Säule werden die beads und damit die gebundenen Zellen angezogen (positive Selektion) und von den unmarkierten Zellen (negative Selektion) getrennt.

Hier wurden die TC durch Dynabeads® Untouched™ Human T Cells, (in PBS mit 0.5% bovine serum albumin (BSA) und 0.02% sodium azide) (*Invitrogen*) negativ selektiert. Dies ist ein Antikörper-Gemisch aus Antikörpern gegen zahlreiche nicht-adhärenente Zellen außer T-Zellen (Maus-IgG-Antikörper gegen CD14, CD16 (spezifisch für CD16a und CD16b), CD19, CD36, CD56, CDw123 und CD235a (Glycophorin A)). Pro 10^7 Zellen wurden 100µl Beads mit 5ml RPMI zweimal gewaschen. Diese beads wurden pro Probe in 500 µl MACS-Puffer (50ml PBS, 2,7ml EDTA, 250µl AB-Serum) aufgenommen. Die nicht adhärenenten PBMCs der TC-Platten wurden in 200 – 300µl MACS-Puffer suspendiert und jeweils mit 20µl des Antikörpergemisches versehen. Nach erneuter Zentrifugation und Resuspension wurden die magnetic beads dazugegeben. Zweimal wurde für zwei bis drei Minuten das Magnetfeld angelegt. Die negativ selektierten TC wurden zentrifugiert, in 1-4ml X-Vivo gelöst, gezählt und auf 5×10^5 /ml eingestellt.

Nach demselben Prinzip wurden die DCs vor Verwendung für die Tests weiter aufgereinigt. 100µl Beads (Dynabeads® Untouched™ Human Monocytes) pro Probe wurden zweimal in PBS gewaschen und in 300 µl MACS-Puffer unter Rotation an die folgenden Antikörper gekoppelt: Maus-IgG Antikörper gegen CD3, CD19, CD56. Die Beads wurden in 0,5ml MACS-Puffer aufgenommen.

Die DCs wurden zentrifugiert (1400rpm, 10', RT) und in 0,5ml X-Vivo aufgenommen. Zellen und beads wurden zusammengeführt und 20 Minuten bei 4°C inkubiert. Die Proben wurden mit X-Vivo auf 5-6ml Volumen aufgefüllt und dem Magnetfeld ausgesetzt. Die negativ selektierten DCs aus dem Überstand wurden nach erneuter Zentrifugation des Überstands in 1-2ml X-Vivo aufgenommen, gezählt und auf $2,5 \times 10^5$ /ml eingestellt.

Sowohl die DC als auch die TC wurden vor der Durchführung der Versuche 12 Stunden zytokinfrei kultiviert, um eine unspezifische Aktivierung zu vermeiden.

Alle Inkubationsschritte fanden bei 37 °C unter 5% CO₂ statt.

3.4.1 Treg-Selektion und -Depletion:

Für Zellkultur-Versuche wurden Treg als CD4⁺ CD25⁺ T-Zellen definiert, da eine Auftrennung nach FOXP3-Positivität an lebenden Zellen nicht möglich ist. Die Treg-freie T-Zellpopulation

besteht somit aus allen CD4⁻ T-Zellen (alle CD8⁺ T-Zellen) sowie CD4⁺, aber CD25⁻ T-Zellen. Diese Population wird als Tcon (konventionelle T-Zellen) bezeichnet.

Es wurden je 10⁷ Zellen aus der zytokinfreien T-Zell-Kultur in 90µl MACS-Puffer mit 10µl einer Mischung aus biotinylierten Antikörpern gegen mehrere Immunpopulationen außer CD4⁺ T-Zellen (CD8, CD14, CD15, CD16, CD19, CD36, CD56, CD123, TCRγ/δ und CD235a (Glycophrin A)) (*CD4 CD25 Regulatory T cell Isolation Kit; Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach*) bei 4°C inkubiert. Dazu wurden 20µl Anti-Biotin-Beads gegeben. Durch Anlegen des Magnetfelds wurden nun alle CD4⁺ Zellen negativ selektiert. Diese Zellen wurden erneut in 90µl MACS-Puffer aufgenommen und mit 10µl CD25-gekoppelten Beads versehen. Erneut folgte eine 15-minütige Inkubation. Die CD4⁺ CD25⁺ Treg waren nun positiv selektiert. Aus den CD4⁻ Zellen (gebundene Zellen aus dem ersten Schritt) und den CD4⁺ CD25⁻ Zellen (Durchfluss aus dem zweiten Schritt) erhielt man die Tcon.

3.5 ELISpot (Enzyme linked Immunospot Technique)

Der ELISpot ist eine Variante des ELISA-Tests zur Quantifizierung von T-Zell-Reaktionen.

Antigenpräsentierende Zellen werden mit einem Tumorantigen gepulst und aktivieren somit für dieses Antigen spezifische T-Zellen. Um aktivierte T-Zellen zu erkennen, werden Zytokine, die bei deren Aktivierung ausgeschüttet werden, sichtbar gemacht. Dazu werden zunächst ELISpot-Platten mit einem Antikörper gegen dieses Zytokin (z.B. Interferon γ) beschichtet. Die gepulsten DCs und die T-Zellen werden auf die Platten gegeben. Bei Aktivierung der T-Zellen wird gebildetes IFNγ an die Antikörper gebunden, das somit auch nach dem Abwaschen der Zellen auf der Platte bleibt. Es kann mittels Zugabe eines weiteren biotinylierten Antikörpers gegen IFNγ und dessen Farb-Detektion sichtbar gemacht werden; es entsteht jeweils ein farbiger Punkt um jede aktivierte T-Zelle (Abb. 4 und 5). Dies geschieht durch Zugabe eines an Streptavidin gekoppelten Enzyms, das ein ebenfalls zugefügtes Substrat in ein farbiges Produkt umsetzt. Streptavidin bindet mit hoher Affinität an Biotin und somit an das Antikörper-markierte IFN γ. Die Anzahl dieser gezählten Punkte kann nun in Relation zur Anzahl der gesamten zugegebenen T-Zellen die Frequenz von T-Zellen, die auf ein bestimmtes Antigen reagieren, messen.

Mit dem ELISpot-Test wurde eine äußerst sensitive Methode zur Charakterisierung der T-Zell-Aktivität gewählt (Schmittel, 1997). Dieses Verfahren ist mittlerweile Gold-Standard in der Tuberkulose-Diagnostik und hat den Tuberkulin-Hauttest nach Mendel-Mantoux aufgrund zuverlässigerer Ergebnisse abgelöst (Wagstaff, 2006). Auch in der Entwicklung von HIV-

Impfungen hat der ELISpot-Test seinen Stellenwert: hier misst er in Phase 2/3-Studien die gebildete zelluläre Immunität auf eine Impfung hin (Streeck, 2009).

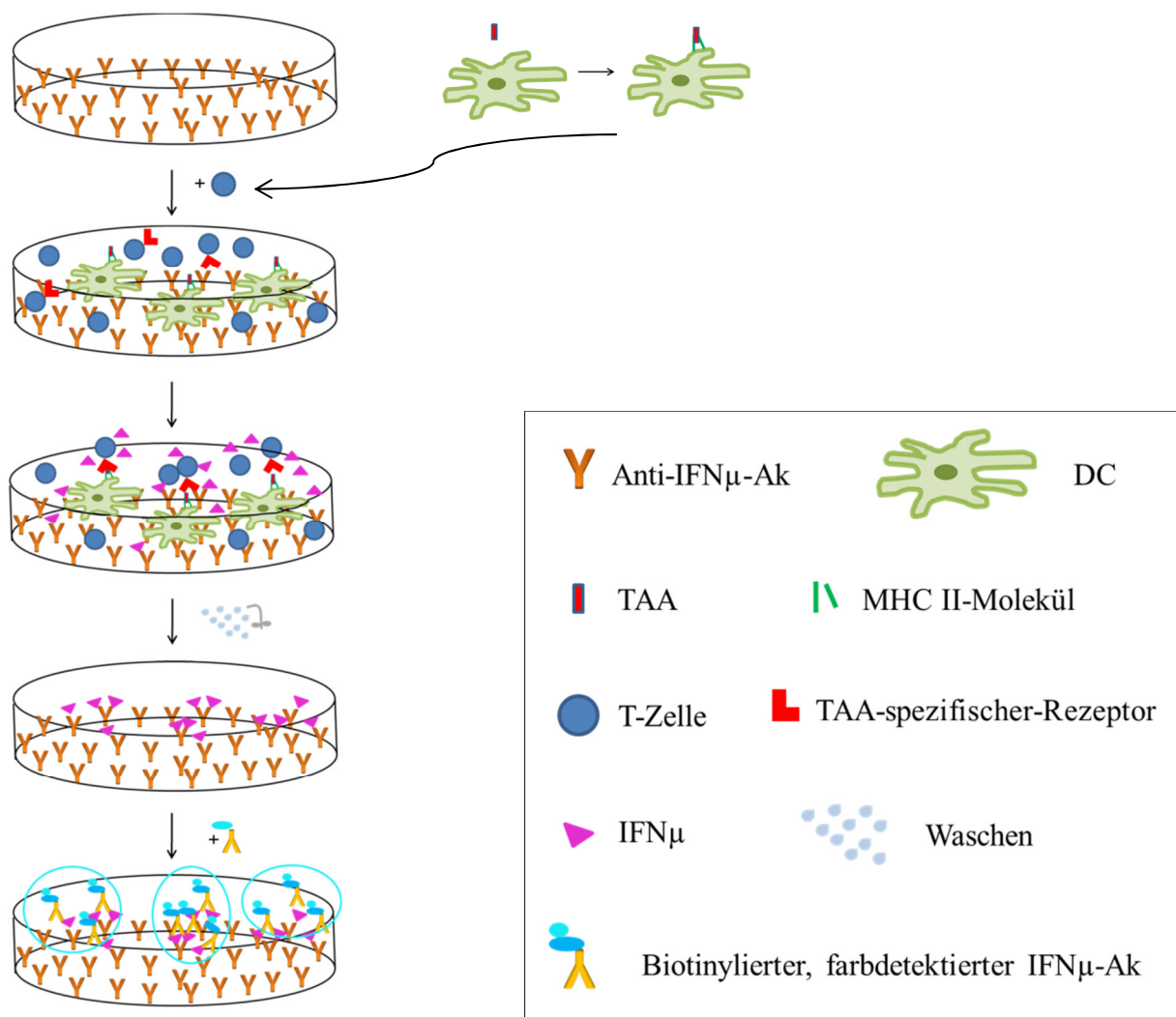


Abbildung 4
Prinzip des ELISpot (nach Janeway)

3.5.1 Antigene

Untersucht wurden die im UC bekanntermaßen vorkommende Tumorantigene p53, Nyeso, Survivin, MAGE-A4, MUC 20, MUC 100, Heparanase 1, HER 2, EGFR und Telomerase sowie IgG und ein Staphylokokken-Toxin als Kontroll-Antigene.

Als Antigene wurden hier Synthetic long peptides (SLP) verwendet, welche die im Folgenden erklärten Vorteile haben:

CD8⁺ T-Zellen erkennen Peptide, die auf MHC-I-Proteinen präsentiert werden. Diese Peptide sind normalerweise Aminosäure-Nonamere. CD4⁺ T-Zellen erkennen allerdings nur Peptide, die von MHC-II-Proteinen auf antigenpräsentierenden Zellen präsentiert werden. Dies sind Peptide

aus 10-12 Aminosäuren. (Rassow, 2006) Um sowohl CD8⁺ als auch CD4⁺ T-Zellen zu aktivieren, wurden SLP mit einer Länge von 40 bis 48 Aminosäuren verwendet, die intrazellulär in einer Weise prozessiert werden, dass sie sowohl über MHC-I- als auch über MHC-II- Moleküle präsentiert werden können (Bonertz, 2009).

Außerdem hat jedes Individuum eine unterschiedliche Ausprägung der MHC- bzw. HLA-Moleküle. Dies führt auch zu einer unterschiedlichen Affinität zu gewissen Antigenen. Da die hier untersuchte Patientenkohorte nicht HLA-selektiert ist, ist es notwendig Antigene zu wählen, die nicht HLA-Subtypen-spezifisch sind.

Die hier verwendeten SLPs sind bestimmte Abschnitte von bekanntermaßen im UC auftretenden, oben erwähnten und näher beschriebenen, Tumorantigenen. Von MUC 1 wurden zwei verschiedene Polypeptide verwendet: eines mit der Signalsequenz (MUC100), ein anderes mit der Tandem-repeat-Region (MUC20). Die Sequenzen (s. Tab. 4) enthalten alle mindestens ein Nonamer, das laut der SYFPEITHI-Datenbank an HLA-A*02 bindet und auch viele andere Sequenzen enthält, die von vielen verschiedenen HLA-Typen präsentiert werden. HLA-A*02 ist in der europäischen Bevölkerung mit ca. 50% die häufigste MHC-I-Ausprägung (González-Galarza, 2014). Alle Peptide wurden aus der DKFZ-internen (Deutsches Krebsforschungszentrum) Peptidsyntheseeinheit bezogen.

Als Negativkontrolle wurde ein SLP von IgG verwendet. Als Positivkontrolle für das allgemeine Ansprechen der T-Zellen wurde das Superantigen, Enterotoxin B aus Staphylokokken (*Sigma*, 2µg/100µl), verwendet. Als weitere Positivkontrolle diente Tetanustoxin (*Merck*, 2µg/100µl), zum Vergleich der Intensität der Immunantwort auf ein Tumorantigen mit derjenigen auf ein bakterielles Antigen. Als weitere Kontrollen werden Ansätze mit jeweils nur DCs oder T-Zellen (TCs) durchgeführt, die keine Reaktion zeigen durften.

TAA	Peptid-Position im Protein	Peptidsequenz
p53	118–167	TAKSVTCTYSPALNKMFCQLAKTCP VQLWVDSTPPPGRVVRAMAIYKQSQ
Survivin	93–142	FEELTLGEFLKLDREERAKNKIAKETN NKKKEFEETAKKVRRAIEQLAAMD
MAGE-A4	256-301	LEYRQVPGSNPARYEFLWGPRAL AETSYVKVLEHVVRVNARVRIAY
MUC 1 tandem repeat (MUC 20)	137–157	(GVTSAPDTRPAPGSTAPPAH) x 5
MUC 1 Signalsequenz (MUC 100)	1–100	MTPGTQSPFFLLLLLTVLTVVTGSGH ASSTPGGEKETSATQRSSVPSSTEK
Heparanase 1	1–50	MLLRSKPALPPPLMLLLGPLGPLSP GALPRPAQAQDVVDLDFFTQEPLH

TAA	Peptid-Position im Protein	Peptidsequenz
HER2/neu	351–384	REVRAVTSANIGEFAGCKKIFGSLAFL PESFDGD
EGFR	479–528	KLFGTSGQKTKIISNRGENSCKATGQ VCHALCSPEGCWGPEPRDCVSCRN
Telomerase	958–1007	LTFNRGFKAGRNMRRKLFGLRLKC HSLFLDLQVNSLQTVCTNIYKILL
Negativkontrolle		
IgG	40-89	SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYS LSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKP

Tabelle 4:
Antigene und Synthetic long peptides mit ihren Sequenzen

3.5.2 Zellen

Die Zellen für den ELISpot wurden wie oben beschrieben kultiviert und separiert. Um den Einfluss von Treg auf die Aktivierung von T-Zellen abzuschätzen, wurden die Ansätze, wo immer möglich, mit zwei unterschiedlichen T-Zell-Populationen durchgeführt, eine mit (Gesamt-TC) und eine ohne Treg (Tcon); Treg-Depletion s. oben. (s. Abb. 4)

3.5.3 Durchführung der ELISpot-Tests

Für den ELISpot -Test wurden zunächst die Platten beschichtet. Dazu wurde auf jede Platte jeweils 10ml PBS und 100µl Anti-IFN γ -Antikörper (1µg/Well) gegeben und bei 4°C über Nacht inkubiert.

Die Platten wurden dreimal mit Waschpuffer (PBS, 0,25% Tween; 150µl/Well) und zweimal mit PBS (150µl/Well) gewaschen. Mit RPMI/10% AB-Serum wurden unspezifische Bindungsstellen geblockt. Die Platten wurden mindestens eine Stunde bei 37°C inkubiert. Die fünf Waschschritte wurden noch einmal wiederholt und letztendlich 20µl X-Vivo pro Well zugegeben.

Anschließend wurden die DCs für den ELISpot gepulst. Pro Peptid und Patient wurden drei Wells angesetzt, für die Negativkontrollen – wenn möglich - jeweils sechs (Moodie, 2010). Pro Well wurden 10⁴ DC in 100µl XVIVO und 20µg Peptid (SLP) benötigt. Die beladenen DC wurden in die ELISpot-Platten überführt und 14 Stunden inkubiert.

Pro Well wurden 100µl TC (5x10⁴ Zellen) (Tcon oder Gesamt-TC) dazu pipettiert und 40 h bei 37°C inkubiert. Es entsteht ein Zellverhältnis zwischen DC und TC von 1:5.

Nach der Inkubation wurde der Überstand der Platte entfernt und die Platte dreimal mit Waschpuffer, einmal mit destilliertem Wasser, zweimal erneut mit Waschpuffer und noch zweimal mit PBS gewaschen. Nun wurden 100µl des biotinylierten IFN γ -Antikörpers (1mg/ml

PBS) pro Well zugegeben und zwei Stunden bei 37°C inkubiert. Dreimal wurde mit Waschpuffer, zweimal mit PBS gewaschen, bevor 100µl Streptavidin-AP (Alkaline Phosphatase) (1mg/ml PBS) pro Well zugesetzt wurden. Nach 1,5 Stunden Inkubation bei 37°C und den gleichen Waschschritten wie im vorherigen Schritt wurde jeweils 100µl Substrat hinzugefügt (Enzym-gekoppeltes Detektions-Antikörper-System von *Mabtech*). Die Inkubation erfolgte im Dunkeln und wurde nach 1,3,5 und 10 Minuten kontrolliert, sie kann bis zu einer Stunde dauern. Die Reaktion wurde dann mittels Waschen mit destilliertem Wasser beendet. Die Punkte konnten nun an einem automatisierten ELISpot-Reader gezählt werden, wobei bei allen Wells eine optische Qualitätskontrolle durchgeführt wurde.

Auch im ELISpot wurden die Proben eines Patienten vor und nach Therapie nach Möglichkeit zusammen untersucht.

Eine Messung wurde als positive Reaktion auf ein TAA gewertet, wenn sie signifikant höhere Punkte-Anzahlen (Spot-Count) ergab als die der Reaktion auf IgG ($p \leq 0,05$). Für die Ermittlung der p-Werte wurde der Permutationsalgorithmus von Westfall und Young verwendet, welche sich für eine hier vorliegende multiple Testung (mehrere Messungen innerhalb eines Patienten) eignet und sich nach Moodie et al. bei der ELISpot-Auswertung als am genauesten erwiesen hat (Moodie, 2010).

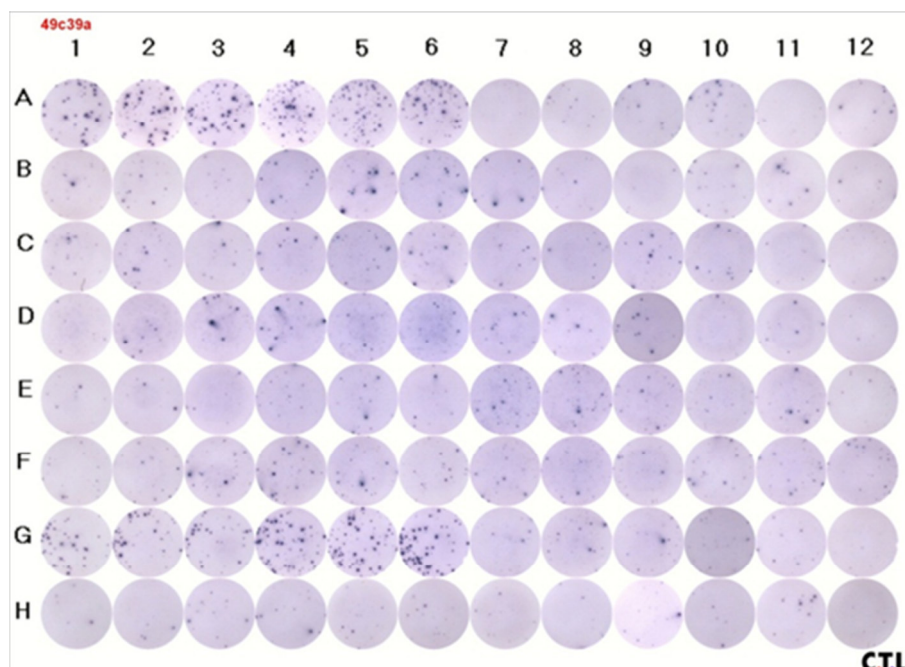


Abbildung 5
sichtbare Farbpunkte als Ergebnis des ELISpot-Tests (Spot-Count)

Spalten 1-3 und 7-9: gesamte T-Zell-Population

Spalten 4-6 und 10-12: T-Zellen ohne Treg

Pro Antigen sechs Wells, je drei mit und drei ohne Treg-Depletion; außer bei IgG, hier zwölf

3.6 Spezifitäts-Assay für regulatorische T-Zellen (Treg-Spezifitäts-Assay)

Um zu überprüfen, ob Tumorantigen-spezifische Treg vorliegen wird beim Treg-Spezifitäts-Assay folgendes hypothetisches Prinzip zugrunde gelegt (Abb. 6): eine regulatorische T-Zelle, die einen Rezeptor für ein tumorspezifisches Antigen besitzt, wird beim Kontakt zu diesem Antigen aktiviert, sie proliferiert und bildet ein immunsuppressives Milieu, z.B. durch IL10- oder TGF- β -Sekretion. Dieses immunsuppressive Milieu bewirkt, dass – durch CD3-Antikörper unspezifisch - aktivierte Effektor-T-Zellen nicht weiter proliferieren. Werden also TAA-spezifisch aktivierte Treg mit aktivierten Tcon kokultiviert, bleibt eine Proliferation der Tcon aus. Sind die Treg durch das jeweilige TAA nicht aktiviert worden und werden dann mit aktivierten Tcon kokultiviert, werden die Tcon ungehemmt proliferieren. Der Grad der Proliferation kann mittels radioaktiver Nukleotide sichtbar gemacht werden und zeigt im Vergleich zur Negativkontrolle an, ob spezifische Treg vorliegen.

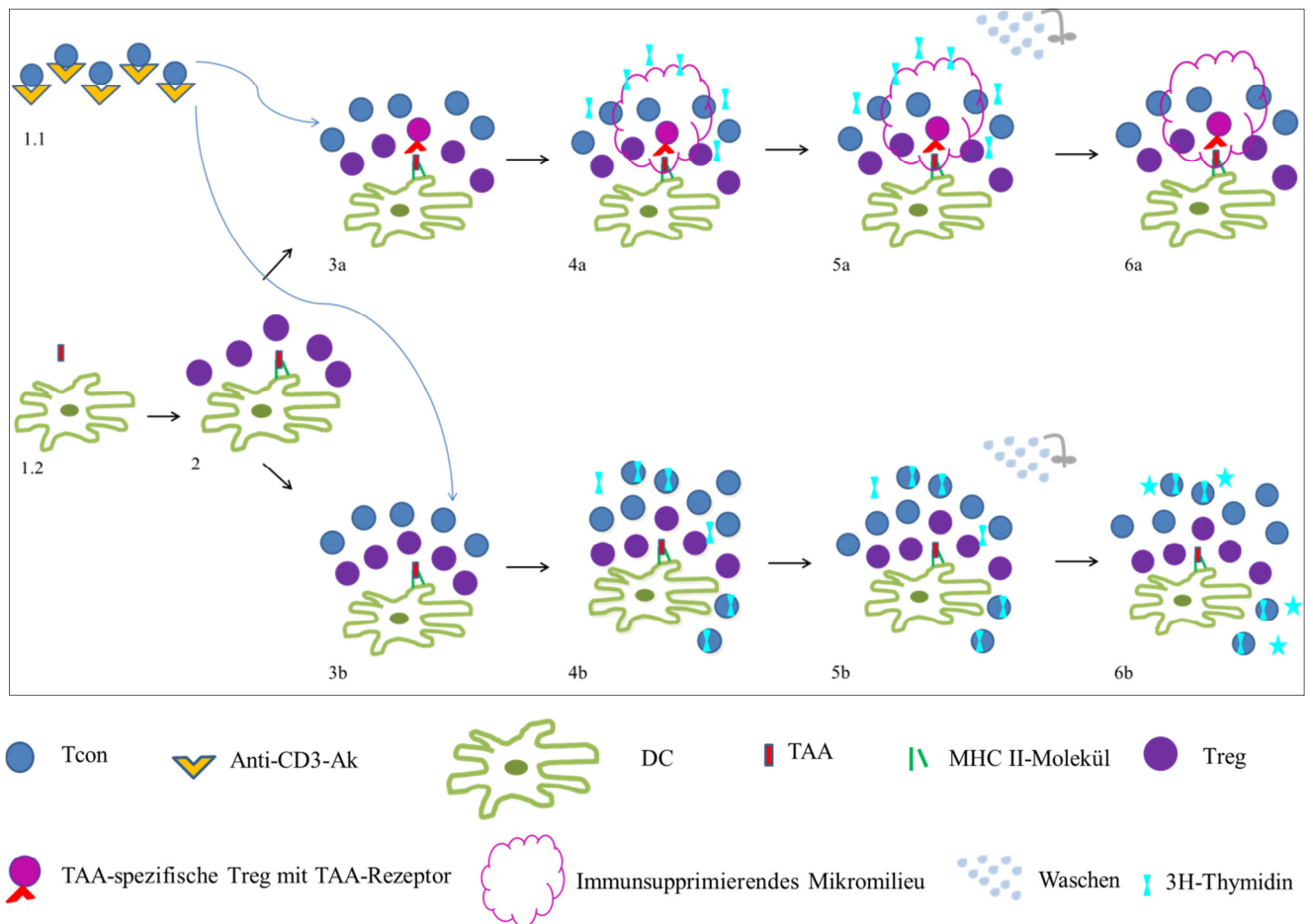


Abbildung 6

Prinzip des Treg-Spezifitäts-Assays

1.1 unspezifische Aktivierung von Tcon (Effektor-T-Zellen) durch Anti-CD3-Antikörper

1.2 Pulsen von DC mit TAA-Peptid (SLP)

2 Zugabe von Treg zu gepulsten DC

a) Aktivierung TAA-spezifischer Treg durch TAA

3a Zugabe von Tcon (Effektorzellen)

4a Zugabe von radioaktiv markiertem Thymidin, immunsupprimierendes Mikromilieu verhindert Proliferation der Tcon

5a Radioaktiv markiertes Thymidin wird nicht für die DNA-Synthese benötigt und abgewaschen

6a bei Vorliegen TAA-spezifischer Treg wird kein Proliferations-Signal gemessen

b) Keine Aktivierung der Treg, laut Hypothese da diese nicht TAA-spezifisch sind

3b Zugabe von Tcon (Effektor-T-Zellen)

4b Ungehemmte Proliferation der Tcon mit Einbau radioaktiv markierten Thymidins in DNA

5b überschüssiges Thymidin wird abgewaschen, intrazellulär verwendetes Thymidin verbleibt

6b bei Fehlen TAA-spezifischer Treg wird ein unterschiedlich starkes Proliferations-Signal gemessen

Zunächst wurden bereits über Nacht gepulste DCs (wie bei ELISpot) auf eine unbeschichtete 96 Well-Platte gegeben, wobei 5×10^3 DCs pro Well eingesetzt wurden. Die DCs wurden mit denselben Antigenpeptiden gepulst wie beim ELISpot. Auch hier diente IgG als Negativkontrolle. Es wurden für jedes Antigen drei Wells angesetzt.

Gleichzeitig wurde eine weitere 48 Well-Platte mit Anti-CD3-Antikörpern (0.5µg/ml) für die Aktivierung der Effektor-T-Zellen (Tcon) beschichtet. (3Wells/Patient).

Mittels magnetic cell sorting wurden die Treg aus der gesamten zytokinfreien T-Zell-Kultur, wie oben beschrieben, isoliert.

$2,5 \times 10^4$ Treg (50µl) wurden pro Well (5×10^3 DCs) auf die DC-Platte gegeben und weitere 18 Stunden inkubiert.

Die Anti CD3-Platte wurde mit PBS gewaschen, damit nicht gebundene Antikörper entfernt werden. 10^6 Tcon wurden pro Well darauf gegeben und wiederum über Nacht inkubiert. Nach 14 Stunden sind diese aktiviert. Die Tcon (25000 (80µl) pro Well) wurden zu dem DC/Treg-Ansatz gegeben und für 72 h inkubiert.

Nach 72 h wurde ^3H -Thymidin (1µCi/Well) zugegeben, um eine Zellproliferation durch den Einbau von radioaktiv markiertem Thymidin in die synthetisierte DNA sichtbar zu machen. Es wurde für weitere 24 Stunden inkubiert.

Um die Reaktion zu beenden, wurde die Platte eingefroren und anschließend die Proliferation gemessen. Nicht gebundenes ^3H -Thymidin wurde abgewaschen, das in der DNA gebundene gibt ein radioaktives Signal ab, welches in einem Flüssigszintillationszähler (1450 MicroBeta; *Perkin Elmer*; Rodgau) gemessen wurde und die Proliferation der T-Effektor-Zellen quantifiziert. Diese korreliert negativ mit der stattgefundenen Aktivierung von Treg.

Verglichen wurden die Ergebnisse nach Aktivierung durch jeweils ein bestimmtes TAA mit der Messung nach Aktivierung durch die Negativkontrolle IgG. Ausgewertet wurde mittels eines ungepaarten Student's t-Tests ($p \leq 0,05$). TAA-Spezifische Treg lagen also vor, wenn dieses TAA im Endeffekt signifikant weniger Proliferation der Tcon hervorgerufen hat als IgG.

3.7 Statistik

Die Verteilung der Messwerte werden bei nicht-normalverteilten Werten jeweils als Median und Interquartilsabstand angegeben, bei normalverteilten dagegen als Mittelwert und Standardabweichung.

Vergleiche zwischen zwei Patientengruppen wurden mittels des zweiseitigen Mann Whitney U-Tests (bei nicht Normalverteilung der untersuchten Variablen) gezogen.

Für intraindividuelle Messungen wurde ein Testverfahren für abhängige Stichproben verwendet: der zweiseitige Wilcoxon Vorzeichen Rang Test. Um beim ELISpot die TAA-Antworten innerhalb eines Patienten, z.B. vor und nach Treg-Depletion oder vor und nach Therapie, zu

vergleichen, wurde der Mittelwert aus den gezählten ELISpot-Punkten gebildet, um die Abhängigkeit mehrerer Messungen innerhalb eines Patienten zu berücksichtigen. Es wurden nur diejenigen TAA-Antworten eines Patienten in die Berechnung eingeschlossen, die in jeder untersuchten Situation gemessen wurde (also z.B. vor und nach Therapie sowie vor und nach Treg-Depletion). Für die Ermittlung der p-Werte beim multiplen Testen beim ELISpot wurde der Permutationsalgorithmus von Westfall und Young angewendet.

Das Signifikanzniveau lag bei 5% ($p < 0,05$).

Für weitere statistische Analysen wurde SAS, Version 9.3 für Windows (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) verwendet. Die Diagramme wurden mit GraphPadPrism[®] erstellt. (Horn, 2013)

4. Ergebnisse

4.1 Patienten

56 UC-Patienten und 13 Kontroll-Patienten wurden zwischen August 2010 und Dezember 2011 primär in die Untersuchung aufgenommen. In die Auswertung eingeschlossen wurden die in folgender Tabelle (Tabelle 5) aufgelisteten 59 Patienten, von denen 47 zur UC-Gruppe und 12 zur Kontrollgruppe gehören.

Die Kontrollgruppe wies eine Altersentsprechung mit der UC-Gruppe auf, im untersuchten Kollektiv der UC-Patienten lag das Durchschnittsalter bei 65,7 Jahren, in der Kontrollgruppe bei 67,4 Jahren.

Wie in Abb. 4 dargestellt - wurden initial gemäß den oben beschriebenen Ausschlusskriterien die Proben von zehn Patienten nicht in die Auswertung aufgenommen. Bei zwei Patienten konnte histologisch kein UC festgestellt werden, bei fünf Patienten lag zwar ein UC vor, allerdings in nicht muskelinvasivem Stadium. Bei einem UC-Patienten lag gleichzeitig ein Nierenzellkarzinom vor. Ein weiterer UC-Patient musste ausgeschlossen werden, da die Proben – wahrscheinlich aufgrund methodischer Fehler – nur tote Zellen enthielten. Aus der Kontrollgruppe wurde ein Patient mit einem Non-Hodgkin-Lymphom ausgeschlossen.

Bei einer Patientin lag ein inzidentelles Endometriumkarzinom (G1, N0) vor. Die Patientin wurde nicht ausgeschlossen, da dies ähnlich dem inzidentellen Prostatakarzinom als nicht signifikanter Zweittumor gewertet wurde.

In die Untersuchungen zum Einfluss der Therapie konnten nicht alle 47 UC-Patienten eingeschlossen werden, da es nicht immer möglich war sowohl vor als auch nach der Therapie jeweils eine ausreichend große Blutprobe zu gewinnen. In diese Vergleiche wurden 33 UC-Patienten aufgenommen, von denen 20 mittels Zystektomie und 13 mittels Chemotherapie behandelt wurden. (s. Abb. 7)

Nr.	Therapie	Histologie	Nr.	Therapie	Histologie	Nr.	Therapie	Histologie
25	TURP	k.A. f. Malignität	2	Cx	pT3b, pN0 (0/30), G3, R0	1	palliativ	mind. T2a, G3
30	TURP	k.A. f. Malignität	5	Cx	pT3b, pN0 (0/19), G3	3	palliativ	G3, pN+, L.c.
31	TURP	Prostatakarzinom pT1a, G1+ Metaplasie des Urothels	8	Cx	pT2b, pN0(0/25), G2-3, R0	6	palliativ	pT4a, pN2 (2/23), G3, R2
			10	Cx	pT4a, pN0 (0/22), G3, R0	7	palliativ	pM+
38	TURP	k.A. f. Malignität	11	Cx	pT4a, pN0 (0/15), L1, G3, R0	14	palliativ	pT4a, pN2 (3/31), L1, V1, Pn1, G3, R0
39	TURP	k.A. f. Malignität	13	Cx	pT2a, pN0(0/17), G3, R0	16	palliativ	cT3-4, cM+
42	TURP	k.A. f. Malignität	14	Cx	pT4a, pN2 (3/31), L1, V1, Pn1, G3, R0	61	palliativ	pT3b, pN0 (0/36), L+, G3, R0
48	TURP	k.A. f. Malignität	15	Cx	in TURB: mind. P2, G3; in Cx: pTis, pN0 (0/40), R0	66	palliativ	mind. pT2, cN+, cM1, G3
54	TURP	k.A. f. Malignität	17	Cx	pT3a(m), pN0 (0/32), cM0, L0, V0, R0, G3			
56	TURP	k.A. f. Malignität	19	Cx	pT3b, pN2 (4/22), G3, R0	4	neoadj.	mind. pT2b, G3
59	TURP	k.A. f. Malignität	21	Cx	pT3b, pN1 (1/19), G3, R0	9	neoadj.	pT4b, pN2 (7/15), G3, Pn1, L1, V1, R1, G3
63	TURP	k.A. f. Malignität	23	Cx	pT2a, pN0 (0/18), G3, R0	18	neoadj.	cT3-4, cM+
64	TURP	k.A. f. Malignität	24	Cx	pT4a, pNx, V1, G3, Rx	34	neoadj.	pT3b, pN2 (5/54), G3, R0
			26	Cx	pT2a, pN0, G3, R0	35	neoadj.	pT3b, pN2 (15/78), G3, R0
			27	Cx	pT3b, pN0 (0/20), G3, R0	40	neoadj.	cT4, cM1
			28	Cx	pT2a, pN0, V0, L0	46	neoadj.	pT3b, pN0 (0/27), G3, R0
			32	Cx	pT3b, pN0 (0/12), G3, R0	47	neoadj.	pT2a, G3, Rx
			33	Cx	in TURB: mind. pT2a, G3; in Cx: pT0, pN0, R0	55	neoadj.	in TURB: mind. pT2a, suspekter LK
			43	Cx	pT3a, pN1 (1/50), L1, G3, R0	60	neoadj.	pT4a, Pn3 (6/17), G3, R1
			49	Cx	pT4a, pN2 (6/41), Pn1, V1, L1, G3, R0			
			57	Cx	in TURB: pT2, G3; in Cx: pT1, pN0 (0/22)	43	adjuvant	pT3a, pN1 (1/50), L1, G3, R0
			62	Cx	pT2a, Pn0 (0/21), G3, R0	44	adjuvant	pT3, cM+
			65	Cx	in TURB: pT2a, G3; in Cx: pT0, pN0, Pn0, R0	45	adjuvant	pT3, pN1 (1/15), G3, R0
			67	Cx	pT2a, pN0 (0/64), R0	52	adjuvant	pT3b, L1, G3, R0
			68	Cx	pT3b, pN0 (0/17), V0, L0, G3, R0	53	adjuvant	pT3a, pN00 (0/2), G3, R0
			69	Cx	in TURB: pT2, in Cx: pT1, pN1 (1/23), G2, R0			

Tabelle 5:

in die Auswertung aufgenommene Patienten mit Therapieform und histologischem Tumorstadium

k.A.f = kein Anhalt für, Cx = Zystektomie, neoadj. = neoadjuvant

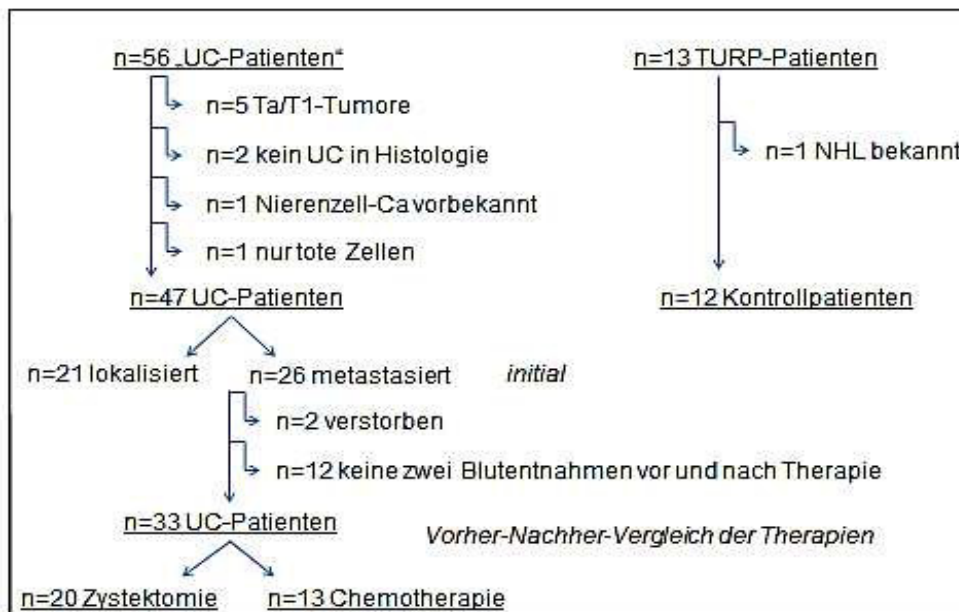


Abbildung 7

Patientenkollektiv mit jeweiligen Fallzahlen der unterschiedlichen Gruppen

Ca=Karzinom; NHL=Non-Hodgkin-Lymphom

4.2 PBMC-Subpopulationen

Wie in Abbildung 8 dargestellt und oben beschrieben, wurde die Häufigkeit der einzelnen Subpopulationen der PBMCs mittels Durchflusszytometrie bestimmt.

Von Interesse sind die Treg, die als Zellen mit folgender Ausprägung an Oberflächenmerkmalen definiert wurden: CD3⁺, CD4⁺, CD25^{high}, FOXP3⁺ und CD127^{low}.

Außerdem fiel während der Untersuchungen eine weitere Zell-Population aus CD3⁺, CD4⁺, CD25⁺, aber FOXP3⁻ Zellen auf, die daraufhin systematisch betrachtet wurde.

Die Häufigkeit der Treg wird im Folgenden immer als Anteil an allen CD4⁺ T-Helfer-Zellen angegeben, die Häufigkeit aller aktivierten nicht regulatorischen Helfer-Zellen als Anteil an allen (CD3⁺) T-Zellen.

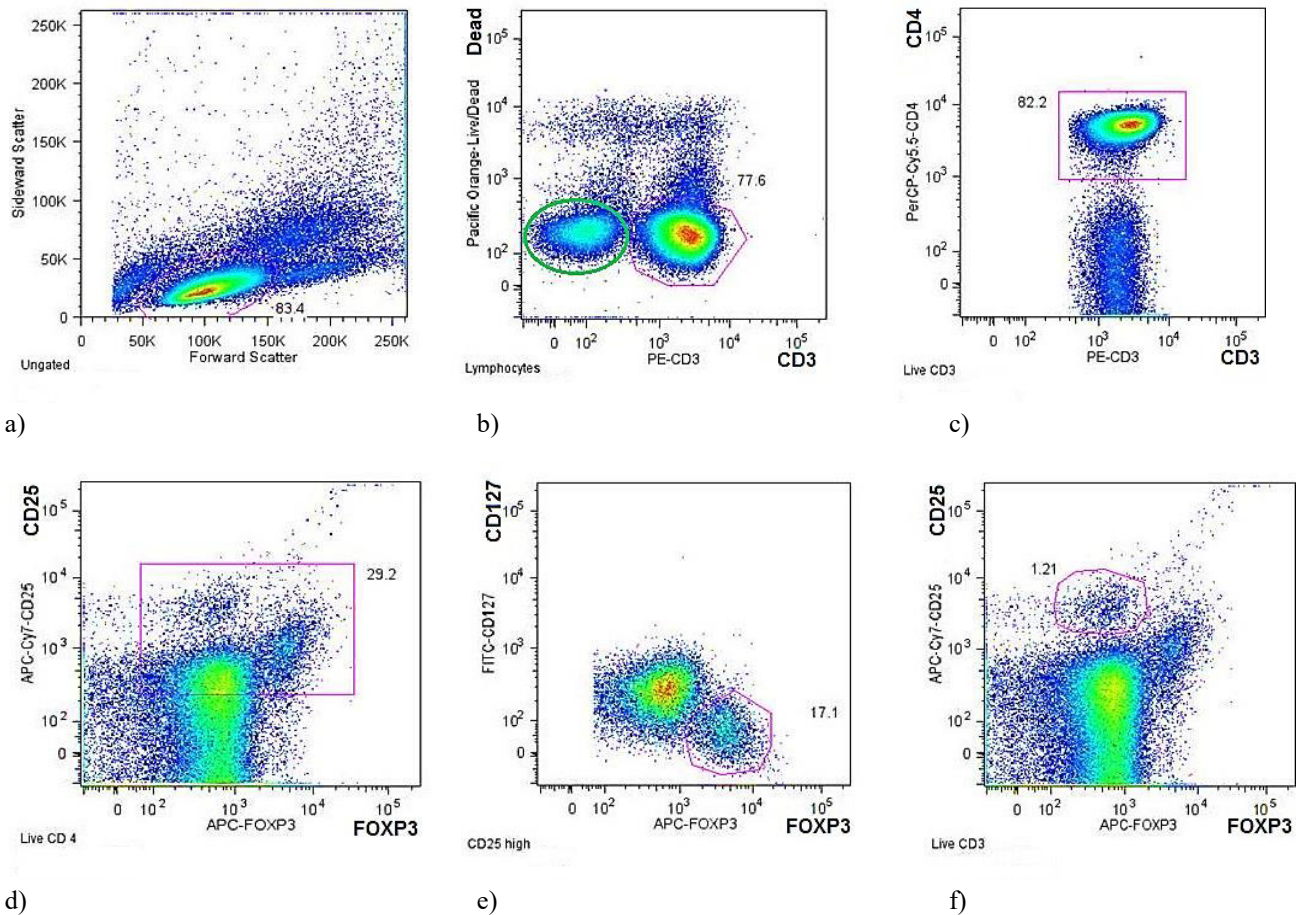


Abbildung 8 (Horn, 2013)

Durchflusszytometrie mit:

- a) PBMCs: Zellen werden nach Größe (Forward Scatter) und Granularität (SideWard Scatter) aufgeteilt, Lymphozyten eingekreist. Diese Population wird durch Gating im weiteren Verlauf näher spezifiziert.
- b) Lymphozyten: PE markiert CD3, Pacific-Orange markiert tote Zellen. T-Zellen ($CD3^+$) rot eingekreist. (B-Zellen grün eingekreist)
- c) T-Zellen: PE markiert CD3, PerCP-Cy5-5 markiert CD4. T-Helfer-Zellen ($CD4^+$) rot eingekreist. ($CD8^+$ T-Effektor-Zellen nicht eingekreist)
- d) $CD4^+$ T-Zellen: APC-Cy7 markiert CD25, APC markiert FOXP3 (spezifischer Transkriptionsfaktor der Treg) Rot eingekreiste Zellen haben eine hohe Expression von CD25 = alle aktivierten $CD4^+$ T-Zellen und Treg ($CD25^{high}$)
- e) $CD25^{high}$ T-Zellen: APC markiert FOXP3 (Treg), FITC markiert CD127 (hoch exprimiert von T-Effektorzellen, niedrig exprimiert von Treg), Treg rot eingekreist.
- f) $CD3^+$ T-Zellen: APC markiert FOXP3, APC-Cy7 markiert CD25; rot eingekreist sind alle (auch $CD8^+$) aktivierten, nicht regulatorischen ($FOXP3^-$) T-Zellen

4.2.1 Das Vorkommen regulatorischer T-Zellen

Zunächst wurde die Häufigkeit von Treg im peripheren Blut aller Studienteilnehmer untersucht. Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied in der Häufigkeit der Treg zwischen UC-Patienten und Kontrollen. Tendenziell ergaben sich höhere Treg-Anteile in der Kontrollgruppe (Median 4,3%) als bei den UC-Patienten (Median 3,2%) (Abb. 9a). Diese wurden je nach Tumorausbreitung noch in drei Untergruppen unterteilt: lokal begrenztes UC, metastasiertes UC mit Lymphknotenmetastasen und metastasiertes UC mit Fernmetastasen. Auch das Tumorstadium ging nicht mit einer Veränderung der Treg-Häufigkeit im peripheren Blut einher. (Abb. 9a) (Horn, 2013)

4.2.2 Das Vorkommen CD25⁺ FOXP3⁻ T-Zellen

Auch hinsichtlich der Häufigkeit CD25⁺ FOXP3⁻ T-Zellen ergab sich kein signifikanter Unterschied zwischen den Patienten und Kontrollen, sowie zwischen den verschiedenen Tumorstadien. (Abb. 9b) (Horn, 2013)

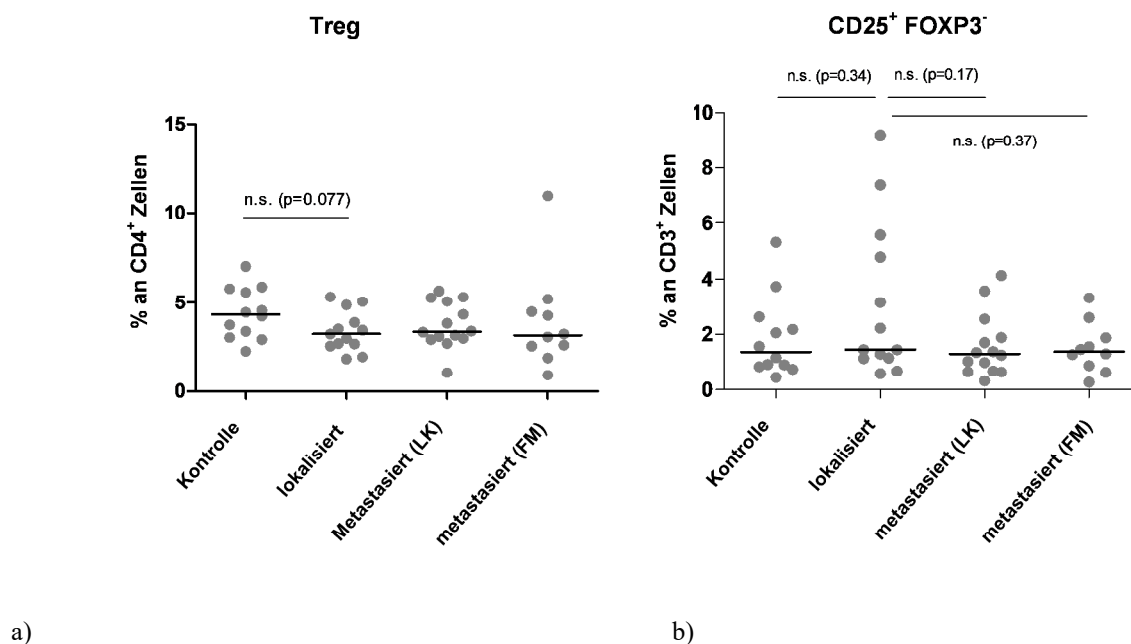


Abbildung 9 (Horn, 2013)

- Häufigkeit regulatorischer T-Zellen im Peripheren Blut bei Kontrollpatienten (tumorfremde BPH-Patienten) und UC-Patienten unterschiedlicher Stadien. Kein signifikanter Unterschied, weder zwischen Patienten und Kontrollen noch zwischen den Tumorstadien
- Häufigkeit CD25⁺ FOXP3⁻ Zellen im peripheren Blut bei Kontroll- und UC-Patienten unterschiedlicher Stadien; kein signifikanter Unterschied zwischen Kontrollen und UC bzw. zwischen den Tumorstadien

LK = Lymphknoten; FM = Fernmetastasen

4.3 Tumor-Immunantwort und die Rolle der Treg

Mittels des Elispot-Tests wird das Vorhandensein und das Ausmaß der tumorantigenspezifischen Aktivität der jeweiligen T-Zellen bestimmt.

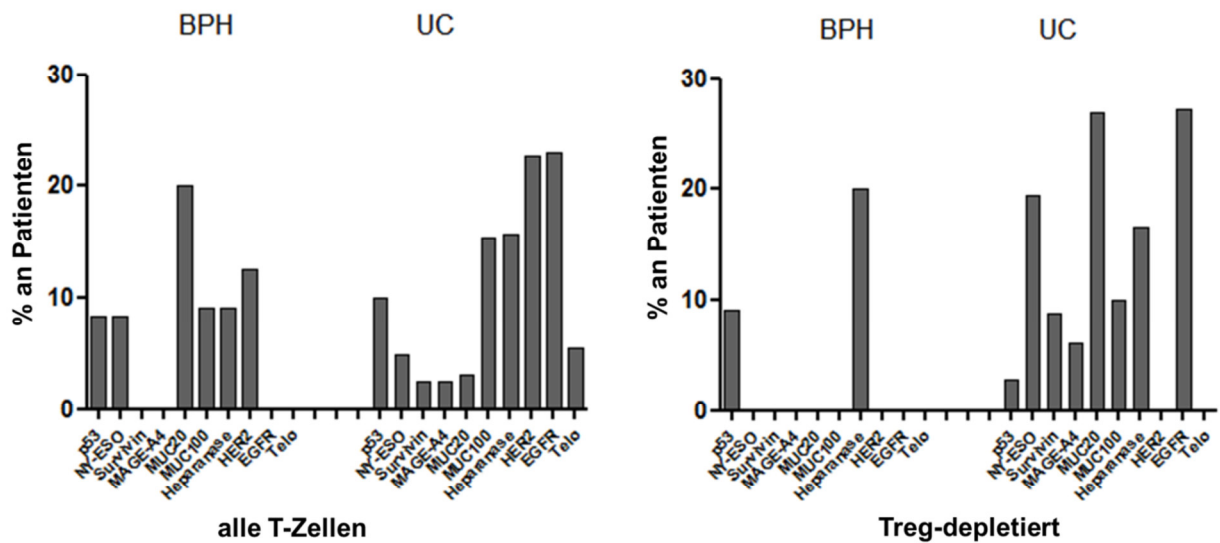
Die spezifische Antwort von T-Zellen auf die jeweiligen TAAs wurde wieder sowohl bei den UC-Patienten als auch bei den Kontrollen unter Einfluss und unter Depletion der Treg gemessen. In der UC-Gruppe kommt es auf alle TAA bei mindestens einem (2,5%) der Patienten zu einer T-Zell-Antwort. Besonders häufig konnte eine Antwort auf die TAA EGFR, MUC100, Heparanase und HER2 festgestellt werden. (Abb. 10a)

In der Kontrollgruppe lag der prozentuale Anteil der Patienten, die eine Antwort auf die TAA zeigten, insgesamt deutlich niedriger als bei den UC-Patienten. Auf einige Peptide zeigte keiner der Kontrollpatienten (0%) eine Antwort. (Abb. 10a)

Das einzige Peptid, bei dem ein signifikanter Unterschied im Anteil der antwortenden Patienten zwischen Kontroll- und UC-Gruppe auffiel, war EGFR. Auf EGFR zeigten 0% der Kontrollen und 23,1% der UC-Patienten eine Antwort. (Abb. 10a)

Nach Treg-Depletion kam es bei den Kontrollpatienten lediglich noch auf p53 und auf Heparanase zu einer Antwort. Bei den UC-Patienten wurde nach Treg-Depletion insgesamt häufiger eine TAA-Antwort festgestellt als davor. (Abb. 10b)

Außerdem änderte sich hier ohne Einfluss der Treg die Häufigkeit der TAA-Antworten: Eine Antwort auf NYESO1 zeigte sich vor Treg-Depletion bei 4,8%, nach Treg-Depletion bei 19,4% der UC-Patienten. Auch bei MUC 20 wurde ein Anstieg der auf das Peptid reagierenden Patienten von 3,1% vor Treg-Depletion auf 26,9% nach Treg-Depletion deutlich. In der Kontrollgruppe dagegen reagierte keiner der Patienten (0%) unter Treg-Depletion auf NYESO1 oder MUC 20. Die Reaktion auf EGFR wurde durch die Treg-Depletion weder bei den Kontrollen noch bei den UC-Patienten maßgeblich verändert. (Abb. 10b).



a)

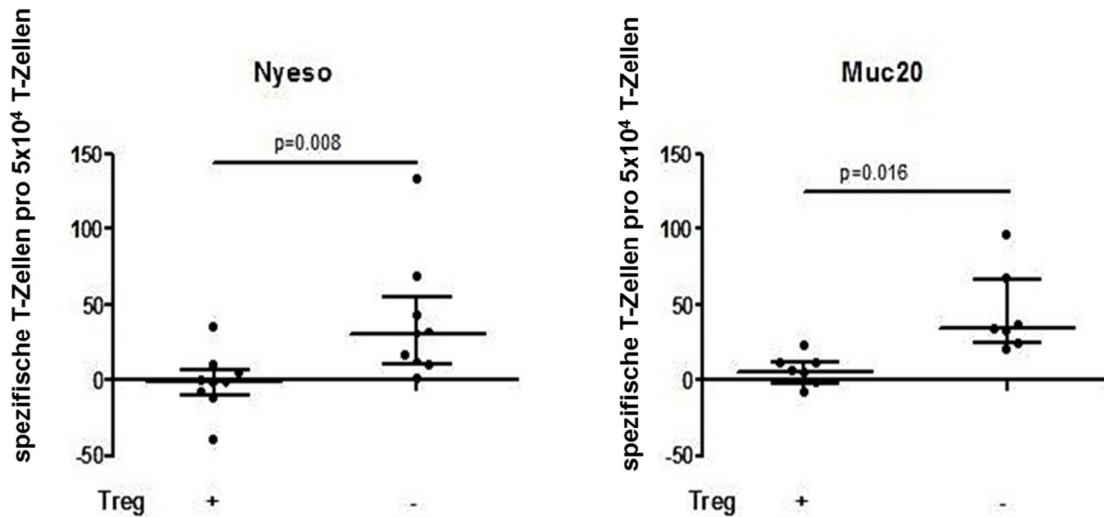
b)

Abbildung 10 (Horn, 2013)

Prozentualer Anteil der jeweiligen Patienten (BPH=Kontrollgruppe; UC= Urothelkarzinompatienten), die auf das jeweilige TAA eine T-Zell-Antwort zeigen, welche sich signifikant von der Antwort auf die Negativ-Kontrolle IgG unterscheidet.

a) gesamt T-Zell-Population, b) unter Treg-Depletion

Ob der unter Treg-Depletion höhere Anteil an auf NYESO1 und MUC20 reagierenden Patienten mit einer erhöhten TAA-spezifischen T-Zell-Aktivität nach Treg-Depletion in diesen Patienten korreliert, wurde im Folgenden überprüft. Die T-Zellen aller entweder vor oder nach Treg-Depletion auf die beiden TAA antwortenden Patienten wurden noch einmal mittels ELISpot bezüglich ihrer Reaktion auf NYESO und MUC 20 jeweils vor und nach Treg-Depletion untersucht. Wie in Abb. 11 dargestellt wurden hier nach Treg-Depletion signifikant mehr TAA-spezifische T-Zellen detektiert als vor Treg-Depletion. Auch hier diente die Reaktion auf IgG als Negativkontrolle, welche sich unter Treg-Depletion nicht veränderte und somit nicht für den Unterschied der Antworten auf die TAA ursächlich sein kann. (Abb. 12)



a)

b)

Abbildung 11 (Horn, 2013)

Häufigkeiten der TAA-spezifischen T-Zellen pro 5×10^4 T-Zellen für a) NYESO and b) MUC20, jeweils vor (links) und nach (rechts) Treg-Depletion.

Eingeschlossen wurden nur Patienten, die entweder vor oder nach Treg-Depletion eine signifikant höhere Antwort auf das jeweilige TAA zeigten als auf die Negativkontrolle IgG.

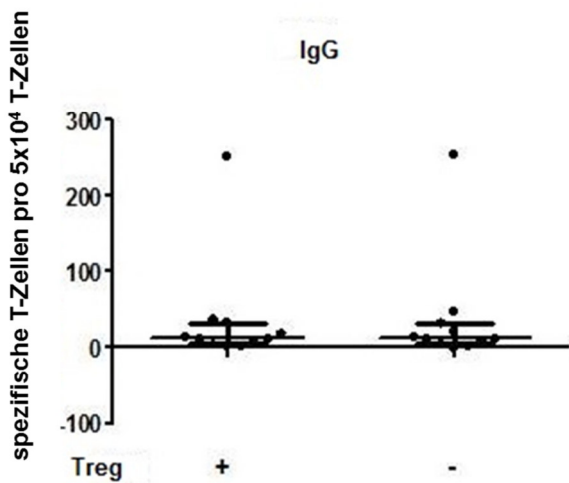


Abbildung 12 (Horn, 2013)

Häufigkeit der auf die Negativkontrolle IgG reagierenden T-Zellen vor und nach Treg-Depletion bei allen Patienten

In einer weiteren Untersuchung wurde die TAA-spezifische T-Zell-Reaktion vor und nach Treg-Depletion bei allen Patienten - und nicht nur bei den in der Voruntersuchung TAA-sepzigfisch Antwortenden - betrachtet. Hier ergab sich - weder vor noch nach Treg-Depletion - für kein TAA ein Unterschied zwischen Kontrollen und UC-Patienten (s. Tabelle 6). Nach weiterer Unterteilung in lokalisiertes und metastasiertes UC zeigte sich eine signifikant höhere Anzahl an auf EGFR reagierenden T-Zellen beim metastasierten UC im Vergleich zur Kontrollgruppe bzw. auch im Vergleich zum lokalisierten Tumor. Durch Treg-Depletion ergab sich hier keine Änderung. Auf NYESO1 kam es nach Treg-Depletion zu einem höheren Anteil an reagierenden T-Zellen bei metastasiertem UC im Vergleich zur Kontrollgruppe und zum lokalisierten UC.

		p53	NYESO	Survivin	MAGE-A4	MUC20	Hpa	MUC100	HER2	EGFR	Telo
BPH vs localized UC	All T cells	0,65	0,49	0,75	0,70	0,97	0,56	0,07	0,29	0,74	0,66
	Treg-depleted	0,36	0,60	0,65	0,19	0,86	0,75	0,84	0,22	0,48	0,88
BPH vs met. UC	All T cells	0,42			0,20	0,57	0,56	0,23	0,55	0,05	0,71
	Treg-depleted	1,0	0,07	0,61	0,41	0,98	0,71	0,88	0,68	0,04	0,95
Localized vs met UC	All T cells	0,21	0,21	0,34	0,44	0,73	0,15	0,40	0,19	0,01	0,15
	Treg-depleted	0,19	0,05	0,46	0,97	0,76	0,44	0,68	0,40	0,11	0,49
BPH vs all UC	All T cells	0,76	0,92	0,33	0,30	0,67	0,86	0,11	0,99	0,21	1,0
	Treg-depleted	0,65	0,15	0,93	0,23	0,96	0,93	0,82	0,40	0,08	0,99

Tabelle 6 (Horn, 2013)

Unterschied der ELISpot-Punkten zwischen TAA und Negativ-Kontrolle IgG im Vergleich zwischen Kontrollpatienten, lokalisiertem UC und metastasiertem UC unter Einschluss aller durchgeführten Tests (auch nicht-antwortende Patienten).

Dargestellt sind zweiseitige P-Werte, die mittels Wilcoxon-rank sum test ermittelt wurden.

rot: P-Werte < 0,1, wenn höherer Spot-Count bei UC-Patienten. grün: P-Wert < 0,1, wenn höherer Spot-Count bei Kontrollen.

Zudem wird der Einfluss der Treg auf die gesamte Reaktion der Effektorzellen auf alle TAAs im Krankheitsverlauf betrachtet. Dazu wurde die Patientengruppe wieder in eine mit lokal begrenzter und eine mit metastasierter Erkrankung unterteilt, es wurden jeweils Ansätze mit und ohne Treg durchgeführt und miteinander verglichen (s. Abb. 13).

In der Gruppe mit lokalisiertem Tumor fand sich kein Unterschied in der Anzahl der reagierenden T-Zellen vor und nach Treg-Depletion. Bei der Gruppe mit metastasiertem Karzinom allerdings nimmt die Anzahl der gesamten T-Zell-Antworten nach Treg-Depletion tendenziell zu. Aufgrund von multiplen Testen ist, statistisch betrachtet, allerdings auch diese Veränderung mit einem p-Wert von 0,068 nicht signifikant. (Abb. 13)

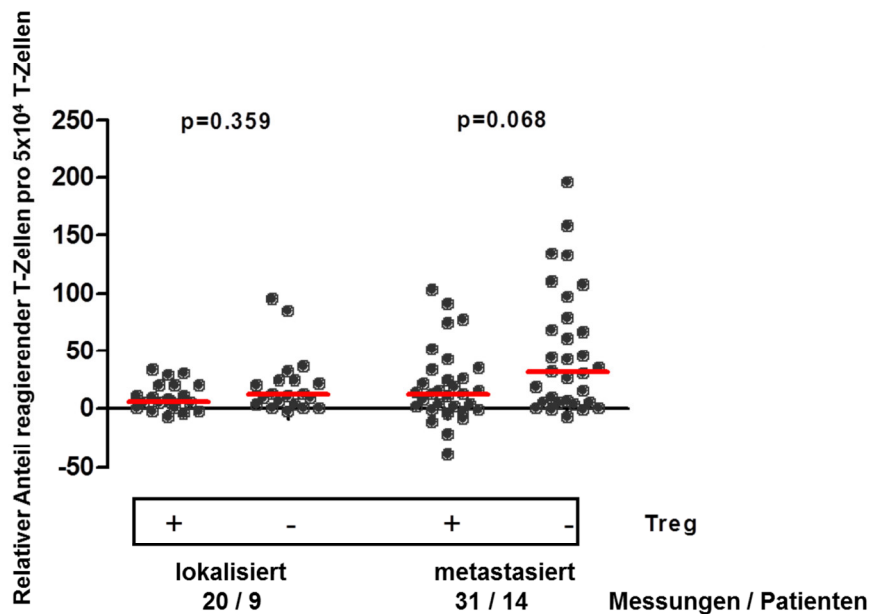


Abbildung 13 (Horn, 2013)

Anzahl der auf alle TAAs antwortenden T-Zellen pro 5×10^4 T-Zellen beim lokalisierten (links) (20 Messungen aus den Proben von neun Patienten) bzw. metastasierten (rechts) (31 Messungen aus den Proben von 14 Patienten) UC, jeweils vor und nach Treg-Depletion.

Durch einen Punkt ist jeweils die Anzahl an antwortenden Zellen auf ein bestimmtes TAA in einem Patienten dargestellt, die signifikant über dem Niveau der Antworten auf die Negativkontrolle IgG liegt. Eingeschlossen wurden nur Patienten bzw. Peptide, die mindestens entweder vor oder nach Treg-Depletion eine Antwort zeigten bzw. auslösten.

Um die Stärke der Immunantwort auf ein TAA mit der auf ein starkes Fremdanigen vergleichen zu können, wurde mittels ELISpot die T-Zell-Reaktion auf das bekanntermaßen stark immunogene Tetanus-Toxoid dargestellt. Der Vergleich ergab ähnlich starke Reaktionen auf ein Tumorantigen wie auf das bakterielle Protein. (s. Abb. 14)

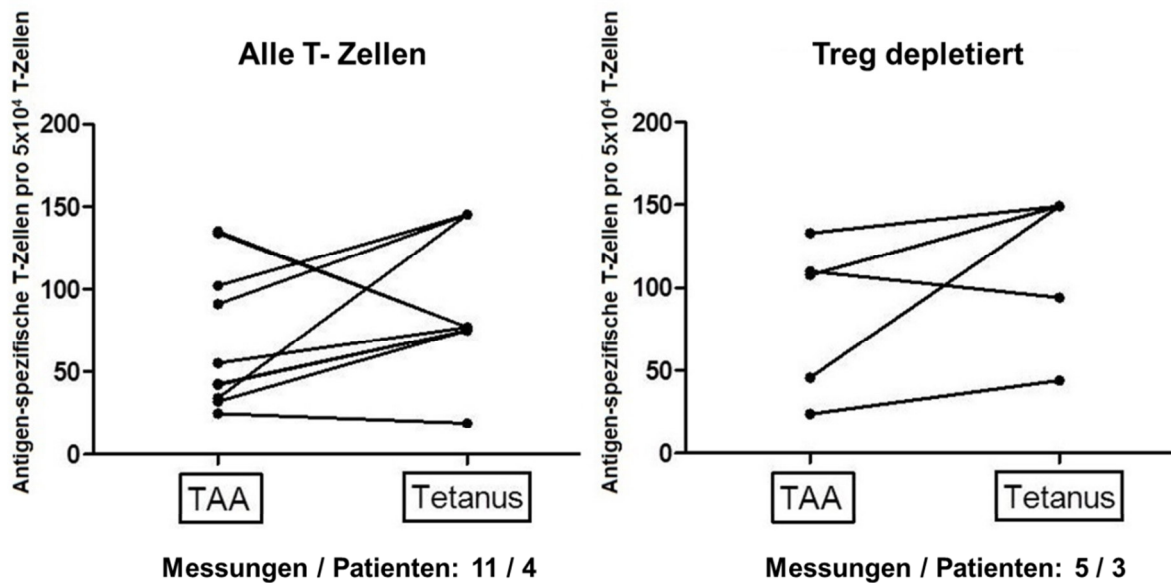


Abbildung 14 (Horn, 2013)

Auf ein TAA bzw. Tetanustoxoid antwortende T-Zellen pro 5×10^4 T-Zellen

Links vor Treg-Depletion, rechts nach Treg-Depletion

eingeschlossen wurden nur Patienten, die eine Reaktion auf Tetanustoxoid und mindestens ein TAA zeigten

4.4 Änderungen unter Therapie

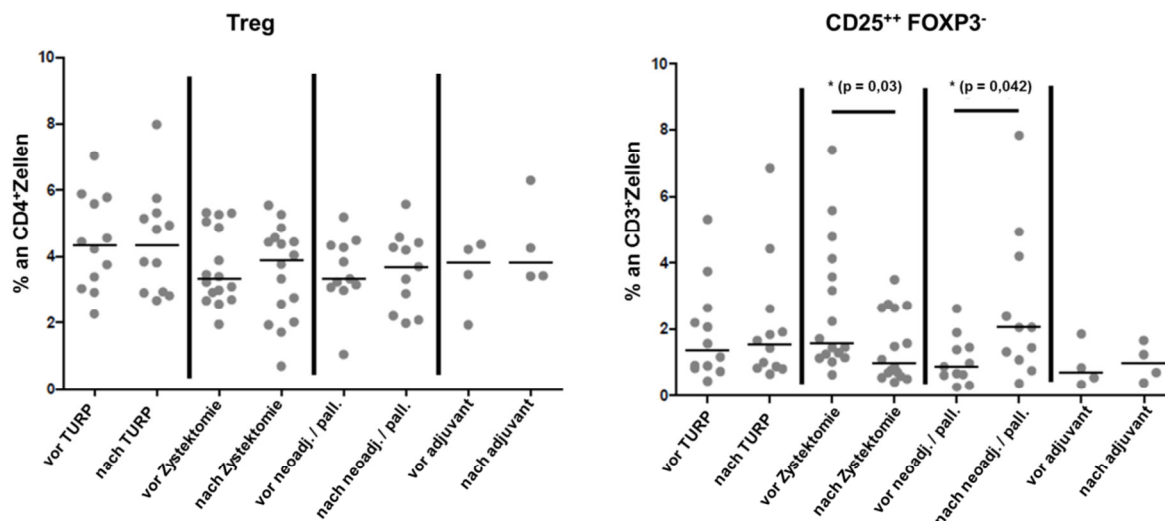
Im folgenden Abschnitt wird der Einfluss der Behandlung von Tumoren auf die untersuchten Immunzellen näher betrachtet.

Zunächst wurde dazu die Häufigkeit der zirkulierenden Treg im peripheren Blut vor und nach den einzelnen Therapien untereinander verglichen.

Die Patienten wurden hierzu in vier Gruppen unterteilt: Kontrollpatienten mit TURP, Patienten mit lokalem Tumor mit Zystektomie, Patienten mit fortgeschrittenem Tumorstadium mit neoadjuvanter/palliativer Chemotherapie bzw. adjuvanter Chemotherapie. Letztere wird hier gesondert betrachtet, da die Immunantwort während der Chemotherapie nicht mehr unter Einfluss des eigentlichen – bereits operativ entfernten - Tumors steht.

Es fällt auf, dass sich der Anteil der Treg ($CD3^+$, $CD4^+$, $CD25^{\text{high}}$, $FOXP3^+$, $CD127^{\text{low}}$) an allen $CD4^+$ Zellen bei keiner Gruppe vor und nach Therapie signifikant unterscheidet. (Abb. 15a; Tabelle 7)

Betrachtet man die oben erwähnte $CD25^+$, $FOXP3^-$ T-Zell-Population ergibt sich folgendes Ergebnis: In der Kontrollgruppe sowie in der Gruppe mit adjuvanter Chemotherapie gibt es auch hier keine signifikanten Unterschiede vor und nach Therapie. Vor der radikalen Zystektomie ist der Anteil dieser Zellen an allen T-Zellen allerdings signifikant höher als danach, während es sich bei der palliativen/neoadjuvanter Chemotherapie genau andersherum verhält. Hier steigt der Anteil der $CD3^+CD4^+CD25^+FOXP3^-$ Zellen nach Therapie signifikant an (Abb.15b, Tabelle 7).



a)

b)

Abbildung 15 (Horn, 2013)

a) Änderung der Treg-Häufigkeit (Anteil der $CD4^+ CD3^+ CD25^{++} FOXP3^+ CD127^{low}$ Zellen an $CD4^+$ Zellen) durch Therapie

b) Anteil der $CD25^{++} FOXP3^-$ Zellen an allen $CD3^+$ Zellen (T-Zellen) in den unterschiedlichen Therapiegruppen; jeweils vor und nach Therapie

	Tregs in % an $CD4^+$ Zellen	$CD25^+ FOXP3^-$ Zellen in % an $CD3^+$ Zellen
vor TURP	4,3 (3,1 – 5,7)	1,4 (0,9 – 2,5)
nach TURP	4,3 (2,9 – 5,3)	1,5 (0,9 – 2,4)
vor Zystektomie	3,3, (2,8 – 5,0)	1,6 (1,2 – 4,0)
nach Zystektomie	3,9 (2,2 – 4,5)	1,0 (0,6 – 2,6)
vor pall./neoadj. Chemotherapie	3,3 (3,1 – 4,3)	0,9 (0,6 – 1,5)
nach pall./neoadj. Chemotherapie	3,7 (2,2 -4,4)	2,0 (1,1 – 4,2)
vor adjuv. Chemotherapie	3,8 (2,3 – 4,3)	0,7 (0,4 – 1,6)
nach adjuv. Chemotherapie	3,8 (3,4 – 5,8)	1,0 (0,5 – 1,6)

Tabelle 7 (Horn, 2013)

Anteil der regulatorischen T-Zellen an allen $CD4^+$ Zellen vor und nach Therapie, sowie Anteil der $CD25^{++}, FOXP3^-$ T-Zellen an allen $CD3^+$ vor und nach Therapie; Mittelwerte mit Interquartilsabständen

Zusammengefasst lässt sich sagen, dass keine der durchgeführten Therapien die Häufigkeit der Treg verändert. Die $CD4^+$, $CD25^+ FOXP3^-$ Zellen jedoch fallen nach Zystektomie ab und steigen nach neoadjuvanter bzw. palliativer Chemotherapie an.

Des Weiteren wurde auch die antigenspezifische Aktivität der T-Zellen, die oben bereits beschrieben wurde, im Hinblick auf den Einfluss der verschiedenen Therapien auf die T-Zell-Reaktion weiter untersucht. Die Anzahl der - durch die jeweiligen Tumorantigene im ELISpot-Test aktivierten - Zellen wird vor und nach Therapie bzw. mit und ohne T-reg-Depletion verglichen.

Zunächst wird die Antwort auf alle untersuchten, UC-relevanten Tumorantigene zusammen betrachtet.

In dieser Auswertung wurden Ergebnisse nur dann berücksichtigt, wenn Messungen für die einzelnen TAAs sowohl vor und nach Therapie als auch vor und nach Treg-Depletion vorlagen und mindestens eine von ihnen die Kriterien einer positiven Antwort erfüllte.

In der Kontrollgruppe ließen sich weder mit noch ohne Treg-Depletion Unterschiede in der Anzahl der antwortenden Zellen im Therapieverlauf beobachten. (Abb. 16a) In der Zystektomiegruppe zeigte sich vor Zystektomie eine signifikant niedrigere Anzahl an TAA-antwortenden T-Zellen unter Treg-Einfluss als unter Treg-Depletion. Nach Zystektomie war dieser Effekt nicht mehr zu beobachten. (Abb. 16b) Vor und nach Chemotherapie bestand in der gesamten sowie in der Treg-depletierten T-Zell-Population kein signifikanter Unterschied (Abb. 16c).

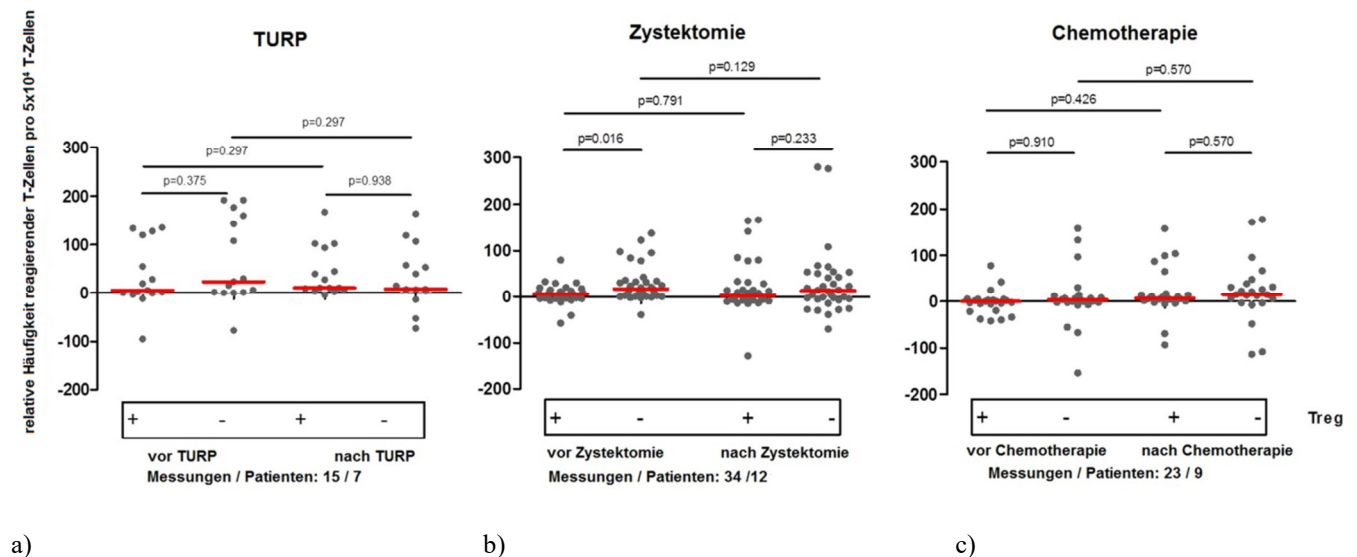


Abbildung 16 (Horn, 2013)

Einfluss der Treg auf die Immunantwort gegen alle TAAs zusammen im Therapieverlauf

Anzahl der antwortenden T-Zellen pro 5×10^4 T-Zellen, links jeweils mit der gesamten T-Zell-Population (+), rechts unter Treg-Depletion (-)

a) Kontrollgruppe mit TURP, b) Zystektomiegruppe, c) Chemotherapiegruppe

Berücksichtigt wurden Ergebnisse nur dann, wenn sowohl vor und nach Therapie als auch mit und ohne Treg-Depletion ein Ergebnis gemessen werden konnte und mindestens eines davon eine positive Antwort zeigte

Zusammengefasst zeigen die ELISpot-Daten vor Zystektomie eine Abschwächung der T-Zell-Antworten in der gesamten T-Zell-Population, die durch Treg-Depletion ansteigt. Im Therapieverlauf fällt dieser Einfluss der Treg weg.

4.5 Spezifität regulatorischer T-Zellen

Unabhängig von der Therapie wurde die TAA-Spezifität von Treg in Malignomen und im speziellen beim UC bislang nur wenig untersucht. Das Vorliegen TAA-spezifischer Treg wurde hier mittels des unter 2.6 beschriebenen Treg-Spezifitäts-Assays untersucht.

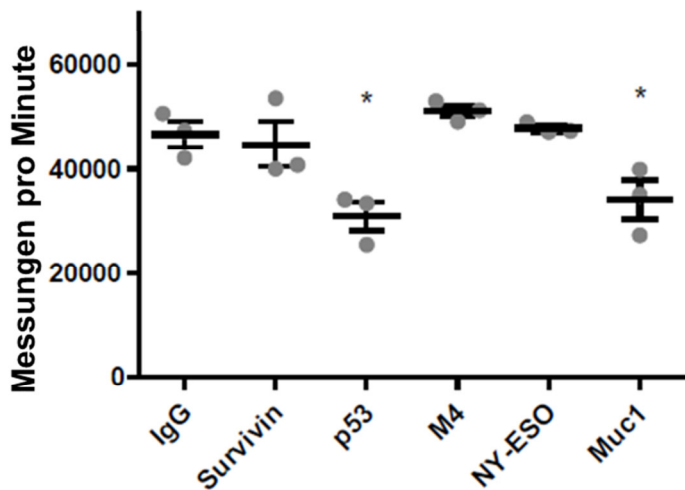
Abb. 17a stellt beispielhaft einen Rückgang der Proliferationsrate von Effektorzellen, am ehesten durch spezifisch aktivierte Treg, bei einem Patienten für p53 und MUC1 dar.

Zunächst fiel auf, dass nicht nur bei den Patienten, sondern auch in der tumorfreien Kontrollgruppe TAA-spezifische Treg vorkamen, nämlich gegen p53 (bei zwei von vier Patienten), Heparanase und HER2.

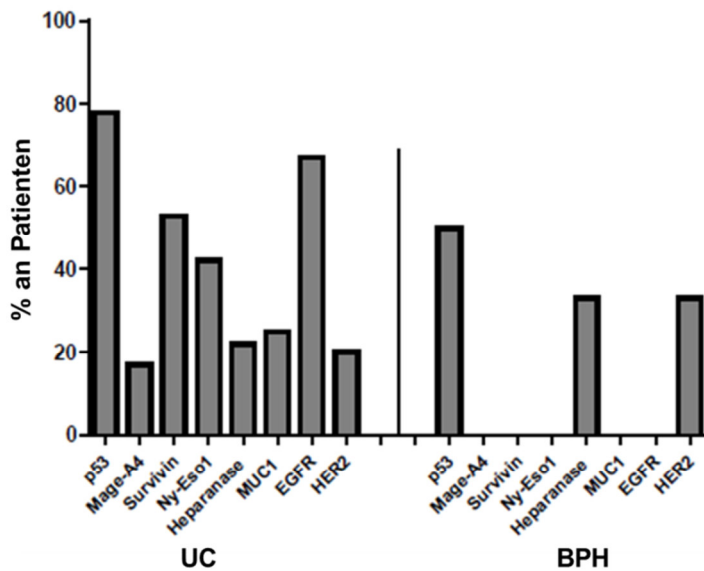
Im Vergleich zu den Kontrollen zeigte sich eine Unterdrückung aktivierter T-Zellen durch TAA-spezifisch aktivierte Treg bei einem höheren Anteil der Patienten für die Antigene NYESO1, MUC1, EGFR und Survivin sowie MAGE-A4 (Abb.17b). Für die beiden erstgenannten Peptide wurden auch in den ELISpot-Daten spezifische Effektorzell-Antworten unter Treg-Depletion bei UC-Patienten (v.a. mit metastasiertem UC) gegenüber Kontrollen gefunden.

Diese Übereinstimmung führt zu der Annahme, dass in den Patienten, bei denen TAA-spezifische Treg gefunden wurden, die Effektorzell-Antwort auf selbige TAAs nach Treg-Depletion erhöht ist.

Um diesen Zusammenhang zu überprüfen, wurden die Ergebnisse von ELISpot und Treg-Spezifitäts-Assay verglichen. Hier gab es in nahezu keinem Fall eine Immunantwort – weder mit noch ohne Treg-Depletion - auf diejenigen Peptide, die bei demselben Patienten im Treg-Spezifitäts-Assay positiv getestet wurden, also eine Suppression von Teff zeigten. Sowohl vor als auch nach Treg-Depletion zeigten nur drei von 44 Tests eine Übereinstimmung. Überraschenderweise zeigte sich also – wie in Abb.18 dargestellt - dass die Unterdrückung der TAA-Immunantwort im Treg-Spezifitäts-Assay, also das Vorliegen spezifischer Treg, nicht positiv mit der Stärke der spezifischen TAA-Immunantwort im ELISpot nach Treg-Depletion korreliert. In diese Untersuchung wurden nur Proben eingeschlossen, die eine positive Reaktion im Treg-Spezifitäts-Assay zeigten.



a)



b)

Abbildung 17 (Horn, 2013)

a) Ergebnisse des Treg-Spezifitäts-Assay eines Beispielpatienten:

positiver Test für p53 und MUC1; signifikant geringere Proliferation TAA-spezifischer Effektorzellen als IgG-spezifischer Effektorzellen; dies wurde als Vorliegen spezifischer, aktivierter unterdrückender regulatorischer T-Zellen interpretiert

b) Anteil der Patienten mit positivem Ergebnis im Treg-Spezifitäts-Assay, bei denen gegen ein bestimmtes TAA-spezifische Treg vorliegen und die Effektorzell-Proliferation hemmen.

Höher bei UC-Patienten im Vergleich zu Kontrollpatienten bei MAGE-A4, Survivin, NYESO 1, MUC1 und EGFR; Treg der jeweiligen Patienten wurden vor Therapie getestet

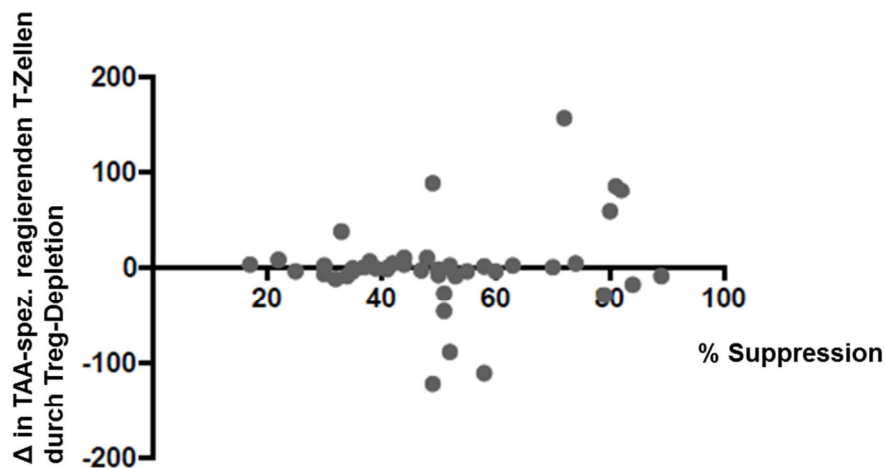


Abbildung 18 (Horn, 2013)

Korrelation der Suppression durch Treg im Treg-Spezifitäts-Assay mit der Aktivität von T-Zellen im ELISpot nach Treg-Depletion

Gegen jedes positive Ergebnis aus dem Treg-Spezifitäts-Assay wurde die jeweilige Änderung der T-Zell-Aktivität desselben Patienten gegen das betreffende TAA nach Treg-Depletion aus dem ELISpot aufgetragen.

Beim Vergleich der Ergebnisse von ELISpot und Treg-Spezifitäts-Assay fiel außerdem auf, dass bei einem extrem hohen Anteil von fast 80% der UC-Patienten p53-spezifische Treg gefunden wurden, während im ELISpot-Test auch unter Ausschaltung der Treg kaum Antworten auf p53 zu beobachten waren.

5. Diskussion

5.1 Patienten

Die Kontrollgruppe wurde gewählt, da sie eine Altersentsprechung mit den zu untersuchenden Patienten aufweist. Die BPH tritt etwa im selben Alter auf wie das UC. Das mittlere Alter bei Erstdiagnose des UC beträgt 65 Jahre (Longo, 2012), das klinische Manifestationsalter der BPH ebenfalls (Gao, 2007). Im Patientenkollektiv dieser Studie lag das Durchschnittsalter der UC-Patienten bei 65,7 Jahren, das der Kontrollgruppe bei 67,4 Jahren. Mit der TURP wurde eine standardisierte chirurgische Therapie durchgeführt, die Patienten- und Kontrollgruppe vergleichbar macht. Mögliche immunologische Effekte, die ausschließlich auf einer durchgeführten Operation - unabhängig von einer malignen Erkrankung – beruhen, können somit als Fehlerquelle für Unterschiede in den Ergebnissen zwischen Patienten und Kontrollen weitestgehend ausgeschlossen werden.

In vielen Studien zur selben Thematik (z.B. Miller et al. 2006, Ichihara et al. 2003, etc.; s. Tab. 8) wurden nicht altersgematchte, gesunde Probanden als Kontrollen verwendet. Dies schränkt die Vergleichbarkeit zwischen Tumorpatient und Nicht-Tumorpatienten deutlich ein und verringert somit die Aussagekraft von vermeintlich tumorspezifischen Ergebnissen.

5.2 Häufigkeiten der PBMC-Subpopulationen

Ausgehend von ihrer immunsupprimierenden Wirkung und der ihnen zugeschriebenen Rolle bei der Tumorentstehung beim Verlust der Tumورimmunität, ist eine gängige Hypothese, dass Treg bei Karzinom-Patienten gehäuft vorkommen. Diese Annahme konnte für Karzinome der Prostata (Miller, 2006), des Kolon (Sasada, 2003; Clarke, 2006), der Mamma (Liyanage, 2002), des Pankreas (Liyanage, 2002), des Magens und Oesophagus (Ichihara, 2003; Kono, 2006), der Niere (Busse, 2011), des Ovars (Woo, 2001) sowie des UC (Loskog, 2007), (Chi, 2010) bestätigt werden; hier wurden signifikant höhere Treg-Level im peripheren Blut der Patienten als in dem gesunder Probanden gefunden. (s. Tabelle 8)

In den durchflusszytometrischen Untersuchungen dieser Arbeit ließ sich diese Hypothese nicht bestätigen, sie ergaben keinen Unterschied zwischen UC-Patienten und Kontrollen in der Häufigkeit von Treg im peripheren Blut.

Einen fehlenden signifikanten Unterschied in der Treg-Häufigkeit in PBMCs fanden auch Ge et al (Ge, 2012) für das Mammakarzinom.

Auch innerhalb der UC-Patienten ließ sich kein Unterschied in der Treg-Häufigkeit zwischen Patienten mit lokalisiertem Tumor und metastasiertem Tumor finden. Hier scheint sich das UC vom Magenkarzinom und dem Oesophaguskarzinom zu unterscheiden, für das Kono et al höhere Treg-Anteile bei fortgeschrittener Erkrankung gegenüber frühen Tumorstadien zeigten (Kono, 2006). Auch für das HCC wurde ein Zuwachs an Treg mit zunehmendem Tumorstadium gefunden (Zhang, 2010). In beiden Studien galten Treg allerdings als $CD4^+$, $CD25^+$ ohne Berücksichtigung von FOXP3 (s. unten).

Die beobachteten $CD3^+$, $CD4^+$, $CD25^+$ und $FOXP3^-$ T-Zellen stellen möglicherweise aktivierte nicht-regulatorische T-Helfer-Zellen dar. $CD25$ gilt - als Teil des IL2-Rezeptors - als Aktivitätsmarker für T-Zellen. Das Fehlen von FOXP3 spricht für nicht-regulatorische Aktivität. Diese Zellpopulation zeigte auch keinen Unterschied in ihrer Häufigkeit zwischen Kontrollen und UC-Patienten sowie zwischen den Tumorstadien. Nimmt man an, dass in Tumorpatienten eine aktivierte Tumorimmunantwort zu finden sein sollte, lässt sich aus den Ergebnissen schließen, dass diese beim UC nicht auf einer unspezifischen Vermehrung der Effektor-T-Zellen beruht. Über das Vorkommen tumorspezifischer T-Zellen beim UC lässt sich hier keine Aussage treffen. Bei Kolon-Karzinom-Patienten wurde eine Häufung tumorspezifischer Effektor-T-Zellen im Blut im Vergleich zu gesunden Kontrollen gefunden (Bonertz, 2009).

Zusammenfassend scheinen - laut den vorliegenden Ergebnissen - am Verlust der Tumorimmunität bzw. dem Voranschreiten der Tumorausbreitung beim UC die Treg bzw. T-Effektorzellen zumindest nicht durch erhöhtes bzw. vermindertes Vorkommen beteiligt zu sein.

Bei der Durchflusszytometrie wurden Treg in der vorliegenden Studie sehr präzise definiert und somit sehr genau identifiziert. Während hier Treg für die Durchflusszytometrie erstmals als $CD4^+$, $CD25^{high}$, $CD127^-$ und $FOXP3^+$ definiert waren, wurden sie in vielen anderen (auch hier zitierten) Studien lediglich als $CD4^+$, $CD25^+$ T-Zellen angesehen (Miller et al, Liyanage et al, Chi et al, Woo et al). Allerdings ist ein erheblicher Anteil dieser Zellen nicht regulatorisch (Baecher-Allan, 2001; Nizar, 2010). Der derzeit zuverlässigste Marker für Treg ist FOXP3 (Fontenot, 2003).

Die Zellpopulation aus $CD3^+$, $CD4^+$, $CD25^+$, $FOXP3^-$ Zellen zeigte, wie oben beschrieben, keinen Unterschied in der Häufigkeit zwischen UC-Patienten und Kontrollen bzw. zwischen den einzelnen Tumorstadien. Somit schränkt die unterschiedliche Treg-Definition die

Vergleichbarkeit dieser Arbeit mit den zitierten Voruntersuchungen bezüglich des Vorkommens von Treg in PBMC vor einer Therapie nicht ein.

Wie Ergebnisse der hier durchgeführten allerdings zeigen, ändert sich das Vorkommen der CD4⁺ CD25⁺ FOXP3⁻ Zellen während der Therapie. Diese Zellgruppe würde ohne Berücksichtigung der FOXP3-Expression fälschlicherweise zu Treg gezählt werden und Treg-Änderungen suggerieren, die eigentlich eine Änderung dieser FOXP3⁻ Zellen - der mutmaßlichen Effektorzellen - ist.

Zudem ist die Aussagekraft der Messungen der PBMC-Subpopulationen (wie sie in dieser und vielen anderen zitierten Arbeiten (s. Tab.8) durchgeführt wurde) in Bezug auf den Einfluss auf die Tumorentstehung oder -ausbreitung limitiert. Es ergibt sich keine Aussage über die Häufigkeit der Zellen in der Tumorumgebung.

Bei vielen Tumoren wurde ein höherer Treg-Anteil in tumorinfiltrierenden Lymphozyten (TIL) und in regionale Lymphknoten-infiltrierenden Lymphozyten als im peripheren Blut gefunden: beim Prostatakarzinom (Miller, 2006), beim Pankreas- und Mammakarzinom (Liyanage, 2002), sowie auch beim UC (Chi, 2010). Auch die Treg-Häufigkeit im peripheren Blut ist in diesen Arbeiten jedoch gegenüber gesunden Kontrollen erhöht, sodass man davon ausgehen könnte, mit einer alleinigen Untersuchung der PBMCs eine grundsätzliche Erhöhung der Treg-Anteile zu erkennen.

Zum Beispiel durch Induktion von Treg über TGFβ in der Tumorumgebung, das von Tumorzellen produziert wird (Yuan, 2011), können höhere Treg-Anteile im Tumorgewebe im Vergleich zum peripheren Blut auftreten (Nizar, 2010). Außerdem ziehen Tumoren Treg chemotaktisch an, z.B.: durch CCL22 (beim Ovarialkarzinom (Curiel, 2004)), SDF 1 Alpha (beim Prostatakarzinom (Miller, 2006)), oder durch CCL5 (beim Pankreaskarzinom (Tan, 2009)). Deshalb könnte ein vermehrtes Vorkommen im Tumorgewebe ohne Treg-Häufung im Blut durchaus möglich sein. Woo et al fanden beim nicht-kleinzelligen Lungenkarzinom eine Erhöhung des Treg-Anteils in Tumor-assoziierten Lymphozyten ohne Erhöhung der Treg-Häufigkeit im peripheren Blut (Woo, 2001).

Um genauere Aussagen bezüglich des Einflusses von Immunzellen auf das UC zu treffen sollten Untersuchungen der Lymphozyten aus Tumorgewebe und tumorassoziierten Lymphknoten durchgeführt werden.

Studie	Tumorlokalisation	Material	Treg-Definition	Ergebnis: Anteil der Treg in %
Ge 2012	Mamma	PBMC	CD4 ⁺ CD25 ^{high} FOXP3 ⁺	Treg in % an CD4 ⁺ Zellen Gesunde Kontrollen 4,3 Mamma 5,1 (p>0,05)
Miller 2006	Prostata	PBMC/TIL	CD4 ⁺ CD25 ^{high}	Treg in % an CD4 ⁺ Zellen Gesunde Kontrollen 0,5 ± 0,1 Prostata 2,3 ± 0,7 (p<0,01) Kontrollen tumorfreies Gewebe 6,9 ± 0,8 Prostata TIL 11,3 ± 1,3 (p<0,05)
Liyanage 2002	Pankreas/ Mama	PBMC/ TIL	CD4 ⁺ CD25 ⁺	Treg in % an CD4 ⁺ Zellen Gesunde/benigne Kontrolle 8,6 ± 0,71 Brust 16,6 ± 1,22 (p<0,01) Pankreas 13,2 ± 1,13(p<0,01) Brust TIL 20,2 ± 3,93 Pankreas TIL 20,1 ± 4,3
Ichihara 2003	Magen/Oesophagus	PBMC	CD4 ⁺ CD25 ⁺	Treg in % an CD3 ⁺ Zellen Gesunde Kontrollen 8,9 ± 3,5 Magen 18,2 ± 4,1 (p<0,05) Ösophagus 26,5 ± 4,9 (p<0,05)
Schaefer 2005	Kopf/Hals	PBMC	CD4 ⁺ CD25 ^{high}	Treg in % an PBMCs Gesunde Kontrollen 5,47 ± 2,7 Kopf/Hals 10,1 ± 4,7 (p<0,05)
Loskog 2007	Urothel	PBMC	CD4 ⁺ CD25 ⁺	Treg in % an CD4 ⁺ Zellen Gesunde Kontrollen 4,2 ± 1,7 Blase 77 ± 5,3 (keine Korrelation mit Tumorstadium oder –Grad)

Studie	Tumorlokalisation	Material	Treg-Definition	Ergebnis: Anteil der Treg in %
Sasada 2003	Gastrointestinal	PBMC	CD4 ⁺ CD25 ⁺	Treg in % an CD4 ⁺ Zellen Gesunde Kontrollen 26.5 ± 4.7 Magen 43.7 ± 12.7 (p=4×10 ⁻⁹) Kolorektal 39.7 ± 11.3 (p=9×10 ⁻⁷) Pankreas 44.0 ± 9.0 (p=9×10 ⁻⁶) Ösophagus 47.0 ± 9.8 (p=1×10 ⁻⁷) Leber 42.1 ± 14.7 (p=9×10 ⁻⁴)
Chi 2010	Urothel	PBMC/TIL	CD4 ⁺ CD25 ^{high}	Treg in % an CD4 ⁺ Zellen Gesunde Kontrollen 2,4 ± 1 Blase 8,7 ± 5,4 (p<0,05) Blase TIL 15,4 ± 9,9
Kono 2006	Magen/Oesophagus	PBMC	CD4 ⁺ CD25 ^{high}	Treg in % an CD4 ⁺ Zellen Gesunde Kontrollen 1,9 ± 1,1 Magen 4,9 ± 1,2 (p<0,01) Oesophagus 5,2 ± 2,1 (p<0,01) Zunehmende Treg-Anteile mit zunehmendem Tumorstadium; Treg-Abfall nach Tumorresektion; Hohe Treg-Anteile korrelieren mit kürzerem Überleben
Clarke 2006	Kolon	PBMC	CD4 ⁺ CD25 ⁺ FOXP3 ⁺	Treg in % an CD4 ⁺ Zellen Gesunde Kontrollen 0,46 Kolon 1,13 (p=0,007)

Studie	Tumorlokalisation	Material	Treg-Definition	Ergebnis: Anteil der Treg in %
Zhang 2010	HCC	PBMC/TIL	CD4 ⁺ CD25 ⁺ FOXP3 ⁺	Treg in % an CD4 ⁺ Zellen Gesunde Kontrollen 1,67 ± 0,73 Leber 4,26 ± 4,18 (p<0.01) Kontrollen tumorfreies Gewebe 3,54 ± 1,30 Leber TIL 15,77 ± 1,45 (p<0,01) Zunehmende Treg-Anteile mit zunehmendem Tumorstadium
Curiel 2004	Ovar	TIL	CD4 ⁺ CD25 ⁺	Mehr Treg in Stadium 3-4 verglichen mit Stadium 1 Schlechtere Prognose mit höheren Werten tumorinfiltrierender Treg
Salama 2009	Kolon	TG	FOXP3 ⁺	Treg pro mm ² TG Kontrollen tumorfreies Gewebe 44 Kolon TG 116 (p<0,0001) Bessere Prognose mit höheren Werten tumorinfiltrierender Treg
Winerdal 2011	Urothel	TIL	CD3 ⁺ FOXP3 ⁺	Bessere Prognose mit höheren Werten tumorinfiltrierender Treg

Tabelle 8

Übersicht über Arbeiten zum Vergleich der Treg-Häufigkeit zwischen Tumorpatienten und Kontrollen

TG = Tumorgewebe, TIL = Tumorinfiltrierende Lymphozyten, PBMC = peripheral blood mononuclear cells

5.3 Tumorimmunantwort

Bei der Untersuchung auf die Spezifität der Tumor-Immunantwort im ELISpot ergaben sich insgesamt deutlich höhere Anteile an UC-Patienten, die eine TAA-spezifische Antwort zeigten als bei den Kontrollen. Dies entspricht den Erwartungen, dass durch das Vorhandensein von TAAs TAA-spezifische Immunzellen aktiviert werden. Allerdings ist es erstaunlich, dass tumorfreie Patienten überhaupt TAA-spezifische Reaktionen zeigen. Hier wäre eine

Langzeitbeobachtung im Hinblick auf eine mögliche Tumorentwicklung bei diesen Patienten interessant.

Das einzige TAA, das im ELISpot ohne Treg-Depletion für das UC immunologisch bedeutsam scheint, ist EGFR, da es im Vergleich von Patienten und Kontrollen bei den Patienten deutlich häufiger zu einer spezifischen Immunantwort führt. Für EGFR brachte die Treg-Depletion weder bei den Kontrollen noch bei den Patienten eine signifikante Änderung an reagierenden Patienten. Aufgrund der deutlichen Unterschiede zwischen UC und Kontrollen ohne Treg-Depletion scheint EGFR ein eindeutiges, relevantes Tumorantigen des UC zu sein. Die Immunantwort, die EGFR induziert, wird aber wohl nicht durch Treg-Bildung oder -Aktivierung beeinflusst.

Die anderen TAAs, auf die ein hoher Anteil UC-Patienten reagiert (MUC100, Heparanase, HER2), werden auch von den Kontrollpatienten immunologisch erkannt. Unter Treg-Depletion allerdings gibt es in der UC-Gruppe für die beiden Peptide NYESO1 und MUC1 signifikant höhere Anteile an antwortenden Patienten als in der Kontrollgruppe. Dies ist nicht nur durch die Abnahme der Antworten in der Kontrollgruppe unter Treg-Depletion (für beide Peptide 0%) bedingt sondern auch durch die Zunahme der antwortenden UC-Patienten unter Treg-Depletion (NYESO1: vor Treg-Depletion 4,8%, nach Treg-Depletion 19,4%; MUC1: vor Treg-Depletion 3,1%, nach Treg-Depletion 26,9%). Es ließ sich auch bestätigen, dass nicht nur ein höherer Patientenanteil auf die beiden TAAs nach Treg-Depletion reagiert, sondern, dass es in diesen Patienten auch tatsächlich zu einer erhöhten TAA-spezifischen T-Zell-Aktivität kommt. Dies spricht dafür, dass die Immunantwort auf NYESO1 und MUC1 beim UC meist unter supprimierender Kontrolle von Treg steht. Wie oben bereits beschrieben, scheint diese Immunantwort auch bei einigen Gesunden vorhanden zu sein, wo sie allerdings nicht von Treg maskiert wird. Dies bestätigt die mögliche Theorie, dass Treg erst bei Vorhandensein eines Tumors vermehrt gebildet bzw. aktiviert werden. Eine Wiederherstellung der Immunantwort auf NYESO1 nach Treg-Depletion wurde in vitro auch für Immunzellen aus HCC-Patienten (Zhang, 2010) sowie Melanom-Patienten (Sugiyama, 2013) nachgewiesen, für das leukämische T-Zell-Lymphom wurde sogar in vivo die NYESO1-spezifische CD8 T-Zell-Reaktion durch eine Treg-Depletion verstärkt (Sugiyama, 2013).

Zusammenfassend lässt sich aus diesen Ergebnissen vorläufig schließen, dass sowohl EGFR als auch NYESO1 und MUC1 als therapeutische Targets bei der Therapie des UC, z.B. für eine Vakkzinierung, in Betracht kommen, die beiden letzteren allerdings nur in Kombination mit einer therapeutischen Treg-Depletion.

Die Häufigkeit der gesamten TAA-spezifisch antwortenden T-Zellen verändert sich beim lokalisierten Tumor unter Treg-Depletion nicht. Wie Bonertz et al 2009 und auch Clarke et al 2006 für das Kolon-Karzinom beschrieben haben, wäre ein Anstieg von T-Zell-Antworten unter Ausschaltung der supprimierenden Treg zu erwarten gewesen. Voraussetzung hierfür ist allerdings, dass die depletierten Treg TAA-spezifisch sind, was im Treg-Spezifitäts-Assay näher untersucht wurde und nicht bestätigt werden konnte (s. unten). Beim metastasierten Tumor zeigte sich eine Zunahme der T-Zell-Antworten unter Treg-Depletion, welche allerdings aufgrund von multiplen Testen innerhalb eines Patienten statistisch nicht signifikant ist. Das tendenzielle Ergebnis spricht dafür, dass Treg möglicherweise erst in fortgeschrittenem Tumorstadium aktiviert werden und hier die Anti-Tumor-Immunantwort supprimieren. Diese Hypothese müsste mit höheren Probandenzahlen bestätigt werden.

Folglich wäre dann in diesen Stadien eine therapeutische Treg-Depletion, wie sie z.B. mit Anti-CD25-Antikörpern (Byrne, 2011) oder Cyclophosphamid (Ghiringhelli, 2007) möglich ist, sinnvoll und erfolgversprechend.

Dass die Stärke einer Immunantwort auf ein TAA ähnlich hoch ist wie auf ein bakterielles Antigen, lässt auf die Effektivität und Relevanz solcher Immunreaktionen schließen und rechtfertigt deren genaue Untersuchung im Hinblick auf ein besseres Verständnis der Tumorummunologie und damit auch mögliche Ansätze einer Tumorthherapie. Zudem bestätigt dieses Ergebnis die Detektierbarkeit einer TAA-Immunantwort mittels der angewandten Methoden.

Im Gegensatz zur Durchflusszytometrie wurden im ELISpot – wie auch im Treg-Spezifitäts-Assay - auch in dieser Arbeit Treg als $CD4^+ CD25^{high}$ -T-Zellen definiert. Der spezifischere Marker für Treg, FOXP3, ist - da es sich um einen Transkriptionsfaktor handelt - intrazellulär lokalisiert, weshalb er nicht ohne Zellpermeabilisierung markiert werden kann. Mit permeabilisierten Zellen kann ein ELISpot-Test nicht durchgeführt werden, da man hier vitale Zellen benötigt. CD25 wird außer von Treg auch von aktivierten nicht regulatorischen T-Zellen exprimiert. Somit kann man nicht alle Eigenschaften dieser untersuchten Zellpopulation sicher auf Treg beziehen. Diese bislang nicht überwindbare Problematik besteht allerdings bei allen derartigen Studien, sodass die Vergleichbarkeit mit anderen Arbeiten diesbezüglich nicht eingeschränkt ist.

Da nicht im peripheren Blut zirkulierende Zellen nicht Gegenstand der Arbeit waren, limitieren sich auch im ELISpot die Untersuchungen auf PBMCs, was die Genauigkeit der Ergebnisse im

Hinblick auf eine generelle Beurteilung der Immunantwort beim UC möglicherweise einschränkt. Aufgrund der Chemotaxis durch den Tumor könnten in den PBMCs generell weniger TAA-spezifische Teff und Treg vorkommen als im Tumorgewebe.

Außerdem gibt es Untersuchungen, die zeigen, dass tumorinfiltrierende Treg deutlich stärker aktiviert sind als Treg im peripheren Blut (Pedroza-Gonzalez, 2013). Möglicherweise ist dies nicht ausschließlich durch die Anwesenheit der TAA bedingt, sondern auch durch andere Faktoren im Tumormilieu. Demnach wäre eine in-vitro-Aktivierung der T-Zellen durch alleinige Präsentation von TAA-Peptiden unter Umständen nicht möglich.

5.4 Änderungen unter Therapie

Erstaunlicherweise ergab sich bei keiner der untersuchten Therapieformen eine Veränderung der Häufigkeit von Treg im Therapie-Verlauf. Die Häufigkeit der zufällig beobachteten $CD4^+$ $CD25^+$ $FOXP3^-$ Zellen fiel nach Zystektomie ab und erhöhte sich nach palliativer bzw. neoadjuvanter Chemotherapie.

Das Ausbleiben einer Änderung der Treg-Häufigkeit nach Zystektomie steht im Kontrast zu 2006 gefundenen Daten bezüglich des Magen-Karzinoms, bei dem die Treg-Anteile nach kurativer Tumoresektion auf physiologische Werte abfielen (Kono, 2006). Dieser Unterschied beruht möglicherweise auf der oben erwähnten unterschiedlichen Treg-Definition, Kono et al. definierten Treg als $CD4^+$ $CD25^+$ T-Zellen unabhängig von FOXP3. (Kono, 2006) Diese Zellpopulation zeigte auch in den vorliegenden Ergebnissen einen Abfall nach Zystektomie. Die Häufigkeit von Treg im peripheren Blut scheint also nicht (mehr) direkt unter dem Einfluss des Tumors zu stehen. Ein Widerspruch zur der oben beschriebenen erhöhten TAA-spezifischen Aktivität bei metastasierten Tumoren unter Treg-Depletion ergibt sich durch dieses Ergebnis nicht. Der Tumor bedingt möglicherweise eine Aktivierung der Treg, die nicht mit einer Proliferation derselben einhergeht.

Auch nach der Chemotherapie mit Gemcitabine und Cisplatin bleibt die Häufigkeit der Treg unverändert. Dieses Ergebnis stimmt mit bisherigen Ergebnissen zum multiplen Myelom überein, wo ebenso keine signifikanten Unterschiede in der Treg-Häufigkeit nach Chemotherapie mit Cyclophosphamid, Thalidomid und Dexamethason gefunden werden konnten. Eine Ausnahme stellte hier die Kombinationschemotherapie mit Melphalan, Thalidomid und Prednison dar, bei der ein kontinuierlicher Anstieg der Treg über sechs Monate festgestellt wurde. (Giannopoulos, 2012) Widersprüchliche Ergebnisse fanden Xu et al. zum

Oesophaguskarzinom, bei dem Treg im peripheren Blut und die FOXP3-Expression der Treg nach Chemotherapie deutlich abnahmen (Xu, 2011). Durch eine Chemotherapie mit Cyclophosphamid wird ebenfalls eine Treg-Depletion induziert – wie Ghiringhelli et al für einige Patienten mit metastasiertem Gastrointestinalen Tumor, Nierenzellkarzinom, Ovarialkarzinom, Pleuramesotheliom, Melanom und Sarkom nachweisen konnten (Ghiringhelli, 2007). Gemcitabine eliminiert immunsuppressiv wirkende Myeloid-derived suppressor cells (s. 2.3.1 Allgemeine Tumorimmunologie) (Galluzzi, 2012). Viele Chemotherapeutika induzieren aber auch ein Erhöhung der Treg, so z.B. Epirubicin und Paclitaxel beim Mamma-Karzinom sowie Carboplatin beim Bronchial- und Ovarialkarzinom. Die metronomische orale Gabe von Vinorelbine beim Bronchial-, Mamma- und Prostatakarzinom und von Capecitabine und Temozolomid beim Kolonkarzinom aktiviert die Treg sogar noch stärker. (Koumarianou, 2014)

Hohe Anteile regulatorischer T-Zellen im Tumorgewebe, z.B. beim Ovarialkarzinom (Curiel, 2004), aber auch im peripheren Blut, z.B. Magen- und Ösophagus-Karzinom (Kono, 2006), sind oft mit einer schlechten Prognose der Tumorpatienten vergesellschaftet. Nach den vorliegenden Ergebnissen werden die Treg von der konventionellen Chemotherapie zwar nicht unterhalten, aber auch nicht dezimiert. Es scheint nötig, sie anderweitig gezielt therapeutisch anzugreifen, um die Tumorimmunität zu fördern. Hier gibt es schon erste Ansätze, z.B. mit Cyclophosphamid, das zu einem kurzfristigen Absinken der Treg führt (Ge, 2012) oder Anti CD25-Antikörpern beim Mamma-Karzinom (Rech, 2009; Ge, 2012). (s. Tabelle 9)

Studie	Tumorlokalisation	Treg-Definition	Therapie	Effekt
Ghiringhelli 2007	Kolon/Rektum, Magen, Niere, Pleura, Ovar, Melanom , Sarkom	CD4 ⁺ CD25 ⁺	Cyclophosphamid	Abfall von Treg in PBMC und ihrer inhibitorischen Funktion
Xu 2011	Oesophagus	CD4 ⁺ CD25 ^{high}	Chemotherapie nicht näher benannt	Abfall der Treg in PBMC
Ge 2012	Mamma	CD4 ⁺ CD25 ^{high} FOXP3 ⁺	metronomisch Cyclophosphamid	Initialer Abfall der Treg, reversibel nach 3 Monaten Therapie
Giannopoulos 2012	Multiples Myelom	CD4 ⁺ CD25 ^{high} FOXP3 ⁺	Cyclophosphamid, Thalidomid, Dexamethason	Keine Veränderung der Treg- Häufigkeit
			Melphalan, Thalidomid, Prednison	Anstieg der Treg
Koumariou 2014	Mamma, Lunge	CD4 ⁺ CD25 ⁺	Epirubicin/ Paclitaxel;	Verhältnis Treg/Teff steigt
	Ovar		Carboplatin	
	Mamma, Lunge, Prostata;		metronomisch Vinorelbine;	Verhältnis Treg/Teff steigt noch mehr
	Kolon/Rektum		metronomisch Capecitabine/ Temozolomid	

Tabelle 9

Übersicht über Arbeiten zum Einfluss von Chemotherapeutika auf die Häufigkeit von Treg

Im Gegensatz zu den Treg ergaben sich für die beobachteten FOXP3⁻ CD25⁺ T-Effektor-Zellen relevante Unterschiede in der Häufigkeit nach Therapie.

Nach Tumorresektion wurde ein geringerer Anteil aktivierter T-Zellen gefunden als davor. Möglicherweise stehen sie unter dem erhaltenden Einfluss des Tumormilieus. Durch die

Zystektomie werden - beim lokalisierten Tumor im Idealfall alle, sonst eine Vielzahl von - TAAs entfernt. Diese haben vor Tumorentfernung Effektorzellen aktiviert und ihre Proliferation unterhalten, was nach OP wegfällt.

Nach neoadjuvanter bzw. palliativer Chemotherapie zeigte sich ein Anstieg der aktivierten T-Zellen. Eine noch nicht ausreichend valide, aber nicht unwahrscheinliche Hypothese und mögliche Ursache dieses Ergebnisses ist, dass die Effektivität von Chemotherapeutika nicht allein auf ihrer zytotoxischen und damit Tumorzell-reduzierenden Wirkung beruht; es gibt Hinweise darauf, dass ein maßgeblicher Teil auch in der Immunmodulation während der Chemotherapie besteht. Trotz der im Allgemeinen induzierten Lymphopenie können Zytostatika (wie Oxaliplatin und Anthrazykline) durch das Auslösen des immunogenen Zelltods Immunreaktionen gegen TAAs hervorrufen, z.B. durch die erleichterte Präsentation von Tumorantigenen durch DC während des Untergangs von Tumorzellen. (Zitvogel, 2011) Solch ein Vorgang könnte somit auch zu einer erhöhten Häufigkeit von Effektor-T-Zellen führen, die z.B. nach Behandlung mit Taxanen bei Mammakarzinompatienten beobachtet wurde (Carson, 2004). Für Cisplatin und Gemcitabine wurde ein Auslösen des immunogenen Zelltods bisher nicht konkret nachgewiesen (Galluzzi, 2012), der hier beobachtete Anstieg der CD 25⁺ FOXP3⁻ T-Zellen nach Therapie spricht allerdings für einen solchen oder ähnlichen Mechanismus, bei dem z.B. durch Tumorzellerfall TAAs freigesetzt werden und zur Bildung tumorspezifischer T-Zellen und damit Zunahme der gesamten Effektorzellen führt.

Erstaunlich ist, dass die Treg aber durch derartige Veränderungen im TAA-Vorkommen scheinbar nicht beeinflusst werden.

Bei der adjuvanten Chemotherapie lässt sich – wie bei den Kontrollpatienten – keine Änderung feststellen, möglicherweise da hier der Tumor mit der Masse an immunogenen TAAs bereits entfernt wurde.

Trotz gleichbleibender Häufigkeit der Treg im peripheren Blut ändert sich z.T. deren Einfluss auf die T-Zellen und wiederum deren Reaktion auf TAAs im Therapieverlauf.

Der Effekt der Treg-Depletion wird bei den Zystektomie-Patienten vor Therapie deutlich. Hier antworten unter Ausschaltung der Treg signifikant mehr T-Zellen auf die Gesamtheit der TAAs als unter dem Einfluss der Treg. Es liegen also regulatorische T-Zellen vor, die Effektor-T-Zellen unterdrücken, welche erst ohne Treg aktiv werden.

Nach Zystektomie ist diese Änderung bei Treg-Depletion nicht mehr zu beobachten. Ursache könnte sein, dass auch Treg – die in ihrer Häufigkeit gleichbleiben - in ihrer Aktivität vom Tumormilieu abhängig sind. Der hypothetisch fehlende Einfluss von Treg nach Zystektomie

scheint zunächst widersprüchlich zur Abnahme aktivierter T-Zellen nach Zystektomie. Eine Erklärung ist, dass viele TAAs bei der Zystektomie entfernt werden und somit unabhängig von der Treg-Anzahl bzw. -Aktivität nach Therapie eine geringere Anzahl TAA-aktivierter T-Zellen zu finden ist. Dies würde bedeuten, dass sowohl die Treg als auch die Teff, zumindest in aktivierter Form, vom Tumor abhängig sind.

Bei der Chemotherapie zeigt sich in der Gesamtheit der Patienten keinerlei Veränderung im Einfluss der Treg auf die T-Zell-Antworten im Therapieverlauf. Auch unabhängig von den Treg waren keine Veränderungen in der allgemeinen TAA-Antwort durch die Chemotherapie zu beobachten. Dies unterstützt die oben beschriebene Hypothese nicht, dass durch TAA-Freisetzung der Chemotherapie, vermehrt TAA-spezifische T-Zellen induziert werden. Wäre dies der Fall müsste eine Erhöhung der TAA-T-Zell-Antworten nach Chemotherapie zu sehen sein. Auch durch Supprimierung der T-Zellen durch Treg ist dies nicht zu erklären, da die Antworten auch nach Treg-Depletion nicht zunehmen. Cisplatin bewirkt eine erhöhte Permeabilität von Tumorzellen für Granzym B aus zytotoxischen T-Zellen (Ramakrishnan, 2010). Demnach wäre eine Theorie, dass eine besonders hohe TAA-Immunantwort unter Kombination von Chemotherapie und Treg-Depletion, die eine gesteigerte Aktivität $CD8^+$ zytotoxischer T-Zellen zur Folge hätte, zu erreichen wäre. Auch diese Theorie ließ sich hier nicht bestätigen.

Erstaunlich ist, dass eine Treg-Depletion vor Chemotherapie keinerlei Auswirkungen hat, während sie vor Zystektomie die TAA-Immunantwort deutlich steigert. Tendenziell haben die Chemotherapie-Patienten weiter fortgeschrittene Tumorstadien. Möglicherweise ist hier eine Unterdrückung von Teff durch Treg schon nicht mehr reversibel und kann somit nicht mit einer in vitro-Treg-Depletion aufgedeckt werden.

Die Aussagekraft in Bezug auf den Einfluss der Chemotherapien ist durch eine geringe Probandenzahl eingeschränkt. Die gemäß der Hypothese erwarteten Reaktionen einer verstärkten T-Zell-Reaktion nach Chemotherapie und nach Treg-Depletion waren nur bei einzelnen Patienten zu beobachten und statistisch nicht signifikant. Erneute Untersuchungen mit größerer Patientenzahl sind allerdings notwendig, um die Ergebnisse genau zu überprüfen.

Die Indikation zur Zystektomie als Therapie der ersten Wahl beim muskelinvasiven UC steht außer Frage. Das Ausschalten einer supprimierenden Treg-Wirkung scheint angesichts der generell als negativ angenommenen Rolle der Treg bei Tumorpatienten ein positiver Nebeneffekt der Operation neben der reinen Tumorentfernung zu sein. Ein tatsächlich positiver Effekt im

Sinne einer stärkeren TAA-Immunantwort ließ sich allerdings, zumindest auf alle TAAs im Gesamten nicht bestätigen.

Da die Chemotherapie keinen Einfluss auf das Vorkommen von Treg hat, scheint es nicht – wie man aus manch anderen Studien schließen könnte - notwendig oder zielführend, eine Chemotherapie mit einer Treg-Depletion zu kombinieren. Allerdings muss die Richtigkeit der vorliegenden Ergebnisse genauer überprüft werden, vor allem im Hinblick auf TIL.

TAA-spezifische Antworten wurden nicht im Therapieverlauf untersucht. Hier wären vor allem die - ohne Berücksichtigung der Standardtherapie - als relevant eingeschätzten TAAs und die unter Treg-Einfluss stehenden TAAs wie NYESO1 und MUC1 und EGFR interessante Untersuchungsziele weiterer Studien.

5.5 Spezifität regulatorischer T-Zellen

Zur Identifikation TAA-spezifischer Treg wurde eine relativ neue Methode gewählt, die bislang zur Bestätigung der regulatorisch-supprimierenden Wirkung von Treg, z.B. von Liyanage et al 2002, verwendet wurde. Da die supprimierende Wirkung von FOXP3⁺ Treg mittlerweile sehr häufig bestätigt wurde, kann sie für die spezifischeren Untersuchungen vorausgesetzt werden.

Anders als in bisherigen Untersuchungen (Bonertz, 2009), wurden TAA-spezifische Treg für HER2, Heparanase und p53 nicht nur in UC-Patienten sondern auch in der Kontrollgruppe gefunden. Dies deutet darauf hin, dass TAA-spezifische Treg nicht ausschließlich in Abhängigkeit eines Tumors entstehen. Gegen p53 reaktive Treg wurden in sehr hohem Maße auch bei den UC-Patienten (fast 80%) gefunden. Der Vergleich mit den ELISpot-Ergebnissen zeigte allerdings keine Zunahme der Teff-Reaktion auf p53 unter Treg-Depletion. In Zusammenschau dieser Ergebnisse könnte hier möglicherweise eine Subgruppe regulatorischer T-Zellen vorliegen, die großenteils bereits im Gesunden vorliegen und keine supprimierende Wirkung haben.

Als UC-spezifische TAAs konnten NYESO1, MUC1, EGFR, Survivin und MAGE-A4 identifiziert werden, für die spezifische Treg bei den UC-Patienten nicht aber bei den Kontrollen vorlagen.

Das Vorhandensein spezifischer Treg für TAAs (NYESO1, MUC1, EGFR, Survivin und MAGE-A4) bei den UC-Patienten und das Fehlen dieser bei den Kontrollen bestätigt die Ergebnisse von Bonertz et al bezüglich des Kolonkarzinoms (Bonertz, 2009). Dieses Ergebnis deutet auf einen möglichen Nutzen einer therapeutischen Treg-Depletion hin. Andersherum zeigt es einen Grund, warum Vakzinierungen mit diesen TAAs möglicherweise nicht den

gewünschten Effekt zeigen könnten. Durch die Impfung hervorgerufene TAA-spezifische Effektorzellen würden unter Umständen von den TAA-spezifischen Treg unterdrückt. Ein ähnliches Phänomen wurde für Myeloid-derived suppressor cells gefunden, deren Vorhandensein die Etablierung MUC1-spezifischer Effektor- und Memory-T-Zellen nach MUC1-Vakzinierung in Vorstufen des Kolonkarzinoms verhinderte (Kimura, 2013). Somit wäre über eine Kombination von Vakzinierung und Treg-Depletion nachzudenken.

Die Hypothese, dass regulatorische T-Zellen im UC vorliegen und eine fehlende Tumormunität bedingen, konnte anhand der bisherigen Ergebnisse noch nicht eindeutig bestätigt werden. Unabhängig von der allgemeinen Treg-Häufigkeit im Blut und dem Versuch eine Aussage über die Treg mittels der Teff-Antwort unter Treg-Depletion zu treffen, deutet das Ergebnis des Treg-Spezifitäts-Assays stark auf die Richtigkeit dieser Hypothese hin. Zumindest für die Peptide NYESO und MUC1 konnten auch die ELISpot-Daten zeigen, dass spezifische Treg vorliegen, die eine Teff-Reaktion auf die TAA verhindert. Diese Ergebnisse beziehen sich allerdings stets auf die gesamte Patientenpopulation. Die Vermutung, dass in einem Patienten, der TAA-spezifische Treg aufweist, die Teff-Reaktion auf genau dieses TAA unter Treg-Depletion ansteigen müsste, wurde überprüft. Die ELISpot-Daten und die Daten des Treg-Spezifitäts-Assays aus jeweils demselben Patienten wurden direkt miteinander verglichen. Es zeigte sich erstaunlicherweise bei fast keinem Patienten eine Korrelation zwischen TAA-spezifischer Teff-Antwort unter Treg-Depletion und dem Vorliegen TAA-spezifischer Treg. Das Vorkommen der spezifischen Treg in einem Patienten führt folglich nicht zur Unterdrückung einer spezifischen TAA-Immunantwort dieses Patienten bzw. kann eine solche Immunantwort, falls sie von Treg unterdrückt wurde, nicht durch die Ausschaltung der Treg wieder etabliert werden. Möglicherweise wird schon die Bildung TAA-spezifischer Teff durch die Treg verhindert und nicht nur ihre Aktivität unterdrückt. Gegen diese Annahme sprechen allerdings die ELISpot-Ergebnisse, die zeigten, dass TAA-spezifische Effektorzell-Antworten auch vor Treg-Depletion vorhanden sind. Eine andere Ursache für die Abweichung der ELISpot-Ergebnisse von denen des Treg-Spezifitäts-Assays könnte eine unvollständige Depletion der Treg im ELISpot-Test sein (hier als $CD4^+ CD25^+$ definiert). Dies könnte auch die Diskrepanz zwischen dem Vorkommen spezifischer Treg für EGFR, Survivin sowie MAGE-A4 und dem fehlenden Anstieg der Immunantwort auf diese Peptide nach Treg-Depletion im ELISpot erklären.

6. Zusammenfassung

Das muskelinvasive Urothelkarzinom (UC) ist eine häufige maligne Erkrankung und hat in fortgeschrittenem Stadium eine schlechte Prognose.

Das Immunoediting mit den Phasen Elimination, Equilibrium und Escape ist als Prinzip der Entstehung und Ausbreitung maligner Tumoren anerkannt. Während Tumorantigene (TAA) für die Entstehung einer Tumor-Immunantwort von Relevanz sind, verliert sich die Tumorummunität in der Escape-Phase durch verschiedenste Vorgänge, an denen unter anderem immunsuppressive regulatorische T-Zellen (Treg) und die Hochregulation von Checkpoint-Faktoren, wie CTLA-4 oder PD1, beteiligt sind.

Immuntherapeutische Methoden haben sich sowohl mit der BCG-Therapie beim nicht-muskelinvasiven UC als auch mit PD1/PD-L1 blockierenden Substanzen beim muskelinvasiven UC als wirksam erwiesen.

In dieser Studie wurden bei 56 Patienten mit muskelinvasivem oder metastasiertem UC die Häufigkeit regulatorischer T-Zellen mittels Durchflusszytometrie bestimmt sowie die Frequenz und Stärke der Immunantwort auf ein prädefiniertes Set von neun Tumorantigenen mittels IFN γ -ELISpot gemessen. Weiterhin wurde der Einfluss von Treg auf die TAA-spezifische Immunantwort untersucht und der Einfluss therapeutischer Maßnahmen auf die immunologischen Parameter evaluiert. Zuletzt wurden Treg auf ihre TAA-Spezifität mittels eines Proliferations-Hemmtests untersucht. 13 Patienten mit einer benignen Prostata-Hyperplasie dienten als Kontrolle.

Bei den Patienten mit einem Urothelkarzinom lag die gleiche Frequenz von Treg vor wie bei den Kontrollen. Von den neun untersuchten TAAs löste EGFR bei der gesamten T-Zell-Population eine Immunantwort aus. Nach Treg-Depletion ließ sich eine Immunantwort auf NYESO1 und MUC1 häufiger als bei den Kontrollen nachweisen. Spezifische Treg lagen für NYESO1, MUC1, EGFR, Survivin und MAGE-A4 vor. Auch in der Kontroll-Gruppe lagen TAA-spezifische Treg vor, allerdings für andere TAAs. Eine Treg-bedingte Suppression einer bestimmten TAA-Immunantwort trat nicht bei denselben Patienten auf, bei denen spezifische Treg für dieses TAA gefunden wurden. Im Verlauf der Standardtherapie wurden keine Änderungen des Treg-Vorkommens beobachtet. Ein supprimierender Einfluss von Treg auf die TAA-Immunantwort zeigte sich bei den Zystektomie-Patienten präoperativ. Nach Zystektomie ließ sich dieser nicht mehr nachweisen. Unter Chemotherapie konnten keine signifikanten Änderungen in der Immunreaktion oder im Treg-Einfluss auf diese festgestellt werden.

Aus den genannten Ergebnissen lässt sich schließen, dass - im Gegensatz zu anderen Malignomen - beim UC die Häufigkeit der Treg im peripheren Blut weder mit dem Auftreten noch mit dem Voranschreiten des Tumors korreliert. NYESO1, MUC1, EGFR, Survivin und MAGE-A4 konnten als relevante Tumorantigene - und somit mögliche Therapie-Targets - des UC identifiziert werden. Unabhängig von ihrer unveränderten Häufigkeit scheinen Treg dennoch eine relevante Rolle beim UC zu spielen. Gezeigt werden konnte, dass die Immunantwort auf NYESO1 und MUC1 von Treg - zumindest teilweise - maskiert wird. Eine therapeutische Treg-Depletion könnte hier ein vielversprechender Ansatzpunkt sein. Neben NYESO1 und MUC1 scheint EGFR ein UC-spezifisches TAA zu sein, das unabhängig von Treg-Einfluss eine Immunantwort auslöst und somit Ziel einer gerichteten immunologischen Therapie wie einer TAA-Vakzine oder Antikörper-Behandlung darstellen könnte. Spezifische Treg lagen für NYESO1, MUC1, EGFR, Survivin und MAGE-A4 vor. Da eine Treg-bedingte Suppression einer bestimmten TAA-Immunantwort nicht bei denselben Patienten auftrat, bei denen spezifische Treg für dieses TAA gefunden wurden, ist davon auszugehen, dass der immunsuppressive Effekt der Treg eher TAA-unabhängig stattfindet. Aufgrund des ausbleibenden immunsupprimierenden Einflusses der Treg nach Zystektomie, scheint die immunsuppressive Aktivität von Treg vom Vorhandensein des Tumors abhängig zu sein.

Um Konsequenz für die Therapie des UC ziehen zu können, sollten die genannten Ergebnisse durch detaillierte Folge-Untersuchungen - auch an Tumorgewebe bzw. tumorinfiltrierenden Lymphozyten, die sich möglicherweise anders verhalten als PBMCs, und letztendlich auch in vivo - weiter überprüft werden. Auch wenn darüber hinaus Langzeit-Untersuchungen bezüglich des Outcome von UC-Patienten in Abhängigkeit von den untersuchten immunologischen Parametern erforderlich sind, konnten in dieser Studie erste Erkenntnisse bezüglich relevanter TAAs und der immunsupprimierenden Aktivität von Treg beim UC gewonnen und diese als mögliche Therapie-Targets identifiziert werden.

7. Literaturverzeichnis

ANSELL, S. M.; LESOKHIN, A. M.; BORRELLO, I.; HALWANI, A.; SCOTT, E. C.; GUTIERREZ, M.; SCHUSTER, S. J.; MILLENSON, M. M.; CATTRY, D.; FREEMAN, G. J.; RODIG, S. J.; CHAPUY, B.; LIGON, A. H.; ZHU, L.; GROSSO, J. F.; KIM, S. Y.; TIMMERMAN, J. M.; SHIPP, M. A.; ARMAND, P. PD-1 blockade with nivolumab in relapsed or refractory Hodgkin's lymphoma. **N Engl J Med**, v. 372, n. 4, p. 311-9, Jan 22 2015. ISSN 0028-4793.

ÄRZTEBLATT. PD-Inhibitor Pembrolizumab bei mehreren Krebserkrankungen wirksam. 2015. Disponível em: < <http://www.aerzteblatt.de/nachrichten/62548> >. Acesso em: 08.10.2016.

AWMF, D.-K. Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF): S3-Leitlinie, Früherkennung, Diagnose, Therapie und Nachsorge des Harnblasenkarzinoms, Langversion 1.1, 2016, AWMF-Registrierungsnummer 03 2/038OL, <http://leitlinienprogramm-onkologie.de/Harnblasenkarzinom.92.0.html> 2016. Disponível em: < http://leitlinienprogramm-onkologie.de/uploads/tx_sbdownloader/LL_BlasenCa_Langversion_Konsultationsfassung.pdf >. Acesso em: 15.08.2016.

BABJUK, M.; BURGER, M.; ZIGEUNER, R.; SHARIAT, S. F.; VAN RHIJN, B. W.; COMPERAT, E.; SYLVESTER, R. J.; KAASINEN, E.; BOHLE, A.; PALOU REDORTA, J.; ROUPRET, M. EAU guidelines on non-muscle-invasive urothelial carcinoma of the bladder: update 2013. **Eur Urol**, v. 64, n. 4, p. 639-53, Oct 2013. ISSN 1873-7560 (Electronic) 0302-2838 (Linking).

BAECHER-ALLAN, C.; BROWN, J. A.; FREEMAN, G. J.; HAFNER, D. A. CD4+CD25high regulatory cells in human peripheral blood. **J Immunol**, v. 167, n. 3, p. 1245-53, Aug 1 2001. ISSN 0022-1767 (Print) 0022-1767 (Linking). Disponível em: < <http://www.jimmunol.org/content/167/3/1245.full.pdf> >.

BALACHANDRAN, V. P.; CAVNAR, M. J.; ZENG, S.; BAMBOAT, Z. M.; OCUIN, L. M.; OBAID, H.; SORENSON, E. C.; POPOW, R.; ARIYAN, C.; ROSSI, F.; BESMER, P.; GUO, T.; ANTONESCU, C. R.; TAGUCHI, T.; YUAN, J.; WOLCHOK, J. D.; ALLISON, J. P.; DEMATTEO, R. P. Imatinib potentiates antitumor T cell responses in gastrointestinal stromal tumor through the inhibition of Ido. **Nat Med**, v. 17, n. 9, p. 1094-100, Sep 2011. ISSN 1546-170X (Electronic) 1078-8956 (Linking).

BERGERON, A.; PICARD, V.; LARUE, H.; HAREL, F.; HOVINGTON, H.; LACOMBE, L.; FRADET, Y. High frequency of MAGE-A4 and MAGE-A9 expression in high-risk bladder cancer. **Int J Cancer**, v. 125, n. 6, p. 1365-71, Sep 15 2009. ISSN 1097-0215 (Electronic) 0020-7136 (Linking).

BÖCKER, W.; DENK, H.; HEITZ, U.; MOCH, H. **Pathologie**. 4. Germany: Elsevier, 2008. 1362 ISBN 978-3-437-42382-6.

BONERTZ, A.; WEITZ, J.; PIETSCH, D. H.; RAHBARI, N. N.; SCHLUDE, C.; GE, Y.; JUENGER, S.; VLODAVSKY, I.; KHAZAI, K.; JAEGER, D.; REISSFELDER, C.; ANTOLOVIC, D.; AIGNER, M.; KOCH, M.; BECKHOVE, P. Antigen-specific Tregs control T cell responses against a limited repertoire of tumor antigens in patients with colorectal carcinoma. **J Clin Invest**, v. 119, n. 11, p. 3311-21, Nov 2009. ISSN 1558-8238 (Electronic) 0021-9738 (Linking).

BRESLOW, N.; CHAN, C. W.; DHOM, G.; DRURY, R. A.; FRANKS, L. M.; GELLEI, B.; LEE, Y. S.; LUNDBERG, S.; SPARKE, B.; STERNBY, N. H.; TULINIUS, H. Latent carcinoma of prostate at autopsy in seven areas. The International Agency for Research on Cancer, Lyons, France. **Int J Cancer**, v. 20, n. 5, p. 680-8, Nov 15 1977. ISSN 0020-7136 (Print)
0020-7136 (Linking).

BUSSE, A.; ASEMISSEN, A.; NONNENMACHER, A.; OCHSENREITHER, S.; FUSI, A.; BRAUN, F.; STATHER, D.; SCHMITTEL, A.; MILLER, K.; THIEL, E.; KEILHOLZ, U. Systemic immune tuning in renal cell carcinoma: favorable prognostic impact of TGF-beta1 mRNA expression in peripheral blood mononuclear cells. **J Immunother**, v. 34, n. 1, p. 113-9, Jan 2011. ISSN 1537-4513 (Electronic)
1524-9557 (Linking).

BYRNE, W. L.; MILLS, K. H.; LEDERER, J. A.; O'SULLIVAN, G. C. Targeting regulatory T cells in cancer. **Cancer Res**, v. 71, n. 22, p. 6915-20, Nov 15 2011. ISSN 1538-7445 (Electronic)
0008-5472 (Linking).

CARSON, W. E., 3RD; SHAPIRO, C. L.; CRESPIN, T. R.; THORNTON, L. M.; ANDERSEN, B. L. Cellular immunity in breast cancer patients completing taxane treatment. **Clin Cancer Res**, v. 10, n. 10, p. 3401-9, May 15 2004. ISSN 1078-0432 (Print)
1078-0432 (Linking).

CHAUX, A.; COHEN, J. S.; SCHULTZ, L.; ALBADINE, R.; JADALLAH, S.; MURPHY, K. M.; SHARMA, R.; SCHOENBERG, M. P.; NETTO, G. J. High epidermal growth factor receptor immunohistochemical expression in urothelial carcinoma of the bladder is not associated with EGFR mutations in exons 19 and 21: a study using formalin-fixed, paraffin-embedded archival tissues. **Hum Pathol**, v. 43, n. 10, p. 1590-5, Oct 2012. ISSN 1532-8392 (Electronic)
0046-8177 (Linking).

CHI, L. J.; LU, H. T.; LI, G. L.; WANG, X. M.; SU, Y.; XU, W. H.; SHEN, B. Z. Involvement of T helper type 17 and regulatory T cell activity in tumour immunology of bladder carcinoma. **Clin Exp Immunol**, v. 161, n. 3, p. 480-9, Sep 2010. ISSN 1365-2249 (Electronic)
0009-9104 (Linking).

CLARKE, S. L.; BETTS, G. J.; PLANT, A.; WRIGHT, K. L.; EL-SHANAWANY, T. M.; HARROP, R.; TORKINGTON, J.; REES, B. I.; WILLIAMS, G. T.; GALLIMORE, A. M.; GODKIN, A. J. CD4+CD25+FOXP3+ regulatory T cells suppress anti-tumor immune responses in patients with colorectal cancer. **PLoS One**, v. 1, p. e129, 2006. ISSN 1932-6203 (Electronic)
1932-6203 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17205133> >.

CLEMENTE, C. G.; MIHM, M. C., JR.; BUFALINO, R.; ZURRIDA, S.; COLLINI, P.; CASCINELLI, N. Prognostic value of tumor infiltrating lymphocytes in the vertical growth phase of primary cutaneous melanoma. **Cancer**, v. 77, n. 7, p. 1303-10, Apr 1 1996. ISSN 0008-543X (Print)
0008-543X (Linking).

CLINICALTRIALS. Clinical Study to Evaluate the Safety and Efficacy of recMAGE-A3 + AS-15 in Patients From Which the Bladder is Removed Due to Muscle Invasive Bladder Cancer (MAGNOLIA). 2014. Disponível em: < <http://www.clinicaltrials.gov/ct2/show/record/NCT01435356?term=Magnolia&rank=1> >. Acesso em: 01.05.2014.

CURIEL, T. J.; COUKOS, G.; ZOU, L.; ALVAREZ, X.; CHENG, P.; MOTTRAM, P.; EVDEMON-HOGAN, M.; CONEJO-GARCIA, J. R.; ZHANG, L.; BUROW, M.; ZHU, Y.; WEI, S.; KRYCZEK, I.; DANIEL, B.; GORDON, A.; MYERS, L.; LACKNER, A.; DISIS, M. L.; KNUTSON, K. L.; CHEN, L.; ZOU, W. Specific recruitment of

regulatory T cells in ovarian carcinoma fosters immune privilege and predicts reduced survival. **Nat Med**, v. 10, n. 9, p. 942-9, Sep 2004. ISSN 1078-8956 (Print) 1078-8956 (Linking).

DENG, J.; WANG, L.; CHEN, H.; LI, L.; MA, Y.; NI, J.; LI, Y. The role of tumour-associated MUC1 in epithelial ovarian cancer metastasis and progression. **Cancer Metastasis Rev**, Apr 23 2013. ISSN 1573-7233 (Electronic) 0167-7659 (Linking).

DR. MED. BRÖCHELER, D. M. B., PROF. DR. MED. FICHTNER, PROF. DR. MED. GOEPEL, DR. MED. HAUTKAPPE, PROF. DR. MED. HÖFNER, PROF. DR. MED. HUTSCHENREITER, PROF. DR. MED. JACOBI, PD DR. MED. KREGE, DR. MED. KRÜGER, PD DR. MED. LÜMMEN, PROF. DR. MED. MEYER-SCHWICKERATH, PD DR. MED. MILLER, PROF. DR. MED. OTTO, DR. MED. RABS, PROF. DR. MED. DR. H.C. RÜBBEN, PROF. DR. MED. SCHMID, PD DR. MED. SPERLING, DR. MED. STÖBLEN, PROF. DR. MED. STUSCHKE, PROF. DR. MED. WAMMACK,. **Verfahrensanleitungen zu den Leitlinien der Deutschen Gesellschaft für Urologie (DGU) und der Europäischen Gesellschaft für Urologie (EAU) Urothelkarzinom 2007** http://www.uk-essen.de/fileadmin/Urologie/PDF/Leitlinie_Urothelkarzinom.pdf: Universitätsklinikum Essen, Klinik und Poliklinik für Urologie, Uroonkologie und Kinderurologie; Direktor: Prof. Dr. med. Dr. h.c. H. Rübben 2007.

DYRSKJOT, L.; ZIEGER, K.; KISSOW LILDAL, T.; REINERT, T.; GRUSELLE, O.; COCHE, T.; BORRE, M.; ORNTOFT, T. F. Expression of MAGE-A3, NY-ESO-1, LAGE-1 and PRAME in urothelial carcinoma. **Br J Cancer**, v. 107, n. 1, p. 116-22, Jun 26 2012. ISSN 1532-1827 (Electronic) 0007-0920 (Linking).

EUROPEAN-CANCER-OBSERVATORY. ECO, European Cancer Observatory. International Agency for Research on Cancer <http://eu-cancer.iarc.fr>, accessed on 10/07/2012. 2012. Disponível em: < <http://eu-cancer.iarc.fr> >.

EUROPEAN-MEDICINES-AGENCY. EMA. 2016. Disponível em: < http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/medicines/landing/epar_search.jsp&mid=WC0b01ac058001d124 >. Acesso em: 13.11.2016.

FISHER, H.; TROTTER, C. L.; AUDREY, S.; MACDONALD-WALLIS, K.; HICKMAN, M. Inequalities in the uptake of Human Papillomavirus Vaccination: a systematic review and meta-analysis. **Int J Epidemiol**, Apr 25 2013. ISSN 1464-3685 (Electronic) 0300-5771 (Linking).

FONTENOT, J. D.; GAVIN, M. A.; RUDENSKY, A. Y. Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. **Nat Immunol**, v. 4, n. 4, p. 330-6, Apr 2003. ISSN 1529-2908 (Print) 1529-2908 (Linking).

FOOD-AND-DRUG-ADMINISTRATION. FDA. 2016. Disponível em: < <http://www.fda.gov/Drugs/default.htm> >. Acesso em: 13.11.2016.

FRANCISCO, L. M.; SAGE, P. T.; SHARPE, A. H. The PD-1 pathway in tolerance and autoimmunity. **Immunol Rev**, v. 236, p. 219-42, Jul 2010. ISSN 0105-2896.

FRIGOLA, X.; INMAN, B. A.; LOHSE, C. M.; KRCO, C. J.; CHEVILLE, J. C.; THOMPSON, R. H.; LEIBOVICH, B.; BLUTE, M. L.; DONG, H.; KWON, E. D. Identification of a soluble form of B7-H1 that retains immunosuppressive activity and is associated with aggressive renal cell carcinoma. **Clin Cancer Res**, v. 17, n. 7, p. 1915-23, Apr 1 2011. ISSN 1078-0432 (Print)

1078-0432.

GALLUZZI, L.; SENOVILLA, L.; ZITVOGEL, L.; KROEMER, G. The secret ally: immunostimulation by anticancer drugs. **Nat Rev Drug Discov**, v. 11, n. 3, p. 215-33, Mar 2012. ISSN 1474-1784 (Electronic) 1474-1776 (Linking).

GALON, J.; COSTES, A.; SANCHEZ-CABO, F.; KIRILOVSKY, A.; MLECNIK, B.; LAGORCE-PAGES, C.; TOSOLINI, M.; CAMUS, M.; BERGER, A.; WIND, P.; ZINZINDOHOUE, F.; BRUNEVAL, P.; CUGNENC, P. H.; TRAJANOSKI, Z.; FRIDMAN, W. H.; PAGES, F. Type, density, and location of immune cells within human colorectal tumors predict clinical outcome. **Science**, v. 313, n. 5795, p. 1960-4, Sep 29 2006. ISSN 0036-8075.

GAO, Q.; QIU, S. J.; FAN, J.; ZHOU, J.; WANG, X. Y.; XIAO, Y. S.; XU, Y.; LI, Y. W.; TANG, Z. Y. Intratumoral balance of regulatory and cytotoxic T cells is associated with prognosis of hepatocellular carcinoma after resection. **J Clin Oncol**, v. 25, n. 18, p. 2586-93, Jun 20 2007. ISSN 1527-7755 (Electronic) 0732-183X (Linking).

GARDMARK, T.; WESTER, K.; DE LA TORRE, M.; CARLSSON, J.; MALMSTROM, P. U. Analysis of HER2 expression in primary urinary bladder carcinoma and corresponding metastases. **BJU Int**, v. 95, n. 7, p. 982-6, May 2005. ISSN 1464-4096 (Print) 1464-4096 (Linking).

GE, Y.; DOMSCHKE, C.; STOIBER, N.; SCHOTT, S.; HEIL, J.; ROM, J.; BLUMENSTEIN, M.; THUM, J.; SOHN, C.; SCHNEEWEISS, A.; BECKHOVE, P.; SCHUETZ, F. Metronomic cyclophosphamide treatment in metastasized breast cancer patients: immunological effects and clinical outcome. **Cancer Immunol Immunother**, v. 61, n. 3, p. 353-62, Mar 2012. ISSN 1432-0851 (Electronic) 0340-7004 (Linking).

GHIRINGHELLI, F.; MENARD, C.; PUIG, P. E.; LADOIRE, S.; ROUX, S.; MARTIN, F.; SOLARY, E.; LE CESNE, A.; ZITVOGEL, L.; CHAUFFERT, B. Metronomic cyclophosphamide regimen selectively depletes CD4+CD25+ regulatory T cells and restores T and NK effector functions in end stage cancer patients. **Cancer Immunol Immunother**, v. 56, n. 5, p. 641-8, May 2007. ISSN 0340-7004 (Print) 0340-7004 (Linking).

GIANNOPOULOS, K.; KAMINSKA, W.; HUS, I.; DMOSZYNSKA, A. The frequency of T regulatory cells modulates the survival of multiple myeloma patients: detailed characterisation of immune status in multiple myeloma. **Br J Cancer**, v. 106, n. 3, p. 546-52, Jan 31 2012. ISSN 1532-1827 (Electronic) 0007-0920 (Linking).

GOHJI, K.; OKAMOTO, M.; KITAZAWA, S.; TOYOSHIMA, M.; DONG, J.; KATSUOKA, Y.; NAKAJIMA, M. Heparanase protein and gene expression in bladder cancer. **J Urol**, v. 166, n. 4, p. 1286-90, Oct 2001. ISSN 0022-5347 (Print) 0022-5347 (Linking).

GOLDHIRSCH, A.; WOOD, W. C.; GELBER, R. D.; COATES, A. S.; THURLIMANN, B.; SENN, H. J. Progress and promise: highlights of the international expert consensus on the primary therapy of early breast cancer 2007. **Ann Oncol**, v. 18, n. 7, p. 1133-44, Jul 2007. ISSN 0923-7534 (Print) 0923-7534 (Linking).

GONZÁLEZ-GALARZA, F. F.; TAKESHITA, L. Y. C.; SANTOS, E. J. M.; KEMPSON, F.; MAIA, M. H. T.; SILVA, A. L. S. D.; SILVA, A. L. T. E.; GHATTAORAYA, G. S.; ALFIREVIC, A.; JONES, A. R. Allele frequency net 2015 update: new features for HLA epitopes, KIR and disease and HLA adverse drug reaction associations. 2014.

Disponível

em:

<

http://www.allelefreqencies.net/hla6006a.asp?hla_locus_type=Classical&hla_locus=&hla_allele1=A*02%3A01&hla_allele2=A*02%3A01&hla_selection=&hla_pop_selection=&hla_population=&hla_country=&hla_dataset=&hla_region=&hla_ethnic=&hla_study=&hla_order=order_1&hla_sample_size_pattern=equal&hla_sample_size=&hla_sample_year_pattern=equal&hla_sample_year=&hla_level_pattern=equal&hla_level=&hla_show=>. Acesso em: 06.05.2014.

GROß, U. **Kurzlehrbuch medizinische Infektiologie und Mikrobiologie**. 2. Germany: 2009. 3 ISBN 978-3-13-141652-0.

HODI, F. S.; O'DAY, S. J.; MCDERMOTT, D. F.; WEBER, R. W.; SOSMAN, J. A.; HAANEN, J. B.; GONZALEZ, R.; ROBERT, C.; SCHADENDORF, D.; HASSEL, J. C.; AKERLEY, W.; VAN DEN EERTWEGH, A. J.; LUTZKY, J.; LORIGAN, P.; VAUBEL, J. M.; LINETTE, G. P.; HOGG, D.; OTTENSMEIER, C. H.; LEBBE, C.; PESCHEL, C.; QUIRT, I.; CLARK, J. I.; WOLCHOK, J. D.; WEBER, J. S.; TIAN, J.; YELLIN, M. J.; NICHOL, G. M.; HOOS, A.; URBA, W. J. Improved survival with ipilimumab in patients with metastatic melanoma. **N Engl J Med**, v. 363, n. 8, p. 711-23, Aug 19 2010. ISSN 0028-4793.

HORN, T.; GRAB, J.; SCHUSDZIARRA, J.; SCHMID, S.; MAURER, T.; NAWROTH, R.; WOLF, P.; PRITSCH, M.; GSCHWEND, J. E.; KUBLER, H. R.; BECKHOVE, P. Antitumor T cell responses in bladder cancer are directed against a limited set of antigens and are modulated by regulatory T cells and routine treatment approaches. **Int J Cancer**, v. 133, n. 9, p. 2145-56, Nov 2013. ISSN 0020-7136.

ICHIHARA, F.; KONO, K.; TAKAHASHI, A.; KAWAIDA, H.; SUGAI, H.; FUJII, H. Increased populations of regulatory T cells in peripheral blood and tumor-infiltrating lymphocytes in patients with gastric and esophageal cancers. **Clin Cancer Res**, v. 9, n. 12, p. 4404-8, Oct 1 2003. ISSN 1078-0432 (Print) 1078-0432 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14555512> >.

JANEWAY. **Immunologie**. 7. 2009.

JOST, L. CURRICULUM: Das Urothelkarzinom. **Schweiz Med Forum** v. 25, p. 585-591, 18.Juni 2003 2003.

KAROW, T. **Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie**. 20. 2012. 1105-1107.

KASHIMURA, S.; SAZE, Z.; TERASHIMA, M.; SOETA, N.; OHTANI, S.; OSUKA, F.; KOGURE, M.; GOTOH, M. CD83(+) dendritic cells and Foxp3(+) regulatory T cells in primary lesions and regional lymph nodes are inversely correlated with prognosis of gastric cancer. **Gastric Cancer**, v. 15, n. 2, p. 144-53, Apr 2012. ISSN 1436-3291 (Print).

KIMURA, T.; MCKOLANIS, J. R.; DZUBINSKI, L. A.; ISLAM, K.; POTTER, D. M.; SALAZAR, A. M.; SCHOEN, R. E.; FINN, O. J. MUC1 vaccine for individuals with advanced adenoma of the colon: a cancer immunoprevention feasibility study. **Cancer Prev Res (Phila)**, v. 6, n. 1, p. 18-26, Jan 2013. ISSN 1940-6215 (Electronic) 1940-6215 (Linking).

KONO, K.; KAWAIDA, H.; TAKAHASHI, A.; SUGAI, H.; MIMURA, K.; MIYAGAWA, N.; OMATA, H.; FUJII, H. CD4(+)CD25high regulatory T cells increase with tumor stage in patients with gastric and esophageal cancers. **Cancer Immunol Immunother**, v. 55, n. 9, p. 1064-71, Sep 2006. ISSN 0340-7004 (Print) 0340-7004 (Linking).

KOUMARIANOU, A.; CHRISTODOULOU, M. I.; PATAPIS, P.; PAPADOPOULOS, I.; LIAKATA, E.; GIAGINI, A.; STAVROPOULOU, A.; POULAKAKI, N.; TOUNTAS, N.; XIROS, N.; ECONOMOPOULOS, T.; PECTASIDES, D.; TSITSILONIS, O. E.; PAPPA, V. The effect of metronomic versus standard chemotherapy on the regulatory

to effector T-cell equilibrium in cancer patients. **Exp Hematol Oncol**, v. 3, n. 1, p. 3, 2014. ISSN 2162-3619 (Electronic)
2162-3619 (Linking).

KRESOWIK, T. P.; GRIFFITH, T. S. Bacillus Calmette-Guerin immunotherapy for urothelial carcinoma of the bladder. **Immunotherapy**, v. 1, n. 2, p. 281-8, Mar 2009. ISSN 1750-7448 (Electronic)
1750-743X (Linking).

KRUMMEL, M. F.; ALLISON, J. P. CTLA-4 engagement inhibits IL-2 accumulation and cell cycle progression upon activation of resting T cells. **J Exp Med**, v. 183, n. 6, p. 2533-40, Jun 1 1996. ISSN 0022-1007 (Print)
0022-1007 (Linking).

LAE, M.; COUTURIER, J.; OUDARD, S.; RADVANYI, F.; BEUZEBOC, P.; VIEILLEFOND, A. Assessing HER2 gene amplification as a potential target for therapy in invasive urothelial bladder cancer with a standardized methodology: results in 1005 patients. **Ann Oncol**, v. 21, n. 4, p. 815-9, Apr 2010. ISSN 1569-8041 (Electronic)
0923-7534 (Linking).

LE, D. T.; URAM, J. N.; WANG, H.; BARTLETT, B. R.; KEMBERLING, H.; EYRING, A. D.; SKORA, A. D.; LUBER, B. S.; AZAD, N. S.; LAHERU, D.; BIEDRZYCKI, B.; DONEHOWER, R. C.; ZAHEER, A.; FISHER, G. A.; CROCENZI, T. S.; LEE, J. J.; DUFFY, S. M.; GOLDBERG, R. M.; DE LA CHAPELLE, A.; KOSHIJI, M.; BHAIJEE, F.; HUEBNER, T.; HRUBAN, R. H.; WOOD, L. D.; CUKA, N.; PARDOLL, D. M.; PAPADOPOULOS, N.; KINZLER, K. W.; ZHOU, S.; CORNISH, T. C.; TAUBE, J. M.; ANDERS, R. A.; ESHLEMAN, J. R.; VOGELSTEIN, B.; DIAZ, L. A., JR. PD-1 Blockade in Tumors with Mismatch-Repair Deficiency. **N Engl J Med**, v. 372, n. 26, p. 2509-20, Jun 25 2015. ISSN 0028-4793.

LEOW, J. J.; MARTIN-DOYLE, W.; RAJAGOPAL, P. S.; PATEL, C. G.; ANDERSON, E. M.; ROTHMAN, A. T.; COTE, R. J.; URUN, Y.; CHANG, S. L.; CHOUERI, T. K.; BELLMUNT, J. Adjuvant chemotherapy for invasive bladder cancer: a 2013 updated systematic review and meta-analysis of randomized trials. **Eur Urol**, v. 66, n. 1, p. 42-54, Jul 2014. ISSN 0302-2838.

LIAKOU, C. I. Focus on TILs: Prognostic. v. 7, 2007.

LIN, Y.; MIYAMOTO, H.; FUJINAMI, K.; UEMURA, H.; HOSAKA, M.; IWASAKI, Y.; KUBOTA, Y. Telomerase activity in human bladder cancer. **Clin Cancer Res**, v. 2, n. 6, p. 929-32, Jun 1996. ISSN 1078-0432 (Print)
1078-0432 (Linking).

LINDLEY, S.; DAYAN, C. M.; BISHOP, A.; ROEP, B. O.; PEAKMAN, M.; TREE, T. I. Defective suppressor function in CD4(+)CD25(+) T-cells from patients with type 1 diabetes. **Diabetes**, v. 54, n. 1, p. 92-9, Jan 2005. ISSN 0012-1797 (Print)
0012-1797 (Linking).

LIYANAGE, U. K.; MOORE, T. T.; JOO, H. G.; TANAKA, Y.; HERRMANN, V.; DOHERTY, G.; DREBIN, J. A.; STRASBERG, S. M.; EBERLEIN, T. J.; GOEDEGEBUURE, P. S.; LINEHAN, D. C. Prevalence of regulatory T cells is increased in peripheral blood and tumor microenvironment of patients with pancreas or breast adenocarcinoma. **J Immunol**, v. 169, n. 5, p. 2756-61, Sep 1 2002. ISSN 0022-1767 (Print)
0022-1767 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12193750> >.

LONGO; FAUCI; KASPER; HAUSER; JAMESON; LOSCALZO. **Harrison's principles of internal medicine**. 18. 2012. 790 ISBN 978-0-07174889-6.

LOPES, J. E.; SOPER, D. M.; ZIEGLER, S. F. Foxp3 is required throughout the life of a regulatory T cell. **Sci STKE**, v. 2007, n. 393, p. pe36, Jul 3 2007. ISSN 1525-8882 (Electronic) 1525-8882 (Linking).

LOSKOG, A.; NINALGA, C.; PAUL-WETTERBERG, G.; DE LA TORRE, M.; MALMSTROM, P. U.; TOTTERMAN, T. H. Human bladder carcinoma is dominated by T-regulatory cells and Th1 inhibitory cytokines. **J Urol**, v. 177, n. 1, p. 353-8, Jan 2007. ISSN 0022-5347 (Print) 0022-5347 (Linking).

LÜLLMANN-RAUCH, R. **Histologie**. 2. 2006. 305 ISBN 978-3-13-129242-1.

LÜLLMANN-RAUCH, R. **Histologie**. 2. 2006. 293 ISBN 978-3-13-129242-1.

MALMSTROM, P. U.; SYLVESTER, R. J.; CRAWFORD, D. E.; FRIEDRICH, M.; KREGE, S.; RINTALA, E.; SOLSONA, E.; DI STASI, S. M.; WITJES, J. A. An individual patient data meta-analysis of the long-term outcome of randomised studies comparing intravesical mitomycin C versus bacillus Calmette-Guerin for non-muscle-invasive bladder cancer. **Eur Urol**, v. 56, n. 2, p. 247-56, Aug 2009. ISSN 0302-2838.

MILLER, A. M.; LUNDBERG, K.; OZENCI, V.; BANHAM, A. H.; HELLSTROM, M.; EGEVAD, L.; PISA, P. CD4+CD25high T cells are enriched in the tumor and peripheral blood of prostate cancer patients. **J Immunol**, v. 177, n. 10, p. 7398-405, Nov 15 2006. ISSN 0022-1767 (Print) 0022-1767 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17082659> >.

MLECNIK, B.; TOSOLINI, M.; KIRILOVSKY, A.; BERGER, A.; BINDEA, G.; MEATCHI, T.; BRUNEVAL, P.; TRAJANOSKI, Z.; FRIDMAN, W. H.; PAGES, F.; GALON, J. Histopathologic-based prognostic factors of colorectal cancers are associated with the state of the local immune reaction. **J Clin Oncol**, v. 29, n. 6, p. 610-8, Feb 20 2011. ISSN 0732-183x.

MOODIE, Z.; PRICE, L.; GOUTTEFANGEAS, C.; MANDER, A.; JANETZKI, S.; LOWER, M.; WELTERS, M. J.; OTTENSMEIER, C.; VAN DER BURG, S. H.; BRITTEN, C. M. Response definition criteria for ELISPOT assays revisited. **Cancer Immunol Immunother**, v. 59, n. 10, p. 1489-501, Oct 2010. ISSN 1432-0851 (Electronic) 0340-7004 (Linking).

MOUGIAKAKOS, D.; CHOUDHURY, A.; LLADSER, A.; KIESSLING, R.; JOHANSSON, C. C. Regulatory T cells in cancer. **Adv Cancer Res**, v. 107, p. 57-117, 2010. ISSN 0065-230X (Print) 0065-230X (Linking).

MUENST, S.; SCHAERLI, A. R.; GAO, F.; DASTER, S.; TRELLA, E.; DROESER, R. A.; MURARO, M. G.; ZAJAC, P.; ZANETTI, R.; GILLANDERS, W. E.; WEBER, W. P.; SOYSAL, S. D. Expression of programmed death ligand 1 (PD-L1) is associated with poor prognosis in human breast cancer. **Breast Cancer Res Treat**, v. 146, n. 1, p. 15-24, Jul 2014. ISSN 0167-6806.

MULLER, M.; HEINE, B.; HEICAPPELL, R.; EMRICH, T.; HUMMEL, M.; STEIN, H.; MILLER, K. Telomerase activity in bladder cancer, bladder washings and in urine. **Int J Oncol**, v. 9, n. 6, p. 1169-73, Dec 1996. ISSN 1019-6439 (Print) 1019-6439 (Linking).

NAGAI, S.; TAKENAKA, K.; SONOBE, M.; OGAWA, E.; WADA, H.; TANAKA, F. A novel classification of MUC1 expression is correlated with tumor differentiation and postoperative prognosis in non-small cell lung cancer. **J Thorac Oncol**, v. 1, n. 1, p. 46-51, Jan 2006. ISSN 1556-1380 (Electronic) 1556-0864 (Linking).

NAKANISHI, J.; WADA, Y.; MATSUMOTO, K.; AZUMA, M.; KIKUCHI, K.; UEDA, S. Overexpression of B7-H1 (PD-L1) significantly associates with tumor grade and postoperative prognosis in human urothelial cancers. **Cancer Immunol Immunother**, v. 56, n. 8, p. 1173-82, Aug 2007. ISSN 0340-7004 (Print) 0340-7004.

NISHIYAMA, T.; TACHIBANA, M.; HORIGUCHI, Y.; NAKAMURA, K.; IKEDA, Y.; TAKESAKO, K.; MURAI, M. Immunotherapy of bladder cancer using autologous dendritic cells pulsed with human lymphocyte antigen-A24-specific MAGE-3 peptide. **Clin Cancer Res**, v. 7, n. 1, p. 23-31, Jan 2001. ISSN 1078-0432 (Print) 1078-0432 (Linking).

NIZAR, S.; MEYER, B.; GALUSTIAN, C.; KUMAR, D.; DALGLEISH, A. T regulatory cells, the evolution of targeted immunotherapy. **Biochim Biophys Acta**, v. 1806, n. 1, p. 7-17, Aug 2010. ISSN 0006-3002 (Print) 0006-3002 (Linking).

NOMI, T.; SHO, M.; AKAHORI, T.; HAMADA, K.; KUBO, A.; KANEHIRO, H.; NAKAMURA, S.; ENOMOTO, K.; YAGITA, H.; AZUMA, M.; NAKAJIMA, Y. Clinical significance and therapeutic potential of the programmed death-1 ligand/programmed death-1 pathway in human pancreatic cancer. **Clin Cancer Res**, v. 13, n. 7, p. 2151-7, Apr 1 2007. ISSN 1078-0432 (Print) 1078-0432.

ONIZUKA, S.; TAWARA, I.; SHIMIZU, J.; SAKAGUCHI, S.; FUJITA, T.; NAKAYAMA, E. Tumor rejection by in vivo administration of anti-CD25 (interleukin-2 receptor alpha) monoclonal antibody. **Cancer Res**, v. 59, n. 13, p. 3128-33, Jul 1 1999. ISSN 0008-5472 (Print) 0008-5472 (Linking).

PEDROZA-GONZALEZ, A.; KWEKKEBOOM, J.; SPRENGERS, D. T-cell suppression mediated by regulatory T cells infiltrating hepatic tumors can be overcome by GITRL treatment. **Oncoimmunology**, v. 2, n. 1, p. e22450, Jan 1 2013. ISSN 2162-4011 (Print).

PLIMACK E., B. J., GUPTA S., BERGER R., MONTGOMERY R., HEATH K., ET AL. Pembrolizumab (MK-3475) for advanced urothelial cancer: updated results and biomarker analysis from keynote-012. **J Clin Oncol** **33(Suppl.): abstract 4502.**, 2015.

RAMAKRISHNAN, R.; ASSUDANI, D.; NAGARAJ, S.; HUNTER, T.; CHO, H. I.; ANTONIA, S.; ALTIOK, S.; CELIS, E.; GABRILOVICH, D. I. Chemotherapy enhances tumor cell susceptibility to CTL-mediated killing during cancer immunotherapy in mice. **J Clin Invest**, v. 120, n. 4, p. 1111-24, Apr 2010. ISSN 1558-8238 (Electronic) 0021-9738 (Linking).

RASSOW; HAUSER; NETZKER; DEUTZMANN. **Biochemie**. Germany: 2006. 803 ISBN 978-3-13-125351-4.

RECH, A. J.; VONDERHEIDE, R. H. Clinical use of anti-CD25 antibody daclizumab to enhance immune responses to tumor antigen vaccination by targeting regulatory T cells. **Ann N Y Acad Sci**, v. 1174, p. 99-106, Sep 2009. ISSN 1749-6632 (Electronic) 0077-8923 (Linking).

ROBERT-KOCH-INSTITUT/KREBSREGISTER. Krebs in Deutschland 2009/2010. 9. Ausgabe. Robert Koch-Institut (Hrsg) und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (Hrsg). Berlin, 2013. 2013.

ROBERT, C.; SCHACHTER, J.; LONG, G. V.; ARANCE, A.; GROB, J. J.; MORTIER, L.; DAUD, A.; CARLINO, M. S.; MCNEIL, C.; LOTEM, M.; LARKIN, J.; LORIGAN, P.; NEYNS, B.; BLANK, C. U.; HAMID, O.; MATEUS, C.; SHAPIRA-FROMMER, R.; KOSH, M.; ZHOU, H.; IBRAHIM, N.; EBBINGHAUS, S.; RIBAS, A. Pembrolizumab versus Ipilimumab in Advanced Melanoma. **N Engl J Med**, v. 372, n. 26, p. 2521-32, Jun 25 2015. ISSN 0028-4793.

ROSENBERG, J. E.; HOFFMAN-CENSITS, J.; POWLES, T.; VAN DER HEIJDEN, M. S.; BALAR, A. V.; NECCHI, A.; DAWSON, N.; O'DONNELL, P. H.; BALMANOUKIAN, A.; LORIOT, Y.; SRINIVAS, S.; RETZ, M. M.; GRIVAS, P.; JOSEPH, R. W.; GALSKEY, M. D.; FLEMING, M. T.; PETRYLAK, D. P.; PEREZ-GRACIA, J. L.; BURRIS, H. A.; CASTELLANO, D.; CANIL, C.; BELLMUNT, J.; BAJORIN, D.; NICKLES, D.; BOURGON, R.; FRAMPTON, G. M.; CUI, N.; MARIATHASAN, S.; ABIDOYE, O.; FINE, G. D.; DREICER, R. Atezolizumab in patients with locally advanced and metastatic urothelial carcinoma who have progressed following treatment with platinum-based chemotherapy: a single-arm, multicentre, phase 2 trial. **Lancet**, v. 387, n. 10031, p. 1909-20, May 7 2016. ISSN 0140-6736.

ROSEVEAR, H. M.; LIGHTFOOT, A. J.; O'DONNELL, M. A.; GRIFFITH, T. S. The role of neutrophils and TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) in bacillus Calmette-Guerin (BCG) immunotherapy for urothelial carcinoma of the bladder. **Cancer Metastasis Rev**, v. 28, n. 3-4, p. 345-53, Dec 2009. ISSN 1573-7233 (Electronic) 0167-7659 (Linking).

SAKAGUCHI, S.; YAMAGUCHI, T.; NOMURA, T.; ONO, M. Regulatory T cells and immune tolerance. **Cell**, v. 133, n. 5, p. 775-87, May 30 2008. ISSN 1097-4172 (Electronic) 0092-8674 (Linking).

SALAMA, P.; PHILLIPS, M.; GRIEU, F.; MORRIS, M.; ZEPE, N.; JOSEPH, D.; PLATELL, C.; IACOPETTA, B. Tumor-infiltrating FOXP3+ T regulatory cells show strong prognostic significance in colorectal cancer. **J Clin Oncol**, v. 27, n. 2, p. 186-92, Jan 10 2009. ISSN 1527-7755 (Electronic) 0732-183X (Linking).

SASADA, T.; KIMURA, M.; YOSHIDA, Y.; KANAI, M.; TAKABAYASHI, A. CD4+CD25+ regulatory T cells in patients with gastrointestinal malignancies: possible involvement of regulatory T cells in disease progression. **Cancer**, v. 98, n. 5, p. 1089-99, Sep 1 2003. ISSN 0008-543X (Print) 0008-543X (Linking).

SATO, K. I. Cellular Functions Regulated by Phosphorylation of EGFR on Tyr845. **Int J Mol Sci**, v. 14, n. 6, p. 10761-10790, 2013. ISSN 1422-0067 (Print) 1422-0067 (Linking).

SCHAEFER, C.; KIM, G. G.; ALBERS, A.; HOERMANN, K.; MYERS, E. N.; WHITESIDE, T. L. Characteristics of CD4+CD25+ regulatory T cells in the peripheral circulation of patients with head and neck cancer. **Br J Cancer**, v. 92, n. 5, p. 913-20, Mar 14 2005. ISSN 0007-0920 (Print) 0007-0920 (Linking).

SCHMITTEL, A.; KEILHOLZ, U.; SCHEIBENBOGEN, C. Evaluation of the interferon-gamma ELISPOT-assay for quantification of peptide specific T lymphocytes from peripheral blood. **J Immunol Methods**, v. 210, n. 2, p. 167-74, Dec 29 1997. ISSN 0022-1759 (Print) 0022-1759 (Linking).

SCHREIBER, R. D.; OLD, L. J.; SMYTH, M. J. Cancer immunoediting: integrating immunity's roles in cancer suppression and promotion. **Science**, v. 331, n. 6024, p. 1565-70, Mar 25 2011. ISSN 1095-9203 (Electronic)

0036-8075 (Linking).

SCHROEDER, J. A.; MASRI, A. A.; ADRIANCE, M. C.; TESSIER, J. C.; KOTLARCZYK, K. L.; THOMPSON, M. C.; GENDLER, S. J. MUC1 overexpression results in mammary gland tumorigenesis and prolonged alveolar differentiation. **Oncogene**, v. 23, n. 34, p. 5739-47, Jul 29 2004. ISSN 0950-9232 (Print) 0950-9232 (Linking).

SHARIAT, S. F.; ASHFAQ, R.; KARAKIEWICZ, P. I.; SAEEDI, O.; SAGALOWSKY, A. I.; LOTAN, Y. Survivin expression is associated with bladder cancer presence, stage, progression, and mortality. **Cancer**, v. 109, n. 6, p. 1106-13, Mar 15 2007. ISSN 0008-543X (Print) 0008-543X (Linking).

SHARMA, P.; GNJATIC, S.; JUNGBLUTH, A. A.; WILLIAMSON, B.; HERR, H.; STOCKERT, E.; DALBAGNI, G.; DONAT, S. M.; REUTER, V. E.; SANTIAGO, D.; CHEN, Y. T.; BAJORIN, D. F.; OLD, L. J. Frequency of NY-ESO-1 and LAGE-1 expression in bladder cancer and evidence of a new NY-ESO-1 T-cell epitope in a patient with bladder cancer. **Cancer Immun**, v. 3, p. 19, Dec 18 2003. ISSN 1424-9634 (Electronic) 1424-9634 (Linking).

SHELLEY, M. D.; COURT, J. B.; KYNASTON, H.; WILT, T. J.; COLES, B.; MASON, M. Intravesical bacillus Calmette-Guerin versus mitomycin C for Ta and T1 bladder cancer. **Cochrane Database Syst Rev**, n. 3, p. CD003231, 2003. ISSN 1469-493X (Electronic) 1361-6137 (Linking).

SIGAL, L. J.; CROTTY, S.; ANDINO, R.; ROCK, K. L. Cytotoxic T-cell immunity to virus-infected non-haematopoietic cells requires presentation of exogenous antigen. **Nature**, v. 398, n. 6722, p. 77-80, Mar 4 1999. ISSN 0028-0836 (Print) 0028-0836 (Linking).

SIGALOTTI, L.; FRATTA, E.; CORAL, S.; TANZARELLA, S.; DANIELLI, R.; COLIZZI, F.; FONSATTI, E.; TRAVERSARI, C.; ALTOMONTE, M.; MAIO, M. Intratumor heterogeneity of cancer/testis antigens expression in human cutaneous melanoma is methylation-regulated and functionally reverted by 5-aza-2'-deoxycytidine. **Cancer Res**, v. 64, n. 24, p. 9167-71, Dec 15 2004. ISSN 0008-5472 (Print) 0008-5472 (Linking).

SIMMS, M. S.; HUGHES, O. D.; LIMB, M.; PRICE, M. R.; BISHOP, M. C. MUC1 mucin as a tumour marker in bladder cancer. **BJU Int**, v. 84, n. 3, p. 350-2, Aug 1999. ISSN 1464-4096 (Print) 1464-4096 (Linking).

SIMPSON, A. J.; CABALLERO, O. L.; JUNGBLUTH, A.; CHEN, Y. T.; OLD, L. J. Cancer/testis antigens, gametogenesis and cancer. **Nat Rev Cancer**, v. 5, n. 8, p. 615-25, Aug 2005. ISSN 1474-175X (Print) 1474-175X (Linking).

STADLER, W. M.; LERNER, S. P.; GROSHEN, S.; STEIN, J. P.; SHI, S. R.; RAGHAVAN, D.; ESRIG, D.; STEINBERG, G.; WOOD, D.; KLOTZ, L.; HALL, C.; SKINNER, D. G.; COTE, R. J. Phase III study of molecularly targeted adjuvant therapy in locally advanced urothelial cancer of the bladder based on p53 status. **J Clin Oncol**, v. 29, n. 25, p. 3443-9, Sep 1 2011. ISSN 1527-7755 (Electronic) 0732-183X (Linking).

STEIN, J. P.; LIESKOVSKY, G.; COTE, R.; GROSHEN, S.; FENG, A. C.; BOYD, S.; SKINNER, E.; BOCHNER, B.; THANGATHURAI, D.; MIKHAIL, M.; RAGHAVAN, D.; SKINNER, D. G. Radical cystectomy in the treatment of invasive bladder cancer: long-term results in 1,054 patients. **J Clin Oncol**, v. 19, n. 3, p. 666-75, Feb 1 2001. ISSN 0732-183X (Print)

0732-183X (Linking).

STENZL, A.; COWAN, N. C.; DE SANTIS, M.; KUCZYK, M. A.; MERSEBURGER, A. S.; RIBAL, M. J.; SHERIF, A.; WITJES, J. A. Treatment of muscle-invasive and metastatic bladder cancer: update of the EAU guidelines. **Eur Urol**, v. 59, n. 6, p. 1009-18, Jun 2011. ISSN 1873-7560 (Electronic) 0302-2838 (Linking).

STREECK, H.; FRAHM, N.; WALKER, B. D. The role of IFN-gamma Elispot assay in HIV vaccine research. **Nat Protoc**, v. 4, n. 4, p. 461-9, 2009. ISSN 1750-2799 (Electronic) 1750-2799 (Linking).

SUGIYAMA, D.; NISHIKAWA, H.; MAEDA, Y.; NISHIOKA, M.; TANEMURA, A.; KATAYAMA, I.; EZOE, S.; KANAKURA, Y.; SATO, E.; FUKUMORI, Y.; KARBACH, J.; JAGER, E.; SAKAGUCHI, S. Anti-CCR4 mAb selectively depletes effector-type FoxP3+CD4+ regulatory T cells, evoking antitumor immune responses in humans. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 110, n. 44, p. 17945-50, Oct 29 2013. ISSN 1091-6490 (Electronic) 0027-8424 (Linking).

SUGIYAMA, H.; GYULAI, R.; TOICHI, E.; GARACZI, E.; SHIMADA, S.; STEVENS, S. R.; MCCORMICK, T. S.; COOPER, K. D. Dysfunctional blood and target tissue CD4+CD25high regulatory T cells in psoriasis: mechanism underlying unrestrained pathogenic effector T cell proliferation. **J Immunol**, v. 174, n. 1, p. 164-73, Jan 1 2005. ISSN 0022-1767 (Print) 0022-1767 (Linking).

SYLVESTER, R. J.; VAN DER, M. A.; LAMM, D. L. Intravesical bacillus Calmette-Guerin reduces the risk of progression in patients with superficial bladder cancer: a meta-analysis of the published results of randomized clinical trials. **J Urol**, v. 168, n. 5, p. 1964-70, Nov 2002. ISSN 0022-5347 (Print) 0022-5347 (Linking).

TAKAHASHI, T.; TAGAMI, T.; YAMAZAKI, S.; UEDE, T.; SHIMIZU, J.; SAKAGUCHI, N.; MAK, T. W.; SAKAGUCHI, S. Immunologic self-tolerance maintained by CD25(+)CD4(+) regulatory T cells constitutively expressing cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4. **J Exp Med**, v. 192, n. 2, p. 303-10, Jul 17 2000. ISSN 0022-1007 (Print) 0022-1007 (Linking).

TAKENAKA, M.; SEKI, N.; TOH, U.; HATTORI, S.; KAWAHARA, A.; YAMAGUCHI, T.; KOURA, K.; TAKAHASHI, R.; OTSUKA, H.; TAKAHASHI, H.; IWAKUMA, N.; NAKAGAWA, S.; FUJII, T.; SASADA, T.; YAMAGUCHI, R.; YANO, H.; SHIROUZU, K.; KAGE, M. FOXP3 expression in tumor cells and tumor-infiltrating lymphocytes is associated with breast cancer prognosis. **Mol Clin Oncol**, v. 1, n. 4, p. 625-632, Jul 2013. ISSN 2049-9450 (Print) 2049-9450 (Linking).

TAN, M. C.; GOEDEGEBUURE, P. S.; BELT, B. A.; FLAHERTY, B.; SANKPAL, N.; GILLANDERS, W. E.; EBERLEIN, T. J.; HSIEH, C. S.; LINEHAN, D. C. Disruption of CCR5-dependent homing of regulatory T cells inhibits tumor growth in a murine model of pancreatic cancer. **J Immunol**, v. 182, n. 3, p. 1746-55, Feb 1 2009. ISSN 1550-6606 (Electronic) 0022-1767 (Linking).

THIRUPPATHI, M.; ROWIN, J.; LI JIANG, Q.; SHENG, J. R.; PRABHAKAR, B. S.; MERIGGIOLI, M. N. Functional defect in regulatory T cells in myasthenia gravis. **Ann N Y Acad Sci**, v. 1274, p. 68-76, Dec 2012. ISSN 1749-6632 (Electronic) 0077-8923 (Linking).

VALE C.L., M.-A. G., MEDICAL RESEARCH COUNCIL CLINICAL TRIALS UNIT, 222 EUSTON ROAD, LONDON NW1 2DA, UK. Neoadjuvant chemotherapy in invasive bladder cancer: update of a systematic review and meta-analysis of individual patient data advanced bladder cancer (ABC) meta-analysis collaboration. **Eur Urol**, v. 48, n. 2, p. 202-5; discussion 205-6, Aug 2005. ISSN 0302-2838 (Print) 0302-2838 (Linking).

VELCHETI, V.; SCHALPER, K. A.; CARVAJAL, D. E.; ANAGNOSTOU, V. K.; SYRIGOS, K. N.; SZNOL, M.; HERBST, R. S.; GETTINGER, S. N.; CHEN, L.; RIMM, D. L. Programmed death ligand-1 expression in non-small cell lung cancer. **Lab Invest**, v. 94, n. 1, p. 107-16, Jan 2014. ISSN 0023-6837.

VESELY, M. D.; KERSHAW, M. H.; SCHREIBER, R. D.; SMYTH, M. J. Natural innate and adaptive immunity to cancer. **Annu Rev Immunol**, v. 29, p. 235-71, 2011. ISSN 1545-3278 (Electronic) 0732-0582 (Linking).

VIGLIETTA, V.; BAECHER-ALLAN, C.; WEINER, H. L.; HAFNER, D. A. Loss of functional suppression by CD4+CD25+ regulatory T cells in patients with multiple sclerosis. **J Exp Med**, v. 199, n. 7, p. 971-9, Apr 5 2004. ISSN 0022-1007 (Print) 0022-1007 (Linking).

VON DER MAASE, H.; HANSEN, S. W.; ROBERTS, J. T.; DOGLIOTTI, L.; OLIVER, T.; MOORE, M. J.; BODROGI, I.; ALBERS, P.; KNUTH, A.; LIPPERT, C. M.; KERBRAT, P.; SANCHEZ ROVIRA, P.; WERSALL, P.; CLEALL, S. P.; ROYCHOWDHURY, D. F.; TOMLIN, I.; VISSEREN-GRUL, C. M.; CONTE, P. F. Gemcitabine and cisplatin versus methotrexate, vinblastine, doxorubicin, and cisplatin in advanced or metastatic bladder cancer: results of a large, randomized, multinational, multicenter, phase III study. **J Clin Oncol**, v. 18, n. 17, p. 3068-77, Sep 2000. ISSN 0732-183X (Print) 0732-183X (Linking).

VON DER MAASE, H.; SENGELOV, L.; ROBERTS, J. T.; RICCI, S.; DOGLIOTTI, L.; OLIVER, T.; MOORE, M. J.; ZIMMERMANN, A.; ARNING, M. Long-term survival results of a randomized trial comparing gemcitabine plus cisplatin, with methotrexate, vinblastine, doxorubicin, plus cisplatin in patients with bladder cancer. **J Clin Oncol**, v. 23, n. 21, p. 4602-8, Jul 20 2005. ISSN 0732-183X (Print) 0732-183X (Linking).

WAGSTAFF, A. J.; ZELLWEGER, J. P. T-SPOT.TB: an in vitro diagnostic assay measuring T-cell reaction to Mycobacterium tuberculosis-specific antigens. **Mol Diagn Ther**, v. 10, n. 1, p. 57-63; discussion 64-5, 2006. ISSN 1177-1062 (Print) 1177-1062 (Linking).

WANG, T.; SUN, X.; ZHAO, J.; ZHANG, J.; ZHU, H.; LI, C.; GAO, N.; JIA, Y.; XU, D.; HUANG, F. P.; LI, N.; LU, L.; LI, Z. G. Regulatory T cells in rheumatoid arthritis showed increased plasticity toward Th17 but retained suppressive function in peripheral blood. **Ann Rheum Dis**, Feb 12 2014. ISSN 1468-2060 (Electronic) 0003-4967 (Linking).

WANG, X.; TENG, F.; KONG, L.; YU, J. PD-L1 expression in human cancers and its association with clinical outcomes. **Onco Targets Ther**, v. 9, p. 5023-39, 2016. ISSN 1178-6930.

WINERDAL, M. E.; MARITS, P.; WINERDAL, M.; HASAN, M.; ROSENBLATT, R.; TOLF, A.; SELLING, K.; SHERIF, A.; WINQVIST, O. FOXP3 and survival in urinary bladder cancer. **BJU Int**, v. 108, n. 10, p. 1672-8, Nov 2011. ISSN 1464-410X (Electronic) 1464-4096 (Linking).

WITJES, J. A.; COMPERAT, E.; COWAN, N. C.; DE SANTIS, M.; GAKIS, G.; LEBRET, T.; RIBAL, M. J.; VAN DER HEIJDEN, A. G.; SHERIF, A. EAU Guidelines on Muscle-invasive and Metastatic Bladder Cancer: Summary of the 2013 Guidelines. **Eur Urol**, v. 65, n. 4, p. 778-92, Apr 2014. ISSN 1873-7560 (Electronic) 0302-2838 (Linking).

WOLCHOK, J. D.; HODI, F. S.; WEBER, J. S.; ALLISON, J. P.; URBA, W. J.; ROBERT, C.; O'DAY, S. J.; HOOS, A.; HUMPHREY, R.; BERMAN, D. M.; LONBERG, N.; KORMAN, A. J. Development of ipilimumab: a novel immunotherapeutic approach for the treatment of advanced melanoma. **Ann N Y Acad Sci**, v. 1291, n. 1, p. 1-13, Jul 2013. ISSN 0077-8923 (Print).

WONG, R. M.; SCOTLAND, R. R.; LAU, R. L.; WANG, C.; KORMAN, A. J.; KAST, W. M.; WEBER, J. S. Programmed death-1 blockade enhances expansion and functional capacity of human melanoma antigen-specific CTLs. **Int Immunol**, v. 19, n. 10, p. 1223-34, Oct 2007. ISSN 0953-8178 (Print) 0953-8178.

WOO, E. Y.; CHU, C. S.; GOLETZ, T. J.; SCHLIENGER, K.; YEH, H.; COUKOS, G.; RUBIN, S. C.; KAISER, L. R.; JUNE, C. H. Regulatory CD4(+)CD25(+) T cells in tumors from patients with early-stage non-small cell lung cancer and late-stage ovarian cancer. **Cancer Res**, v. 61, n. 12, p. 4766-72, Jun 15 2001. ISSN 0008-5472 (Print) 0008-5472 (Linking).

WU, Y.; BORDE, M.; HEISSMEYER, V.; FEUERER, M.; LAPAN, A. D.; STROUD, J. C.; BATES, D. L.; GUO, L.; HAN, A.; ZIEGLER, S. F.; MATHIS, D.; BENOIST, C.; CHEN, L.; RAO, A. FOXP3 controls regulatory T cell function through cooperation with NFAT. **Cell**, v. 126, n. 2, p. 375-87, Jul 28 2006. ISSN 0092-8674 (Print) 0092-8674 (Linking).

XU, T.; DUAN, Q.; WANG, G.; HU, B. CD4 + CD25^{high} regulatory T cell numbers and FOXP3 mRNA expression in patients with advanced esophageal cancer before and after chemotherapy. **Cell Biochem Biophys**, v. 61, n. 2, p. 389-92, Nov 2011. ISSN 1559-0283 (Electronic) 1085-9195 (Linking).

YUAN, X. L.; CHEN, L.; ZHANG, T. T.; MA, Y. H.; ZHOU, Y. L.; ZHAO, Y.; WANG, W. W.; DONG, P.; YU, L.; ZHANG, Y. Y.; SHEN, L. S. Gastric cancer cells induce human CD4⁺Foxp3⁺ regulatory T cells through the production of TGF- β 1. **World J Gastroenterol**, v. 17, n. 15, p. 2019-27, Apr 21 2011. ISSN 1007-9327 (Print).

ZARETSKY, J. Z.; BARNEA, I.; AYLON, Y.; GORIVODSKY, M.; WRESCHNER, D. H.; KEYDAR, I. MUC1 gene overexpressed in breast cancer: structure and transcriptional activity of the MUC1 promoter and role of estrogen receptor alpha (ERalpha) in regulation of the MUC1 gene expression. **Mol Cancer**, v. 5, p. 57, 2006. ISSN 1476-4598 (Electronic) 1476-4598 (Linking).

ZHANG, H. H.; MEI, M. H.; FEI, R.; LIAO, W. J.; WANG, X. Y.; QIN, L. L.; WANG, J. H.; WEI, L.; CHEN, H. S. Regulatory T cell depletion enhances tumor specific CD8 T-cell responses, elicited by tumor antigen NY-ESO-1b in hepatocellular carcinoma patients, in vitro. **Int J Oncol**, v. 36, n. 4, p. 841-8, Apr 2010. ISSN 1791-2423 (Electronic) 1019-6439 (Linking).

ZITVOGEL, L.; KEPP, O.; KROEMER, G. Immune parameters affecting the efficacy of chemotherapeutic regimens. **Nat Rev Clin Oncol**, v. 8, n. 3, p. 151-60, Mar 2011. ISSN 1759-4782 (Electronic) 1759-4774 (Linking).

8. Danksagung

An erster Stelle gilt mein besonderer Dank meinem Doktorvater und direkten Betreuer der Arbeit, Herrn PD Dr. Thomas Horn, der die gesamte Studie leitete und die Untersuchungen der Zellen im DKFZ Heidelberg durchführte. Mit seiner großen Geduld stand er mir jederzeit mit offenem Ohr für Fragen zur Verfügung und schaffte es immer wieder, mich zur weiteren Recherche und wissenschaftlichen Arbeit zu motivieren.

Außerdem möchte ich meinen Kollegen und Mitarbeitern des Klinikums rechts Isar danken, die mich beim praktischen Teil der Arbeit tatkräftig unterstützten: hier möchte ich vor allem die konstruktive Zusammenarbeit meiner direkten Mit-Doktorandin, Frau Jessica Grab, des ärztlichen Mitbetreuers der Patienten, Herrn Dr. Sebastian Schmidt, und der leitende CTA des Forschungslabors, Frau Monika Moissl, mit ihrem gesamten Team erwähnen.

Für ihre große moralische, persönliche und auch organisatorische Unterstützung möchte ich mich bei meiner Mutter, Frau Dr. Margaretha Schusdziarra, meiner Schwester, Frau Dr. Christina Schusdziarra, und meinem Freund, Herrn Ferdinand Becker, bedanken, die mich durch die Höhen und Tiefen der gesamten Doktorandenzeit begleiteten.

Abschließend möchte ich in großer Dankbarkeit meinen Vater, Herrn Prof. Dr. Volker Schusdziarra, erwähnen, dem ich diese Arbeit auch widmen möchte. Er verstarb 2014 bedauerlicherweise und erlebte somit den endgültigen Abschluss meiner Dissertation leider nicht mehr. Auf dem Weg durch das Medizinstudium unterstützte er mich vielfältig mit seinem wertvollen Rat und begleitete mich während der wissenschaftlichen Arbeit mit großer Begeisterung.