

Aus dem Bernhard-Nocht-Institut für Tropenmedizin,
Hamburg
Sektion für Medizinische Mikrobiologie, Abteilung für Immunologie

Prof. Dr. med. Bernhard Fleischer

**Expression von CD152 (CTLA-4)
auf T-Lymphozyten im Melanom
und im Blut nach Hyperthermie**

Dissertation
Zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
dem Fachbereich Medizin der Universität Hamburg
vorgelegt von

Athanasios Tsianakas
aus Hamburg
Hamburg , 2007

Angenommen vom Fachbereich Medizin
der Universität Hamburg am: 03.06.2008
Veröffentlicht mit Genehmigung des Fachbereichs
Medizin der Universität Hamburg
Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: Prof. Dr. B. Fleischer
Prüfungsausschuss: 2. Gutachter/in: Prof. Dr. V. Steinkraus
Prüfungsausschuss: 3. Gutachter/in: Prof. Dr. B. Bröker

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung	3
1.1 Das Immunsystem	3
1.2. T-Zell-Aktivierung	5
1.2.1 Kostimulation	6
1.3 Abschalten der T-Zellantwort	8
1.3.1 CTLA-4	9
1.3.2 CTLA-4 und seine Rolle als negativer Regulator der T-Zellantwort	11
1.3.3 CTLA-4 und seine Bedeutung in der Tumorthherapie	16
1.4 Hyperthermie in der Tumorthherapie	19
1.5 Ziel der Arbeit	20
2 Material und Methoden	22
I. Material	22
2.1 Chemikalien	22
2.2 Glas- und Plastikware	22
2.3 Laborgeräte	22
2.4 Software-Programme	23
2.5 Zellbiologische und immunhistochemische Arbeiten	23
2.5.1 Kulturmedien, Puffer und Stammlösungen	25
2.5.2 Antikörper	26
2.6 Melanomgewebe	27
2.7 Hyperthermie-PBL	27
II. Methoden	28
2.8 Zellbiologische Methoden	28
2.8.1 Auftauen und Einfrieren eukaryontischer Zellen (Kryokonservierung)	28
2.8.2 Zellzählung	29
2.8.3 Isolierung peripherer Blutlymphozyten (PBL)	29
2.8.3.1 Isolierung von T-Zellen	30
2.8.4 Messung der Zellproliferation durch den Einbau von radioaktivem Thymidin	31

2.9 Zytozentrifugation	32
2.10 Melanome und deren Aufbereitung	32
2.10.1 Aufbereitung der Melanome	32
2.10.2 Kryostatschnitte	33
2.10.3 Beschichtung der Objektträger	33
2.11 Immunhistochemische Färbemethode	33
2.11.1 Indirekte immunhistologische Doppelfärbung	33
2.11.2 Anfertigen von Dauerpräparaten	35
2.12 Auswertung und Dokumentation	35
2.12.1 Auswertung der immunhistologischen Präparate	35
2.12.2 Photographische Dokumentation	36
2.12.3 Photographische Auswertung mit Softwareunterstützung	36
3 Ergebnisse	37
3.1 Auswertung der Melanompräparate	37
3.2 Auswertung der Hyperthermie-behandelten Patienten	40
3.3 Hyperthermie-Proliferationstests	43
3.4 Verbesserung und Objektivierung der Auszähltechnik CTLA-4-positiver Zellen	47
3.4.1 Vorarbeiten	47
3.4.2 Vergleich der Computer-gestützten mit der manuellen Auszählung von Immunfluoreszenzfärbungen	50
4 Diskussion	52
4.1 CTLA-4 auf tumorinfiltrierenden Lymphozyten von Melanomen	52
4.2 CTLA-4-Expressionsdynamik auf peripheren Blutlymphozyten von Hyperthermie-behandelten Tumorpatienten	54
4.3 Einführung einer Computer-gestützten Auswertungsmethode von Fluoreszenz-markierten Zellen	55
5 Zusammenfassung	57
6 Literaturverzeichnis	60
7 Danksagung	69
8 Lebenslauf	70
9 Anhang	71
10 Erklärung	84

1 Einleitung

1.1 Das Immunsystem

Das Immunsystem des Menschen hat die Aufgabe, diesen vor schädlichen und krankheitserregenden Mikroorganismen wie Viren, Bakterien, Pilzen und Parasiten zu schützen. Dabei lassen sich Mechanismen der angeborenen und erworbenen Resistenz voneinander trennen. Die angeborene (unspezifische) Resistenz umfasst die rein mechanischen Abwehrbarrieren der Haut und der Schleimhäute, die Phagozyten (Makrophagen und Granulozyten), natürliche Killerzellen (NK-Zellen) sowie das Komplementsystem.

Die erworbene (spezifische) Resistenz ist ein adaptives System, das sich in die zwei Familien der B- und T-Lymphozyten auftrennen lässt.

Die B-Lymphozyten tragen ihren Namen aufgrund ihres bei Vögeln gefundenen Entwicklungsortes (*bursa fabricii*). Sie haben die Aufgabe, spezifische lösliche Antikörper gegen Fremdanigene zu produzieren (humorale Abwehr). Sie unterliegen dabei der Kontrolle durch T-Lymphozyten. Diese erhielten ihren Namen abgeleitet von ihrem Reifungsorgan, dem Thymus. Ein T-Lymphozyt erhält sein Stimulationssignal wiederum von Antigen-präsentierenden Zellen (*antigen presenting cell*, APC) wie den dendritischen Zellen und den Makrophagen. Dabei präsentiert eine solche Zelle ihr Antigen in Form von Peptiden, gebunden an membranständige MHCII-Moleküle (*major histocompatibility complex*; beim Menschen auch HLA für *human leukocyte antigen*) genannt) dem für dieses Antigen spezifischen T-Zell-Rezeptor (TCR). Diese große Klasse der MHCII-kontaktierenden T-Lymphozyten tragen CD4-Moleküle (*cluster of differentiation 4*) auf ihrer Membranoberfläche. Diese Zellen nennt man daher auch CD4⁺ oder T-Helfer-Zellen. Sie schütten nach ihrer Aktivierung verschiedene Zytokine wie IL-2 (Interleukin 2), IL-4, IL-6, IL-10 und INF- γ (Interferon γ) aus, die für die Stimulation von B-Zellen, Makrophagen und T-Zell-Wachstum essentiell sind. Dabei lässt sich beobachten, dass es drei Gruppen von CD4-Zellen mit unterschiedlichen Zytokinmustern gibt:

1. Die T-Helfer-1-Zellen (Th1), die charakteristischerweise IL-2, IL-3, TNF β (Tumornekrosefaktor- β) und IFN γ produzieren, was vor allem Makrophagen stimuliert, sich gegen intrazelluläre Erreger wie beispielsweise Mykobakterien oder auch Viren zu wehren.

2. Die T-Helfer-2-Zellen (Th2) sezernieren typischerweise IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10 und IL-13, was die Produktion von IgE und die Bildung eosinophiler Granulozyten anregt. Diese Vorgänge sind für den Organismus wichtig, um sich effektiv gegen Würmer (Helminthen) und extrazelluläre Erreger zu wehren.

3. Die regulatorischen T-Zellen (Treg), welche einen immunsupprimierenden Effekt ausüben.

Die Th1 und Th2-Zellen hemmen sich durch ihr Zytokinmuster gegenseitig, so dass bei einer Immunantwort ein Typ dominiert.

Die Gruppe der Treg erlebte in den letzten Jahren eine regelrechte Renaissance. Lautete ihr historischer Name in den 70er und 80er Jahren noch T-Suppressorzellen, so werden sie seit Mitte der 90er Jahre als T-regulatorische Lymphozyten (Treg-Zellen) bezeichnet. Ihr Anteil an der CD4-T-Zellpopulation beträgt 5-10% (Le et al., 2007). Ihre Funktion liegt im immuninhibitorischen Bereich. D.h. sie sind für die Dämpfung der Entzündungsreaktionen des Immunsystems verantwortlich. Insbesondere obliegt ihnen die Aufgabe der Verhinderung von Autoimmunerkrankungen wie beispielsweise der Rheumatoiden Arthritis. Eine Subpopulation der Treg ist durch die konstitutive Expression von CD25 gekennzeichnet (CD4⁺CD25⁺ Treg). Sie werden hauptsächlich im Thymus gebildet und entstehen bereits in den ersten Tagen nach Geburt. Die Treg-Zellen weisen zudem typischerweise eine konstitutive Expression von GITR (*glucocorticoid-induced TNFR family-related gene*), CTLA-4, CD45RB^{low} CD62L sowie von FoxP3- (*X-linked Forkhead/winged helix transcription factor*) auf (Übersicht Cesana et al., 2006; Le et al., 2007).

Im Gegensatz zu den natürlich vorkommenden Treg gibt es auch die Gruppe der induzierbaren regulatorischen T-Zellen. Diese werden je nach Zytokin-Expression als Tr1- (Zytokine IL10 und IFN γ) und Th3-Zellen (Zytokin TGF β) bezeichnet. Sie entstehen während einer Immunreaktion, um eine pathologisch verlängerte

Immunantwort zu verhindern (Übersichtsarbeiten Humrich et al., 2006; Le et al., 2007).

Die zweite große Gruppe der T-Zellen heißt CD8-Zellen. Sie tragen ein CD8-Molekül auf ihrer Membranoberfläche und erkennen ihr antigenes Peptid im Kontext von MHC-Molekülen der Klasse I (MHCI). CD8+ T-Zellen können sich zu zytotoxischen Lymphozyten (CTL) differenzieren, die fremde oder virusbefallene Zellen töten können.

1.2. T-Zell-Aktivierung

Wie oben bereits kurz erwähnt, erhält der T-Lymphozyt sein Stimulationssignal über MHC-Peptid-Komplexe. Die CD4-Zellen (T-Helfer-Zellen) binden dabei mit ihrem TCR spezifisch an MHCII-Komplexe, die sich nur auf professionell Antigen-präsentierenden Zellen (APC) befinden. Das MHCII-Molekül präsentiert Epitope von Antigenen, die die APC vorher endozytiert und im Phagosom fragmentiert hat (Länge von 12-24 Aminosäuren). Der TCR der CD4-Zelle kann nur an den MHCII-Peptid-Komplex binden, wenn er an bestimmten spezifischen Bindungsstellen für das präsentierte Antigen mit diesem harmoniert. Das ist der Grund, weshalb die Immunantwort auf ein spezifisches Antigen ebenfalls spezifisch ausgerichtet ist. Die CD4-Zelle triggert somit eine spezifische Immunantwort. Die eben beschriebenen Bindungsstellen der TCR liegen im menschlichen Organismus in einer großen Vielfalt vor. Diese entsteht während der Reifungsphase des Thymus, wo eine Vielzahl von T-Zell-Klonen gebildet werden, die sich in der Sequenz und AG-Spezifität ihrer TCR von einander unterscheiden. Sie stellen das Potential zur Bekämpfung eventueller späterer Infektionen dar. Eine CD4-Zelle, die noch nie Antigenkontakt hatte, nennt man naive CD4-Zelle im Gegensatz zu den Gedächtnis-CD4-Zellen, welche bereits Kontakt mit ihrem Antigen hatten.

Die CD8-Zellen erkennen mit ihrem TCR MHCI-Moleküle, die sich auf jeder menschlichen Zelle (Ausnahme Erythrozyten) befinden. Die Ausstattung mit MHCI-Molekülen ist auf jeder Zelle eines Organismus identisch. Sie stellt sozusagen die „immunologische Identität“ der Zelle dar. Wie MHCII kann auch

MHCI Peptide präsentieren. Doch sind es diesmal nicht phagozytierte sondern im Zytoplasma fragmentierte Peptideinheiten, die im endoplasmatischen Retikulum an MHCI gebunden werden. Während der Reifungsphase der T-Zellen im Thymus werden diejenigen CD4- und CD8-Zellen durch Apoptoseinduktion eliminiert, die gegen körpereigenes Peptid potentiell reaktiv sein können. Dieser Mechanismus ist äußerst wichtig, um eine Selbsttoleranz zu gewährleisten (Vermeidung von Autoimmunerkrankungen wie z.B. der Rheumatoiden Arthritis). Trifft eine im Thymus für tauglich befundene CD8-Zelle später auf ein MHCI, das ein für sie passendes Peptid präsentiert, bedeutet dies, dass es sich um ein Fremdartigen handeln muss, weil, wie oben berichtet, auf Selbstantigene geprägte Zellen ausgelöscht wurden. Solch ein in einer Körperzelle produziertes Fremdartigen kann beispielsweise auf einer Virusinfektion oder einer tumorösen Entartung beruhen. Mit verschiedenen Mechanismen (CD95-Ligand, Perforin, Proteasen) wird die veränderte Zelle von CTL nun in die Apoptose getrieben.

1.2.1 Kostimulation

Neben dem MHC-TCR-Signal benötigt eine naive CD4-Zelle (s.o.) immer noch ein zweites Signal zur endgültigen Stimulation. Dieses besteht aus der Bindung von CD28 der CD4-Zelle an CD80 (B7.1) oder CD86 (B7.2) der APC. Ohne diese Bindung verläuft die T-Zell-Aktivierung insuffizient bzw. kehrt sich ins Gegenteil um, die naive Zelle wird anerg, d.h. nicht mehr erregbar (Schwartz, 1990; Harding et al., 1992) und steht für zukünftige Immunreaktionen nicht mehr zur Verfügung. CD28 hat dabei konkret die Aufgabe, die Ausschüttung von IL-2 und die Zytokinproduktion (durch vermehrte Transkription und Stabilisierung der mRNA) zu erhöhen sowie die Apoptose zu verhindern (durch Hochregulierung des anti-apoptotischen Proteins BCL-XL). Gedächtnis-T-Zellen, die bereits einmal mit ihrem spezifischen Antigen Kontakt hatten, haben eine niedrigere Aktivierungsschwelle und benötigen die Kostimulation über CD28 nicht mehr unbedingt. Für sie genügt auch eine genügend hohe Antigenkonzentration zur Aktivierung. Antigenbindung durch den TCR löst im Kontaktbereich der APC mit der CD4-Zelle eine Reorganisation aus, es bildet sich die Struktur einer immunologischen Synapse (IS), die wiederum aus zwei Zonen aufgebaut ist, der zentralen und der peripheren Zone. In der zentralen Zone befinden sich z. B. die Rezeptoren

MHCII, TCR, B7-1/-2, CD28, in der peripheren Zone vorwiegend Adhäsionsmoleküle.

CD28 ist ein Glykoprotein-Homodimer und gehört wie der TCR, die Antikörper und das MHC zur Immunglobulinsuperfamilie. Es wird auf menschlichen CD4-Zellen zu 95% und auf CD8-Zellen zu 50% konstitutiv exprimiert (Lenschow et al., 1996). Daneben gibt es weitere Oberflächenmoleküle, die für die Signalübertragung zwischen APC und T-Zelle von Wichtigkeit sind wie LFA-1 (*lymphocyte function-associated antigen-1*) und VLAs (*very late activation antigen*) [Übersichtsarbeit: Saito, 1998].

In den letzten Jahren wurden weitere kostimulatorische T-Zell-Oberflächenmoleküle entdeckt, welche mit den APC kommunizieren. ICOS (*inducible costimulator*, CD278) wird auf naiven T-Zellen nicht exprimiert, sondern nach TCR-Stimulation auf CD4-Zellen induziert und dann auf Th2 in größerer Dichte exprimiert als auf Th1. Den ICOS-Liganden (auch B7h, B7H2, GL50, B7RP-1 oder LICOS genannt) findet man auf APC, aber auch in nicht-lymphatischen Geweben wie Herz, Niere, Lunge, Peritoneum und Hoden. Die Funktion von ICOS liegt wahrscheinlich in der Aufrechterhaltung der Immunantwort und nicht in der primären Stimulation. Es besteht somit ein Synergismus zwischen CD28 und ICOS (Übersichtsarbeit Greenwald et al., 2005).

Einen weiteren kürzlich entdeckten Liganden aus der B7-Familie auf APC stellt B7-H3 (B7RP-2) dar (daneben Expression in nicht-lymphatischem Gewebe wie Herz, Lunge, Nieren Leber, Hoden). Sein Rezeptor auf T-Zellen ist noch unbekannt. Lösliches B7-H3-Protein ist jedoch in der Lage, CD4- und CD8-Zellen zu stimulieren (bei Th1 stärker als bei Th2). Es gibt Hinweise, dass B7-H3 neben stimulatorischen auch immuninhibitorische Funktionen aufweist (Übersichtsarbeit Greenwald et al., 2005).

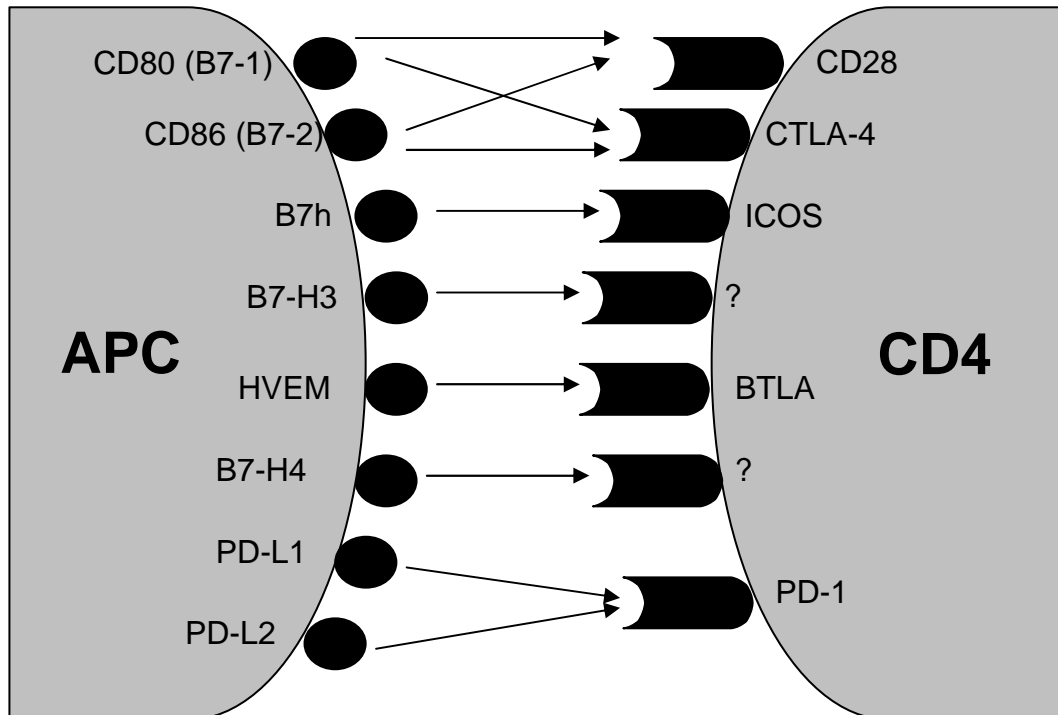


Abbildung 1: Schematische Darstellung der Mitglieder der B7-Familie und ihrer Verbindungen

1.3 Abschalten der T-Zellantwort

Die Beendigung der T-Zellantwort ist aktuell ein sehr aktives Forschungsfeld in der Immunologie. Inhibitorische Zytokine, oxidativer Stress, KIRs (*killer cell Ig-like receptors*), inhibitorische Fc-Rezeptoren (auf B-Zellen, Makrophagen, neutrophilen Granulozyten und Mastzellen) sowie die Induktion von Zelltod über Todesrezeptoren wie Fas begrenzen die inflammatorischen T-Zellreaktionen (Übersichtsarbeit: Saito, 1998; Leibson, 2004). Daneben spielt der T- und B-Zell-Rezeptor PD-1 (*programmed death-1*, CD279) aus der CD28-Familie mit seinen Liganden PD-L1 (B7-H1) und PD-L2 (B7-DC), welche in lymphatischen (Monozyten, dendritische Zellen) aber auch in nicht-lymphatischen Geweben (Herz, Lunge, Niere, Pankreas, Leber, Keratinozyten) exprimiert werden, eine wichtige immuninhibitorische Rolle. In PD-1-*knockout*-Mäusen entwickeln sich schwere Autoimmunkrankheiten, Glomerulonephritis, Arthritis, Kardiomyopathie und Graft-versus-Host-artige-Hautreaktionen, an denen die Mäuse bereits im Alter von 10 Wochen sterben (Übersichtsarbeit Greenwald et al., 2005).

Ein weiteres CD28-Homolog ist BTLA (B- und T-Lymphozyten-Attenuator, CD272), der ebenfalls auf T- und B-Lymphozyten, aber auch auf NK-Zellen, dendritischen und myeloiden Zellen sowie verschiedenen somatischen Geweben exprimiert wird und bei Ligation eine Lymphozyten-inhibitorische Wirkung hat. Sein Ligand ist HVEM (*herpes virus entry mediator*), welches nicht zur B7-, sondern zur TNFR-Familie (Tumornekrosefaktor-Rezeptor-Familie) gehört. HVEM war bislang bekannt als Rezeptor für das Herpes simplex Virus Typ I sowie für die Liganden LIGHT und Lymphotoxin- α . HVEM findet sich auf dendritischen Zellen, myeloiden Zellen, NK-Zellen, aber auch auf T- und B-Lymphozyten.

Ein weiterer erst kürzlich entdeckter Ligand für ein inhibitorisch wirkendes T-Zelloberflächenmolekül ist B7-H4 (B7x, B7S1). Das Molekül findet sich wie die PD-1-Liganden in lymphatischen (Milz, Thymus) und nicht-lymphatischem Geweben (Lunge, Leber, Hoden, Ovar, Plazenta, Skelettmuskel, Pankreas, Dünndarm). B7-H4 bewirkt die Hemmung der TCR-vermittelten T-Zell-Proliferation und ist wahrscheinlich wichtig für die Herunterregulierung der Immunantwort in den peripheren Geweben (T-Zell-Toleranz), (Übersichtsarbeit Greenwald et al., 2005).

Darüber hinaus spielt der Gegenstand dieser Arbeit, das T-Zelloberflächenmolekül CTLA-4 (CD152) eine zentrale Rolle bei der Inhibition und Beendigung von Immunantworten. Darauf soll hier näher eingegangen werden.

1.3.1 CTLA-4

CTLA-4 (*cytotoxic T lymphocyte antigen-4*) besitzt 75% Sequenzhomologie zu CD28 und ist wie dieses ein Homodimer aus zwei glykosylierten Peptidketten von 198 Aminosäuren Länge, die über Disulfidbrücken miteinander verbunden sind (je 35 kD Größe). Die Gene für CD28, CTLA-4, ICOS und PD1 liegen auf dem Chromosom 2 eng beieinander. CD28 und CTLA-4 besitzen beide in der Ligandenbindungsregion das gleiche Peptidmotiv auf: MYPPY. Diese Ähnlichkeit erklärt, weshalb CTLA-4 dieselben Liganden wie CD28 bindet, nämlich B7.1 und B7.2, die man auf APC findet. CTLA-4 besitzt jedoch

gegenüber B7.1 und B7.2 eine 50-2000fach höhere Affinität als CD28, je nach Analyse (CTLA-4-B7.1 höchste Affinität, dann CTLA-4-B7.2 und CD28-B7.2, am geringsten CD28-B7.1; Linsley et al., 1994; Greene et al., 1996; van der Merwe et al., 1997). Dabei kann ein CTLA-4-Dimer an bis zu zwei B7-Moleküle fest binden und umgekehrt, was die hohe Affinität miterklärt.

Der zytoplasmatische Teil des CTLA-4-Moleküls (33 Aminosäuren lang) weist nur eine geringe Homologie zu CD28 auf, ist jedoch zwischen den CTLA-4-Molekülen von Maus, Ratte, Kaninchen und Huhn zu 100% konserviert (Harper et al., 1991), was auf einen hohen Evolutionsdruck und damit auf eine sehr wichtige Funktion hinweist, welche keinerlei Mutationen zulässt.

Der größte Teil des in der Zelle vorhandenen CTLA-4 befindet sich in intrazellulären Vesikeln im Zytoplasma. Nur wenige Moleküle werden auf der Zelloberfläche exprimiert. Der Grund dafür ist die schnelle Endozytose von CTLA-4 (Linsley et al., 1996; Alegre et al., 1996). Die Einleitung des Endozytosevorganges geschieht durch die Bindung von Clathrin-Adaptor AP-2 an den AP50 genannten Teil des zytoplasmatischen CTLA-4. Dieser Schritt kann durch Phosphorylierung des so genannten Y201VKM-Motivs des zytoplasmatischen CTLA-4 verhindert werden. Die eigentliche Funktion von CTLA-4 ist jedoch nachweislich weder von der phosphorylierten noch von der endozytierten Form abhängig (Nakaseko et al., 1999, Cinek et al., 2000, Baroja et al., 2000). Während des Kontaktes der T-Zelle mit der APC befindet sich der Großteil der Vesikel in der Nähe des TCR, vorher in der Nähe der Mikrotubuli-organisierenden Zentren (MTOC).

Die CTLA-4-mRNA lässt sich bereits eine Stunde nach Beginn der T-Zellaktivierung nachweisen (Lindsten et al., 1993) und wirkt sich bereits vier Stunden nach der Aktivierung auf die IL-2-mRNA aus (Details s. 1.3.2; Brunner et al., 1999). Das Maximum der CTLA-4-Expression findet sich nach zwei bis drei Tagen (Walunas et al., 1994), das des CTLA-4-mRNA-peaks bereits nach 24-36 Stunden (Lindsten et al., 1993).

Exprimiert wird CTLA-4 vor allem auf den CD4-Zellen (1,3% der peripheren CD4-Zellen CTLA-4-positiv bei gesunden Personen [0,5-2,1% bei 95% Konfidenzintervall; Schlotmann et al., 2000]). Bei verschiedenen Erkrankungen steigt die Fraktion CTLA-4⁺ T-Zellen an, z.B. auf 16,2% bei der akuten Malaria

tropica, 4,3% bei HIV, 5,2% bei der Wegenerschen Granulomatose (Schlotmann et al., 2000, Steiner et al. 2001). Bei Rückgang der Parasitämie bzw. der Viruslast zeigte sich ein Rückgang der Werte (Steiner et al., 2001; Schlotmann et al., 2000). Durch das Mitogen PHA (Phytohämagglutinin) lassen sich innerhalb von 48 Stunden die CTLA-4-Expressionsraten in der Zellkultur dramatisch auf 46,7% steigern (Steiner et al., 2001). Dies zeigt, dass CTLA-4 als T-Zell-Aktivierungsmarker gelten kann.

Auf CD8-Zellen finden sich wesentlich geringere Expressionsraten (1% auf CD8-Zellen, kein Anstieg durch Immunstimulation), was auf die Wichtigkeit von CTLA-4 v.a. bzgl. Funktion und Wirkung bei CD4-Zellen hinweist. Lediglich bei der Wegenerschen Granulomatose konnte bislang eine CTLA-4-Expression auf im Mittel 2,2% der B-Zellen nachgewiesen werden (Steiner et al., 2001).

Die Rolle von CTLA-4 bei der T-Zellreifung im Thymus ist bislang noch unklar. Bei immunhistochemischen Anfärbungen kindlicher humaner Thymi fand sich in den Rinden jeweils nur eine geringe CTLA-4-Expression, im Mark hingegen waren 11-17% der CD4⁺ T-Zellen CTLA-4-positiv (Castan et al., 1998). In den Keimzentren humaner Lymphknoten exprimierten 70,2-89% der CD4⁺ T-Zellen CTLA-4 (Castan et al., 1997).

1.3.2 CTLA-4 und seine Rolle als negativer Regulator der T-Zellantwort

CTLA-4 hat eine essentielle inhibitorische Wirkung auf die T-Zellantwort. Dies wurde besonders überzeugend von mehreren Gruppen mit CTLA-4-knockout-Mäusen gezeigt. Diese sterben bereits innerhalb weniger Wochen an überschießender polyklonaler Lymphoproliferation und lymphatischen Infiltrationen in verschiedene Organsysteme (Tivol et al., 1995; Waterhouse et al., 1995). Eine eventuelle Apoptose-triggernde Eigenschaft von CTLA-4 konnte lediglich durch eine Arbeitsgruppe nachgewiesen werden (Gribben et al., 1995). Versuche mit komplexeren Modellen konnten die Apoptose-induzierende Wirkung von CTLA-4 jedoch nicht mehr bestätigen (Blair et al., 1998; Van Parijs et al., 1999). Die Blockade von CTLA-4 auf T-Zellen mittels monoklonaler CTLA-4-Antikörper (zur CTLA-4-Inaktivierung) verstärkt eine aktivierungsinduzierte T-Zellproliferation sowie Zytokinsekretion (Walunas et al.,

1994; Hwang et al., 2002), was auch zum Auftreten von Autoimmunerkrankungen wie der autoimmunen Enzephalomyelitis (Chitnis et al., 2001) oder dem Diabetes mellitus (Luhder et al., 1998) führen kann.

Es gibt aktuell drei Modelle zur Erklärung des Wirkmechanismus von CTLA-4 (Übersichtsarbeit Chikuma et al., 2002):

1. Beim Ligand-Kompetitionsmodell wird davon ausgegangen, dass CTLA-4 aufgrund seiner höheren Bindungsaffinität das kostimulatorische CD28-Molekül von der gemeinsamen Bindungsstellen B7.1 und B7.2 verdrängt und somit die Aktivierung der T-Zelle blockiert. Eine eigene intrazytoplasmatische Signalkaskade von CTLA-4 ausgehend ist für diesen Effekt nicht vonnöten. Unterstützung findet dieses Modell durch Experimente, bei denen der intrazytoplasmatische Anteil von CTLA-4 stark mutiert wurde und dennoch eine T-Zell-suppressorische Wirkung aufrechterhalten werden konnte (Carreno et al., 2000; Masteller et al., 2000).

2. Das distale Blockadmodell nimmt an, dass CTLA-4 die stimulatorische Signalkaskade, die durch den Kontakt des TCR mit der Antigen-besetzten APC in Gang gesetzt wurde, unterhalb des TCR (also distal) wieder außer Kraft setzt. Inhibiert wird insbesondere die TCR- und CD28-abhängige Signaltransduktion der extrazellulären Kinase (ERK [Calvo et al., 1997]) sowie NF- κ B (*nuclear factor-kappa B* [Olsson et al., 1999]). Dadurch inhibiert CTLA-4 letztlich die Produktion von cdk4, cdk6 und cyclin D3, was ein Sistieren der T-Zellen in der G1-Phase des Zellzyklus bewirkt (Krummel et al., 1995, Walunas et al., 1994, Brunner et al., 1999). Daneben werden die IL-2-Produktion der aktivierten T-Zelle und die IL-2-Rezeptor-Expression reduziert. Bis heute bleibt ungeklärt, welche genauen Mechanismen für diesen Effekt verantwortlich sind. Ein möglicher Mechanismus ist die Sequestrierung zytoplasmatischer Kinasen wie der Lymphozyten-Kinase Rlk, Janus-Kinase Jak-2 und der Src-Kinasen Fyn, Lyn und Lck, welche für die Signalweiterleitung von CD28 essentiell sind aber auch gleichzeitig von CTLA-4 verwendet werden (Brunner et al., 1999, Greenwald et al., 2002).

3. Das proximale Blockadmodell postuliert, dass CTLA-4 direkt am TCR seine inhibitorische Wirkung entfaltet. Unterstützung erhält dieses Modell durch die Beobachtung, dass CTLA-4 nach der T-Zellaktivierung aus den intrazellulären

Speichern freigesetzt und in der immunologischen Synapse neben dem TCR exprimiert wird. Dabei kann es mit der ζ -Kette des TCR-CD3-Komplexes interagieren und die Phosphorylierung der ζ -Kette verhindern, was die Funktionalität des TCR und die eigentlich folgende T-Zellaktivierung hemmt (Lee et al., 1998). Die genauen Mechanismen sind hierbei jedoch noch unbekannt.

Die drei dargestellten Modelle schließen sich nicht gegenseitig aus. Zuletzt wurden die oben genannten „klassischen“ Modelle durch ein Modell der reversen Hemmung ergänzt. Denn es konnte experimentell gezeigt werden, dass durch die CD80/CD86-CTLA-4-Bindung in den APC (dendritische Zellen) eine Hochregulation und Aktivierung des Enzyms Indoleamin 2, 3-Dioxygenase (IDO) erfolgt. IDO katabolisiert Tryptophan, und sowohl Tryptophanmangel als auch die Metaboliten dieser essentiellen Aminosäure hemmen T-Zellen. Somit wirkt CTLA-4 zusätzlich zu seinen direkten Wirkungen auf die T-Zellen revers über die Ligation seiner Bindungspartner auf den APC (Grohmann et al., 2002, Fallarino et al., 2003).

Vor kurzem ist eine Spleißvariante von CTLA-4 entdeckt worden, welche über keinen extrazellulären Anteil verfügt, was die Bindung an die Liganden CD80 und CD86 unmöglich macht. Diese Variante wurde entsprechend Ligand-unabhängiges CTLA-4 genannt (*ligand independent CTLA-4* = liCTLA-4). Trotz fehlender Bindungsmöglichkeit wirkte diese Spleißvariante inhibitorisch und hemmte die T-Zellproliferation und Zytokinproduktion (Vijakrishnan et al., 2004; Chikuma et al., 2005). Über den Wirkmechanismus herrscht noch Uneinigkeit. Vorgeschlagen wurden eine Modifikation der Phosphorylierung der ζ -Kette des TCR und/oder eine Hemmung der Signaltransduktion durch die extrazelluläre Kinase (ERK). Diese Spleißvariante findet sich v.a. in T-Gedächtniszellen und Treg und ist dauerhaft inhibitorisch wirksam. Man meint, dass diese Dauerinhibition der genannten Zellen eine T-Zellaktivierung auf schwache Signale hin und somit auch die Entstehung von Autoimmunerkrankungen verhindern soll.

Neben diesen molekularbiologischen Modellsichtweisen wurden in den letzten Jahren auch eher abstrakt-theoretische CTLA-4-Funktionsmodelle für die

inhibitorische CTLA-4-Wirkung vorgeschlagen. Im Folgenden werden die zwei Modelle vorgestellt, die sich gegenseitig nicht ausschließen:

Das Schwellenmodell besagt, dass jede T-Zelle für die vollständige Aktivierung eine bestimmte Aktivierungsschwelle überschreiten muss. Reicht der Grad der Aktivierung, d.h. die Signalstärke nicht aus, bleibt die Zelle inaktiv. Dabei ist noch nicht geklärt, ob das Signal des T-Zellrezeptors und/oder die kostimulatorischen Signale (CD28) einen bestimmten Schwellenwert überschreiten müssen. Das Hemmmodell hingegen geht davon aus, dass stimulierte T-Zellen, die in den Zellzyklus eintreten, durch die Wirkung von CTLA-4 eine Restriktion ihrer Teilungsphasen erfahren, d.h. dass ihre Proliferation nach Immunstimulation gehemmt wird (Doyle et al., 2001).

Die Frage, ob CTLA-4 stärker die Th1- oder die Th2-Antwort inhibiert, kann bis heute nicht eindeutig geklärt werden. Für beide Möglichkeiten gibt es Hinweise, so dass man eventuell annehmen kann, dass CTLA-4 beide Typen äquivalent inhibiert (Übersichtsarbeit Chambers et al., 2001).

Der Einfluss von CTLA-4 auf die Induktion einer T-Zell-Anergie wurde in den letzten 10 Jahren von mehreren Arbeitsgruppe thematisiert. Dabei konnte in ersten Experimenten durch CTLA-4-Blockade eine gewisse T-Zellstimulation nach Zufuhr von eigentlich tolerogenen Antigenen beobachtet werden (Perez et al., 1997). In nachfolgenden Versuchen fanden sich jedoch widersprüchliche Ergebnisse bzgl. Anergie-Induktion durch CTLA-4, so dass die definitive Rolle für CTLA-4 und Anergie noch ungeklärt bleibt. Solche Widersprüche lassen sich eventuell durch den gegensätzlichen Wirkmechanismus einer CTLA-4-Blockade mittels monoklonaler CTLA-4-Antikörper und einer CTLA-4-AK-Bindung mit gleichzeitiger Kreuzvernetzung (Ligation) der Antikörper erklären. Die lediglich monoklonale Einzelbindung bewirkt eine Blockade und somit Signalaufhebung des CTLA-4-Moleküls. Die Ligation bewirkt hingegen eine Stimulation und somit Zunahme des anti-entzündlichen Effekts von CTLA-4.

Auch scheint CTLA-4 bei der Induktion von inhibitorischen Zytokinen eine Rolle zu spielen. Zum Zytokin TGF β gibt es widersprüchliche Daten. Zwar konnte man durch CTLA-4-Kreuzvernetzung (also Ligation mit funktioneller Stimulation) eine Induktion des anti-inflammatorischen Zytokins TGF β nachweisen (Chen et

al., 1998, Gomes et al., 2000), jedoch gab es zuletzt auch vermehrt Hinweise, dass die inhibitorische Wirkung von CTLA-4 auf T-Zellen TGF β -unabhängig verläuft (Schwarz et al., 2000; Sullivan et al., 2001). Vielmehr scheint das anti-entzündliche Zytokin Interleukin 10 (IL10) durch CTLA-4-Aktivierung induziert zu werden (Schwarz et al., 2000; Jovasevic et al., 2004). Dies wiederum führt direkt zur Inhibierung des immunstimulierenden Zytokins IFN γ .

In den letzten Jahren kam es zur Renaissance der so genannten regulatorischen T-Zellen (früher T-Suppressor-Zellen), welche CD4- und CD25-positiv sind. Auf diesen findet sich eine konstitutive Expression von CTLA-4, weshalb die Hypothese aufkam, deren T-Zell-inhibitorische Wirkung sei CTLA-4-getriggert. Aktuelle Experimente vertreten jedoch vielmehr die These, dass die regulatorischen T-Zellen und CTLA-4 eher unabhängige wenngleich auch gleichgerichtete Funktionen ausüben (Takahashi et al., 2000).

Bei der Entwicklung von Autoimmunkrankheiten scheint CTLA-4 jedoch eine wichtige Rolle zu spielen. Der natürliche genetische Polymorphismus, der auch den CTLA-4-Rezeptor betrifft, kann zu Funktionsverlusten führen und somit das Auftreten von Autoimmunkrankheiten bedingen. So ist beispielsweise der Nukleotid-Polymorphismus in der 6.1 kb 3' Region von CTLA-4 mit der Manifestation von Krankheiten wie dem Morbus Basedow, der Autoimmunhypothyreose und dem Diabetes mellitus Typ I assoziiert (Ueda et al., 2003: +49G-CT60G-Haplotyp der 3' *untranslated region* des CTLA-Gens). Durch die Mutation scheint die CTLA-4-Expression (auf RNA-Ebene) erniedrigt zu werden. Weitere Allelvarianten bedingen die Entstehung der Rheumatoiden Arthritis (Rodriguez et al., 2002: 3' *untranslated region* des CTLA-Gens mit vermehrtem Anteil von AT *large*-Allelen) und der Multiplen Sklerose (Kantarci et al. 2003: Homozygotie für AT₈-Allel vom 3'(514)-Mikrosatelliten und Homozygotie für 5'(318)*C/E1(49)*A/3'(514)*AT₈-Haplotyp).

All diese Ergebnisse zeigen, dass CTLA-4 eine wichtige (inhibitorische) Rolle bei der T-Zellaktivierung spielt und ein Fehlen dieses Moleküls zu einem mit dem Leben unvereinbaren Kontrollverlust des Immunsystems führt.

1.3.3 CTLA-4 und seine Bedeutung in der Tumorthherapie

Tumoren können einen immunogenen Charakter haben. Dies erklärt sich aus ihrer Eigenschaft, spezifische tumoreigene Antigene auf MHC I zu präsentieren, die von T-Zellen als fremd erkannt werden können. Dies leisten CD8-Zellen (in diesem Fall tumorinfiltrierende Lymphozyten [TIL] genannt), da sie mit ihrem TCR an Tumor-MHC I binden können. Man hat bereits für verschiedene Tumoren spezifische Antigene identifizieren können. Besonders bei Melanomen fand man eine große Anzahl solcher Tumorantigene, die auch Tumorabstoßungsantigene (*tumor-rejection antigens*, TRA) genannt werden, wie z. B. MAGE, Melan A, Tyrosinase, gp100 und gp75. Dass das Immunsystem trotz Expression dieser Antigene in vielen Fällen nicht eine Regression des Tumors bewirkt, kann verschiedene Gründe haben. Zunächst „profitiert“ der Tumor als körpereigenes Gewebe von den physiologischen Toleranzmechanismen des Immunsystems. Außerdem gibt es eine Vielzahl von immunologischen *Escape*-Mechanismen, die Tumoren vor dem Angriff des Immunsystems schützen können:

1. Die Tumorantigene werden nicht in der für die T-Zellaktivierung notwendigen Dichte auf der Oberfläche exprimiert.
2. Die zur Präsentation nötigen MHC I-Moleküle sind zum Teil auf den malignen Zellen herunterreguliert, so dass es zu einem Fehlen kostimulatorischer bzw. zu zu starken inhibitorischen Signalen (IL10, TGF β , Prostaglandine, regulatorische T-Zellen, CTLA-4) kommt.
3. Die Anzahl und/oder Funktion der T-Helferzellen (CD4) ist nicht suffizient.
4. Die Tumorantigene sind gar keine körperfremden Antigene, sondern stellen vielmehr physiologische Gewebeantigene dar, die lediglich für das jeweilige (entartete) Gewebe typisch sind.

Ziel einer immunologischen Anti-Tumorthherapie muss es also sein, die Tumortoleranz zu durchbrechen und die *Escape*-Mechanismen zu überwinden. Eine Möglichkeit, dies zu erreichen, besteht darin, die Tumorantigene dem Immunsystem in immunogener Form zu präsentieren. Dies gelingt durch Vakzinierung des Patienten mit aufgereinigtem Tumorantigen. Das Antigen kann jetzt von den APC des Patienten aufgenommen und präsentiert werden. Die folgende Stimulation des Immunsystems (besonders der CD8-Zellen) führt zu

einer Regression des Tumors (Jäger et al., 1996; Rivoltini et al., 1995; Visseren et al., 1995). Noch verstärkt werden kann diese Reaktion durch Zugabe von GM-CSF (Granulozyten-Makrophagen-koloniestimulierender Faktor) als systemisches Adjuvans (Jäger et al., 1996) oder auch durch in-vitro-Konjugation der Antigene an Adjuvantien wie BCG oder Extrakte aus *Corynebacterium parvum*. Erklärt werden kann die Verbesserung mittels GM-CSF durch die vermehrte Mobilisation dendritischer Zellen aus dem Knochenmark zur Antigenpräsentation.

Durch eine zusätzliche Gabe von anti-CTLA-4-Antikörpern verspricht man sich therapeutisch ein Ausschalten der negativ regulierenden Funktion von CTLA-4, was eine zusätzliche Aktivierung des Immunsystems im Kampf gegen den Tumor bedeuten würde. Denn man weiß, dass CTLA-4 essentiell für die Induktion von peripherer Toleranz ist (Perez et al., 1997). In tierexperimentellen Versuchen konnte bereits eine signifikante Steigerung der Tumorabwehr beim Colon-, Nierenkarzinom, Lymphomen und dem Fibrosarkom durch Gabe von anti-CTLA-4-Antikörpern gezeigt werden (Yang et al., 1997, Hurwitz et al., 1998, Shrikant et al., 1999, Sotomayor et al., 1999). Selbst wenn die CTLA-4-Antikörper mehr als eine Woche nach Implantation eines Tumors appliziert wurden, kam es noch zu einer deutlichen Tumorregression (Leach et al., 1996). In den letzten Jahren gab es vermehrt Studien zu Vakzinierungen beim Malignen Melanom unter Zuhilfenahme von GM-CSF (s.o., Huang et al., 1994), welche jedoch nicht zufrieden stellende Ergebnisse erbrachten. Unter Zugabe von CTLA-4-Antikörpern im murinen Modell kam es jedoch zu Ansprechraten von bis zu 67% (van Elsas et al., 1999; van Elsas et al., 2001). Interessanterweise stellte sich nach Vakzinierung und CTLA-4-AK-Gabe eine Depigmentierung ein (spricht für Bekämpfung melanozytärer Zellen. Dies deutet daraufhin, dass durch CTLA-4-Blockade auch die Toleranz gegenüber normalen Melanozyten gebrochen wird. Dieses Phänomen weist auf das Risiko der Autoimmuninduktion einer CTLA-4-AK-Therapie hin. Eine CTLA-4-Antitumortherapie wird daher v.a. in der Therapie von so genannten nicht-essentiellen Tumoren angewandt, also Tumoren von Organen, die nicht unbedingt lebensnotwendig sind wie die Milz, die Prostata etc. Dadurch reduziert man das Risiko der Gefährdung des gesamten Organismus durch Induktion von Autoimmunität gegen lebenswichtige Organe. Aber selbst bei Einhaltung dieser Vorgabe (z.B. Melanozyten-Antigen-Vakzinierung plus CTLA-4-Blockade beim metastasierten Malignen Melanom) kam es bereits zur

Induktion von Autoimmunität (Autoimmun-Uveitis, Exantheme, entzündliche Darmerkrankungen) allein durch die CTLA-4-Blockade (Robinson et al., 2004, Sanderson et al., 2005). Bestimmte CTLA-4-Genotypen scheinen dabei besonders prädisponiert zu sein (Ueda et al., 2003).

Mittlerweile ist ein monoklonaler CTLA-4-AK kommerziell erhältlich, das Ipilimumab (MDX-010 von der Firma Medarex, USA), welcher bis zum heutigen Tag in zahlreichen Studien getestet wurde. Ergebnisse aus einer 2003 veröffentlichten Phase I-Studie, in der 14 Melanompatienten vakziniert und anschließend mit CTLA-4-AK behandelt wurden, erbrachten eine klinische Ansprechrate von 21% (3 von 14 Patienten; Phan et al., 2003). Weitere Phase I/II-Studien mit Vakzinierung und CTLA-4-AK-Gabe wurden abgeschlossen, welche Ansprechraten von 13% (7 von 56 Patienten; Attia et al., 2005) und bei 3 von 7 Melanom- und bei 2 von 2 Ovarial-CA-Patienten ergab (Hodi et al., 2003). Ohne Vakzinierung zeigte sich unter Therapie des metastasierten Malignen Melanoms mit CTLA-4-AK und Zugabe von IL2 ein Ansprechen von 22% (8 von 36 Patienten; Maker et al., 2005). Eine weitere Studie mit einer CTLA-4-AK-Monotherapie wies lediglich eine Ansprechrate von 11% (5 von 46 Patienten) beim metastasierten Malignen Melanom auf (Maker et al., 2006). Unter Verwendung eines anderen monoklonalen humanen CTLA-4-AK (Ticilimumab von der Firma Pfizer, USA) gab es ein Ansprechen von 17% (5 von 30 Melanompatienten; Reuben et al., 2006). Eine Pilotstudie bei metastasiertem Colon-CA, Prostata-CA und vier Patienten mit non-Hodgkin-Lymphomen (NHL) mit Vakzinierung und anschließend CTLA-4-AK-Therapie ergab eine Tumorregression bei zwei der Lymphompatienten, weshalb aktuell eine Phase I/II-Studie zu CTLA-4-AK und folliculären Lymphomen durchgeführt wird (O'Mahony et al., 2007).

Interessanterweise zeigen sich die besten Ansprechraten jeweils bei den Patienten, bei denen sich unter CTLA-4-Therapie immunologisch getriggerte Nebenwirkungen einstellen wie Dermatitis, Diarrhoe, Vitiligo, Hypophysenunterfunktion sowie Hypo- und Hyperthyreose. Dies bedeutet, dass sich hier tatsächlich ein Durchbrechen der CTLA-4-bedingten Antiinflammation einstellt. Dieses Durchbrechen aktiviert neben den o.g. (unerwünschten) Symptomen erfreulicherweise auch eine effektive Antitumorantwort (Attia et al., 2005; Maker et al., 2005; Reuben et al., 2006). Untersuchungen konnten zeigen,

dass sich unter CTLA-4-AK-Therapie eine Reduktion der Treg-Anzahl und der IL10-Sekretion einstellt. Parallel kommt es zu einem Anstieg des Serum-IL2 (Reuben et al. 2006). Auch wenn der Treg-Abfall nur temporär ist (Maker et al., 2005), scheint sich dadurch ein anhaltender Antitumoreffekt einzustellen. Ob der Wirkmechanismus der CTLA-4-AK-Therapie jedoch eher auf einer allgemein verbesserten Immunantwort (Maker et al., 2005) oder einem spezifischen (Funktions-)Verlust der Treg beruht (O'Mahony et al., 2007) ist noch nicht endgültig geklärt. Dazu laufen derzeit zahlreiche klinische und theoretische Studien. Offensichtlich ist nur, dass bei Patienten mit erfolgreicher CTLA-4-AK-getriggelter Tumorregression eine deutliche Tumordinfiltration durch T-Lymphozyten zu beobachten war (O'Mahony et al., 2007).

Als Ergänzung zur oben beschriebenen Therapie mit vollständigen monoklonalen CTLA-4-AK wurde auch eine weitere therapeutische Option zur immunologischen Tumorbekämpfung entwickelt. Diese beruht auf einer Verabreichung von spezifischen RNA-Kurzstücken (so genannte Oligonukleotid-Aptamere), welche spezifisch an CTLA-4 binden, um somit seine Funktion blockieren. Diese Methode soll ähnlich wirken wie anti-CTLA-4-AK, wäre jedoch deutlich preiswerter (Santulli-Marotto et al. 2003).

1.4 Hyperthermie in der Tumorthherapie

Da in dieser Arbeit die CTLA-4-Expression auf PBL von Hyperthermie-behandelten untersucht wurde, soll hier kurz das Prinzip der Hyperthermie erklärt werden (Übersichtsarbeiten van der Zee et al., 2002; Wust et al., 2003).

Die Hyperthermie ist ein therapeutisches Verfahren, bei welchem bei Tumorkranken der gesamte Körper oder nur ein Teil (regionale oder Ganzkörperhyperthermie) für einen definierten Zeitraum auf 40-43°C erhitzt wird. Kombiniert wird diese Methode mit einer Chemo- oder Radiotherapie, was nachgewiesenermaßen eine gesteigerte Tumorregression bewirkt. Die Wirkweise wird vermutlich neben der direkt zytotoxischen Wirkung bei Temperaturen >42°C über die durch die Hyperthermie bedingte Mehrperfusion des erhitzten Gewebes bedingt (Erhöhung der basalen Tumorperfusion). Man weiß, dass Tumoren in aufgrund ihres raschen und relativ unkontrollierten Wachstums oftmals mangelperfundiert sind, was die Wirkung klassischer Chemo- und Radiotherapien

vermindert. Deren Wirksamkeit wird durch die nachhaltige Perfusionssteigerung durch Hyperthermie verbessert.

Ein weiteres Wirkprinzip ist die durch die Hyperthermie bedingten Induktion von Hitzeschockproteinen (*heat shock proteins*). Dies ist eine Proteingruppe, welche in erhitzten (gestressten) Zellen physiologischerweise gebildet wird. Ihre Funktionen reichen von der Stabilisierung des Zytoskelettes und des Zellmetabolismus bis zur immunologischen Oberflächenmarkierung überhitzter Zellen, die dadurch aktivierende Liganden für NK-Zellen exprimieren. Dies gilt besonders für Tumorzellen, die nach Hyperthermie durch spezielle Hitzeschockproteine markiert und dadurch als immunogen erkannt werden (Multhoff et al., 1995). Des Weiteren aktivieren von nekrotischen Zellen freigesetzte Hitzeschockproteine APC wie Makrophagen und dendritische Zellen. Es kommt somit sowohl zur Aktivierung des angeborenen (unspezifischen) Immunsystems als auch des erworbenen (spezifischen), was die Tumorabwehr verbessert.

1.5 Ziele der Arbeit

In dieser Arbeit wurden drei Ziele verfolgt:

1. Zunächst sollte die CTLA-4-Expression auf tumorinfiltrierenden Lymphozyten (TIL) untersucht werden. Hierzu sollten mit immunhistochemischen Doppelfärbungen CTLA-4-positive T-Zellen in Melanomschnitten nachgewiesen und quantifiziert werden. Da es mittlerweile zahlreiche Studien gibt, die den Effekt einer anti-CTLA-4-Therapie bei Tumorerkrankungen belegen (s. 1.3.3), sind die Zielzellen der CTLA-4-Blockade von großem Interesse. Kandidaten sind die TIL im Tumorgewebe selbst sowie CD4-Zellen im regionalen Lymphknoten, die nach Tumorantigen-Erkennung auf professionellen antigenpräsentierenden Zellen Hilfe für tumorspezifische CD8-Killerzellen leisten.
2. Außerdem sollte geprüft werden, ob und mit welcher Kinetik therapeutische Ganzkörperhyperthermie bei Tumorpatienten zu einer Aktivierung der T-Zellen führt. Als Marker der T-Zell-Aktivierung diene die CTLA-4-

Expression im peripheren Blut, welche immunzytochemisch bestimmt werden sollte.

3. Abschließend sollte mithilfe einer digitalen Kamera mit Bildauswertungs-Software ein objektives Quantifizierungsverfahren für die immunzytochemische CTLA-4-Färbung etabliert werden.

2 Material und Methoden

I. Material

2.1 Chemikalien

Die Chemikalien wurden, soweit es nicht anders vermerkt ist, in größtmöglicher Reinheit von den Firmen Fluka (Neu-Ulm), Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe) oder Sigma (Deisenhofen) bezogen.

2.2 Glas- und Plastikware

Eppendorf Reaktionsgefäße	<i>Eppendorf, Hamburg</i>
Gewebekulturflaschen 10 ml, 30 ml, 100 ml	<i>Greiner, Frickenhausen</i>
Gewebekulturplatten	<i>Greiner, Frickenhausen</i>
6 und 24 Vertiefungen	
96 Vertiefungen (Mikrotiterplatten)	
Kryoröhrchen	<i>Nunc, Roskilde, Dänemark</i>
Objektträger	<i>Engelbrecht, Edermünde</i>
Pipettenspitzen	<i>Sarstedt, Nürnberg</i> <i>Gilson, Villiers-le-bel,</i> <i>Frankreich</i>
Zentrifugenröhrchen (15, 50 ml)	<i>Falcon, Becton Dickson,</i> <i>Mountain View, CA, USA</i>

2.3 Laborgeräte

Analysenwaage	<i>Sartorius AG, Göttingen</i>
Fluoreszenzmikroskop mit automatischer Kameraanlage	<i>Mikroskop Axioskop 20 für</i> <i>Auflichtfluoreszenz und</i> <i>Mikroskopkamera MC 80,</i> <i>Zeiss, Oberkochen</i>

Heizblock	<i>Thermomixer 5436 Eppendorf, Hamburg</i>
Magnetrührer	<i>Jahnke & Kunkel IKA Labortechnik, Staufen</i>
Mikroskop	<i>inverses Mikroskop, CK2 Olympus, Japan</i>
pH-Meter	<i>pH 357 Labortec, Wiesbaden</i>
Pipetten	<i>Gilson Medical Electronics, Frankreich</i>
sterile Arbeitsbank	<i>Laminair, HB2448, Heraeus</i>
Wasserbad	<i>Thermomix, Braun</i>
Wasserdeionisierungsanlage	<i>Milli-Q-Plus, Molsheim, Frankreich</i>
Vortex	<i>Jahnke & Kunkel IKA Labortechnik, Staufen</i>
Zellerntegerät (Microcell Harvester)	<i>Skatron Instruments, Lier, Norwegen</i>
Zentrifugen	<i>Modell 5415C, Eppendorf, Hamburg Biofuge 1.0R, Heraeus, Hanau Biofuge 1.0, Heraeus, Hanau</i>
Zytozentrifuge	<i>Cytospin 3, Shandon, Frankfurt</i>

2.4 Software-Programme

OpenLab	<i>Improvision, Coventry, England</i>
Adobe Photoshop	<i>Adobe, San José, USA</i>

2.5 Zellbiologische und immunhistochemische Arbeiten

AEC-Tabletten (3-Amino-9-Ethylcarbazol)	<i>Sigma, Deisenhofen</i>
Anti Fade Solution	<i>Dr. Unteregger, Zweibrücken</i>

Blut (buffy coat)	<i>Blutbank Universitätskrankenhaus Hamburg-Eppendorf</i>
DMF (<i>o</i> -Dimethylformamid)	<i>Sigma, Deisenhofen</i>
DMSO	<i>Sigma, Deisenhofen</i>
Einbettmedium	<i>Jung, Heidelberg</i>
Ficoll (Dichte 1,077)	<i>Pharmacia, Freiburg</i>
Fetales Kälberserum (FCS)	<i>Gibco BRL, Paisley, UK</i>
Filterpapier	<i>Schleicher&Schüll, Frankfurt</i>
Gentamycin	<i>Gibco BRL, Paisley, UK</i>
Hämatoxylin	
HEPES	<i>Gibco BRL, Paisley, UK</i>
H ₂ O ₂	<i>Sigma, Deisenhofen</i>
³ H-Thymidin (79 mCi/mM)	<i>Amersham, Buckinghamshire</i>
InSpeck Calibration Kit (Green and Red)	<i>Molecular Probes, Eugene, USA</i>
Kaiser's Gelatine	<i>Merck, Darmstadt</i>
L-Glutamin (200 mM)	<i>Gibco BRL, Paisley, UK</i>
Neuraminidase	<i>Behring Diagnostics, Marburg</i>
Objektträger	<i>Supper Frost</i>
Phytohämagglutinin (PHA)	<i>Wellcome, Burgwedel</i>
Plasmodium falciparum Extrakt	<i>Dr. Walter</i>
PPD (Tuberkulin GT)	<i>Behring, Mannheim</i>
RPMI 1640	<i>Gibco BRL, Paisley, UK</i>
Schaferythrozyten (SRC)	<i>Mikrobiologische Zentraldiagnostik BNI</i>
Trypanblau (50x)	<i>Serva Feinbiochemica, Steinheim</i>
Verstärkungssystem	<i>DuPont NEN, Boston, USA</i>
Wachsstift	<i>Dako, Glostrup, DK</i>

2.5.1 Kulturmedien, Puffer und Stammlösungen

Jede benutzte Charge des fetalen Kälberserum (FCS) wurde vorher auf Eignung in den jeweiligen experimentellen Systemen geprüft. Vor Gebrauch wurde das Serum zur Inaktivierung der Komplementfaktoren für 30 min auf 56°C erhitzt und dann bei 4°C gelagert.

Alle Medien, Puffer etc. für die Verwendung in der Zellkultur wurden entweder aus sterilen Lösungen angesetzt oder durch Autoklavieren sterilisiert.

10x PBS

2,00 g KCl (Endkonzentration 26 mM)
2,00 g KH₂PO₄ (Endkonzentration 14 mM)
80,00 g NaCl (Endkonzentration 1,368 mM)
14,40 g Na₂HPO₄·2H₂O (Endkonzentration 81 mM)
ad 1 l H₂O, pH 7,4

R 10F

500 ml RPMI 1640
10 ml L-Glutamin (200 mM)
7 ml HEPES (1 M)
1 ml Gentamycin (50 mg/ml)
52 ml inaktiviertes FCS

Einfriermedium

95% FCS + 5% DMSO

Trypanblau-Stammlösung

2 mg in 100 ml 1xPBS

Acetat-Puffer

Lösung A: 1,14 ml 100%ige Essigsäure ad 100 ml H₂O
Lösung B: 5,44 g Natriumacetat (+ 3 H₂O) ad 200 ml H₂O
aus Lösung A 74 ml zu 176 ml aus Lösung B ad 1000 ml H₂O und auf pH
5 einstellen

AEC-Substanzgemisch

1 Tablette AEC in 2,5 ml DMF auflösen

47,5 ml Acetatpuffer dazugeben

25 µl 30% H₂O₂ dazugeben

2.5.2 Antikörper**Tabelle 1: Verwendete Primärantikörper**

Antigen	Antikörper	Isotyp	Konzentration	Quelle
CD3	UCHT1	m IgG1	Überstand	Peter Beverley, London
CD4	Mt310	m IgG1	10 µg/ml	Dako
CD4	MAX 16H5	m IgG1	10 µg/ml	Frank Emmrich, Leipzig
CD152 (CTLA-4)	BNI3 biotinyliert	m IgG2a	20 µg/ml	BNI

Legende: m: Maus; Dako: Dako, Glostrup, DK; BNI: Bernhard-Nocht-Institut, Hamburg;

MPI: Max-Planck-Institut, Erlangen

Verwendete Sekundärantikörper

Ziege anti Maus IgG1, FITC-konjugiert,
10 µg/ml

*Southern Biotechnology,
Birmingham, USA*

Verwendete Sekundärkonjugate

Streptavidin-TRITC,
5,6 µg/ml

Dianova, Hamburg

2.6 Melanomgewebe

Die untersuchten Melanomgewebe stammten aus der Abteilung für Hämatologie und Onkologie, Prof. Dr. med. A. Knuth, Krankenhaus Nordwest, Frankfurt am Main und wurden mir schockgefroren zugeschickt.

Tabelle 2: Klinische Parameter der untersuchten Melanompatienten

Nr.	Geburtsjahr	Geschlecht	Erstdiagnose	Histologie	Initiales Stadium (Clark)	Metastasier- Ung	Bemerkung (weitere Grunderkrankung)
1	1935	M	1994	SSM	Level 3	1/99	Urothel CA 6/99
2	n.b.	F	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	
3	n.b.	F	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	
4	n.b.	F	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	
5	1938	F	5/85	SSM	Level 3	1989	
6	1949	F	3/98	n.b.	n.b.	5/98	
7	1948	F	1985	n.b.	n.b.	10/97	
8	1944	M	12/91	amelanotisch	n.b.	11/95	
9	1927	F	1/98	nodulär, exulceriert	Level5	1/98	
10	1960	F	1984	nodulär	n.b.	10/92	
11	1945	M	7/90	n.b.	Level 3	3/98	
12	n.b.	M	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	
13	1941	M	7/98	nodulär	Level 4	2/99	M. Parkinson
14	n.b.	F	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	
15	1940	M	1994	nodulär	Level 5	11/98	

n.b. = nicht bekannt; SSM = superfiziell spreitendes Melanom

2.7 Hyperthermie-PBL

Die PBL der mit Ganzkörperhyperthermie behandelten Patienten wurden mir ebenfalls aus der Abteilung für Hämatologie und Onkologie, Prof. Knuth, aus Frankfurt eingefroren geschickt. Das Blut wurde den Patienten kurz vor und an mehreren Tagen nach Hyperthermiebehandlung entnommen.

Die Ganzkörperhyperthermiebehandlung wurde in Frankfurt wie folgt vorgenommen:

Die Patienten wurden mit Thiopental, Lidocain, Midazolam und Fentanyl sediert und analgisiert und anschließend in eine spezielle Wärmeröhre zur Ganzkörperhyperthermiebehandlung gefahren. Unter ständiger Herz-, Kreislauf- und Atemkontrolle sowie nasaler Sauerstoffzufuhr von 2-6 l/min begann die 1-1,5stündige Aufwärmphase von Körpertemperatur auf eine Körperkerntemperatur von 41,8°C. Diese wurde ständig mittels Temperaturmesssonden in Rektum, Ösophagus und peripher an der Haut kontrolliert. In der Aufwärmphase erhielten die Patienten das Zytostatikum Ifosfamid (5000 mg/m² i.v.). Während der anschließenden einstündigen Plateauphase, in der die Zieltemperatur von 41,8°C konstant gehalten wurde, erhielten die Patienten die Zytostatika Carboplatin (300 mg/m² i.v. über 30 min) und Etoposid (100 mg/m² i.v. über 30 min). Etoposid wurde auch an den Tagen 2 und 3 nach Behandlung verabreicht. An die Plateauphase schloss sich die einstündige Abkühlphase an. Die Kontrolle der Herz- und Kreislauffunktionen wurde noch 24 Stunden posttherapeutisch fortgesetzt.

Da durch die Hyperthermiebehandlung auch die Leukozyten in Mitleidenschaft gezogen wurden, erhielten die Patienten ab Tag 5 nach Behandlung G-CSF (Granulozyten-Kolonie-stimulierender Faktor) s.c. (480µg/d), solange bis die Leukozytenzahl im peripheren Blut $10 \times 10^3/\mu\text{l}$ betrug.

Eine weitere Hyperthermiebehandlung erfuhren die Patienten, wenn bis Tag 35 nach der letzten Anwendung eine merkliche Stabilisierung der Tumorerkrankung eingetreten war (Objektivierung durch entsprechendes Staging).

II. Methoden

2.8 Zellbiologische Methoden

2.8.1 Auftauen und Einfrieren eukaryontischer Zellen

(Kryokonservierung)

Eukaryontische Zellen können in flüssigem Stickstoff (-196°C) sehr lange gelagert und nach dem Auftauen wieder in Kultur genommen werden. Da die Bildung von Eiskristallen die Zellen schädigen würde, wird dies durch Zugabe

von DMSO (Dimethylsulfoxid) verhindert. Ca. 1×10^7 wurden in 1 ml kalten Einfriermedium resuspendiert, in Kryoröhrchen überführt und auf -70°C gekühlt, bevor sie nach 24 Stunden in flüssigem Stickstoff eingelagert wurden.

Nach dem schnellen Auftauen bei 37°C wurden die Zellen langsam, mit mindestens auf Raumtemperatur erwärmten R 10F, langsam verdünnt. Die Zellen wurden anschließend dreimal gewaschen, da das DMSO für Zellen toxisch ist.

2.8.2 Zellzählung

Zum Bestimmen der Zellkonzentration wurden die Zellen in einer Neubauer Zählkammer ausgezählt. Die Lebendzellzahl wurde durch den Trypanausschlusstest bestimmt. Lebende Zellen sind in der Lage, Farbstoffe wie Trypanblau aktiv aus dem Zellinneren auszuschließen, während tote Zellen eingefärbt werden. Ein Aliquot Zellsuspension wurde mit dem gleichen Volumen Trypanblaulösung gemischt und die Zellen ausgezählt. Gezählt wurden nur die nicht gefärbten Zellen in vier Großquadraten, die durch in die Zählkammer eingravierte Linien bestimmt sind. Das Volumen eines Großquadrates beträgt $0,1 \text{ mm}^3 (=10^{-4} \text{ ml})$. Daher ergibt sich die Zellzahl pro Milliliter durch Multiplikation des Durchschnittwertes der vier Großquadrate mit dem Verdünnungsfaktor und 10^4 .

2.8.3 Isolierung von peripheren Blutlymphozyten (PBL)

Periphere Blutlymphozyten wurden aus so genannten „buffy coats“ (Erythrozyten-depletierten, separierten Blutkonserven (50 ml) mit einem hohen Leukozytenanteil) durch Dichtezentrifugation gewonnen. Das heparinisierte Blut wurde 1:2 mit 1xPBS verdünnt. 20 ml Ficoll wurden in einem 50 ml Falconröhrchen vorgelegt und vorsichtig mit 20 ml Blut-/PBS-Gemisch überschichtet. Nach 20 min Zentrifugation (750 g Megafuge 1.0, Heraeus) ohne eingeschaltete Bremse waren die Lymphozyten in der Interphase zwischen Ficoll und Medium angereichert, während sich die Erythrozyten und Granulozyten am Boden des Röhrchens befanden. Der Interphasering mit den Lymphozyten wurde mit einer Pasteurpipette entnommen, und die Zellen wurden dreimal mit PBS gewaschen. Nach dem letzten Waschschrift wurden die PBL in R 10F aufgenommen und ausgezählt.

2.8.3.1 Isolierung von T-Zellen

Die aus dem *buffy coat* isolierten PBL enthalten neben T-Lymphozyten auch B-Lymphozyten, Makrophagen und NK-Zellen. Um (fast) reine T-Zellen zu erhalten, ist zuerst die Tatsache von Nutzen, dass Makrophagen und ein kleiner Teil der B-Zellen, leicht an Plastik adhären. Jeweils 5×10^7 PBL wurden in einem Volumen von 10 ml in eine große Zellkulturflasche gegeben und für 1,5-2 Stunden bei 37°C in den Brutschrank gestellt. Anschließend wurden alle nicht-adhären Zellen entnommen und die Kulturflasche mit 5 ml Medium nachgespült. Danach wurden die T-Zellen durch Rosettierung mit Schaferythrozyten von den B-Zellen getrennt.

Schaferythrozyten (*sheep red cell* = SRC) können, indem sie an die CD2-Moleküle von T-Zellen und auch NK-Zellen binden, diese so rosettieren. Wegen dieser Tatsache können die T-Zellen von den restlichen PBL abgetrennt werden. Die sterilen SRC wurden mit 1xPBS gewaschen (750 g, 10 min, Megafuge 1.0), bis der Überstand klar und nicht mehr hämolytisch war. Von den gepackten SRC wurden 300 µl mit 4,6 ml RPMI 1640 und 100 µl Neuraminidase für 30 min bei 37°C inkubiert. Die Neuraminidase entfernt Neuraminsäure von der Oberfläche der SRC, die sonst zu unspezifischen Bindungen führen könnte. Die 6%ige SRC-Lösung ist für ca. 4 Wochen bei 4°C haltbar. Unmittelbar vor der Verwendung wurden die SRC noch einmal mit Medium gewaschen. Je 5×10^7 PBL wurden mit 2,5 ml der 6%igen SRC-Lösung in ein 50 ml Falconröhrchen gegeben und für 10 min bei 110 g zentrifugiert. Die Rosettierung erfolgte für eine Stunde auf Eis oder über Nacht im Kühlschrank. Über eine Ficoll-dichtezentrifugation (s. 2.7.3.1) bei 4°C wurden die rosettierten T-Zellen von den anderen Zellen, z.B. B-Zellen und Monozyten (APC) getrennt. Die Nicht-T-Zellen (E^-) befanden sich im Interphasenring über dem Ficollgradienten, die rosettierten T-Zellen (E^+) im Pellet. Der Interphasenring wurde nun abpipettiert, dreimal in Medium gewaschen und anschließend in R 10F aufgenommen und ausgezählt.

Um die T-Zellen aus dem Pellet weiter zu reinigen, musste erst noch der restliche Überstand entfernt und dann die SRC mit 1 ml destilliertem Wasser lysiert werden. Nach wenigen Sekunden wurden 10 ml Medium zugesetzt, um eine Lyse der T-Zellen zu verhindern. Die Zellen wurden zweimal mit Medium gewaschen, anschließend in R 10F aufgenommen und ausgezählt.

2.8.4 Messung der Zellproliferation durch den Einbau von radioaktivem Thymidin

Das Prinzip dieser Messung beruht darauf, dass eine proliferierende Zelle neue DNA synthetisieren muss. Man stellt der Zelle mit dem radioaktiven Thymidin (^3H -Thymidin) einen Baustein der DNA als radioaktiv markierte Substanz zur Verfügung. Der Einbau des ^3H -Thymidins lässt sich messen, und man bekommt einen relativen Wert für die Proliferation der untersuchten Zellen. Je höher die gemessene Radioaktivität, umso höher ist die Thymidineinbaurrate und damit die Proliferation der Zellen.

Mittels dieser Technik sollte die Hypothese geprüft werden, ob Hyperthermie (Ganzkörpererhitzung auf $41,8^\circ\text{C}$) allein genügt, eine Stimulation des Immunsystems zu bewirken.

Protokoll der Durchführung:

Die E^- -Zellen, die bei der Aufbereitung der PBL durch Rosettierung isoliert wurden, werden jetzt, in wenigen ml R 10F suspendiert, in der γ -Strahlenquelle für 10 min bestrahlt, anschließend noch einmal in Medium gewaschen, erneut ausgezählt und in verschiedenen Konzentrationen von bis zu 5×10^4 Zellen pro 100 μl R 10F in zwei Mikrotiter-Rundbodenplatten mit 96 Vertiefungen pipettiert und dann mindestens zwei Stunden bei 37°C stengelassen. Nach Ablauf dieser Zeit wurde eine Platte jeweils mit den Stimulatoren PHA ($2 \mu\text{g}/\text{ml}$), PPD ($10 \mu\text{g}/\text{ml}$), Pf ($0,01\%$ ig) sowie pro Vertiefung mit bis zu 5×10^4 E^+ -Zellen in R 10F bis zu einer Füllmenge von 200 μl aufgefüllt. Die E^+ -Zellen stammten ebenfalls aus dem Pellet der oben beschriebenen Rosettierung. Als Negativkontrolle dienten Vertiefungen (Wells) ohne Stimulatorzusatz. Jetzt wurde die Platte für vorerst fünf Tage bei 37°C inkubiert.

Für die zweite Platte wurde ganz genauso verfahren, nur dass vor Zugabe der Stimulatoren und E^+ -Zellen die Platte noch für eine Stunde bei $41,8^\circ\text{C}$ inkubiert wurde, um eine Hyperthermie zu imitieren. Nach den fünf Tagen wurde pro Well ein Zusatz von $20 \mu\text{Ci}$ ^3H -Thymidin hinzupipettiert und die Platte für weitere 18 Stunden inkubiert.

Nach Ablauf dieser Frist wurden die Zellen mit einem Zellerntegerät geerntet, wobei die Zellen mit destilliertem Wasser lysiert und durch einen Glasfaserfilter

gesaugt wurden. Die DNA wurde in dem Filter zurückgehalten. Der Filter wurde in einer Mikrowelle getrocknet und danach in eine Plastikhülle geschweißt. Da es nicht möglich ist, β -Strahlung direkt zu messen, wurde der Filter mit einer Szintillationsflüssigkeit getränkt, die die β -Strahlung in Lichtblitze umwandelte und es ermöglichte, die Radioaktivität dann in einem β -Counter zu bestimmen. Die Radioaktivität wurde in Zerfällen pro Minute (*counts per minute*) angegeben.

2.9 Zytozentrifugation

Die Zytozentrifugation ist eine Methode, um eine Zellsuspension in bestimmter Konzentration auf einen Objektträger zu bringen, ohne dass sich Salzkristalle bilden. Die Zellen werden hierbei auf den Objektträger zentrifugiert, und das Medium, in dem die Zellen aufgenommen sind, wird durch ein Filterpapier, das sich zwischen Probenkammer und Objektträger befindet, aufgesogen. Die Zellsuspension muss auf eine Konzentration zwischen 5×10^4 und 1×10^5 Zellen pro ml Medium eingestellt werden. In jede Probenkammer werden 200 μ l Zellsuspension gegeben, so dass auf dem Objektträger ca. 20.000 Zellen liegen (auf einer Fläche von 20 mm²). Nun kann die Zytozentrifuge Cytospin 3 für fünf Minuten bei 132 g zentrifugieren. Anschließend werden die Objektträger mit den Zellen für 24 h an der Luft getrocknet, für 10 min in Aceton fixiert und wieder für 24 h getrocknet. Die sogenannten Cytospins können jetzt bis zur weiteren Verwendung bei -70°C eingefroren werden.

2.10 Melanome und deren Aufbereitung

2.10.1 Aufbereitung der Melanome

Die mir aus Frankfurt zugeschickten schockgefrorenen Präparate taute ich in physiologischer Kochsalzlösung an, trocknete sie oberflächlich auf Fließpapier und deckte sie in Kryotubes mit Einbettmedium ein.

Jetzt gab ich die Kryotubes für fünf Minuten in flüssigen Stickstoff, um die Präparate schockzugefrieren. Bis zur weiteren Verwendung lagerte ich sie bei -70°C .

2.10.2 Kryostatschnitte

Die eingefrorenen Melanompräparate wurden bei -25°C bis -30°C im Kryostaten geschnitten. Die $5\ \mu\text{m}$ starken Schnitte wurden auf beschichtete Objektträger aufgenommen und über Nacht getrocknet. Nach Fixation in eisgekühltem Aceton für 10 min trockneten die Objektträger für weitere 24 h, bis sie direkt benutzt werden konnten oder bei -70°C gelagert wurden.

2.10.3 Beschichtung der Objektträger

Die staubfreien Objektträger werden für 10 sec in ein Gemisch aus 5 ml Silan und 245 ml Aceton eingetaucht und dreimal in deionisiertem Wasser gewaschen. Die so beschichteten Objektträger trocknen über Nacht und werden zur weiteren Verwendung staubfrei gelagert.

2.11 Immunhistochemische Färbemethode

2.11.1 Indirekte immunhistologische Doppelfärbung

Prinzip:

Die immunhistologische Doppelfärbung wurde in dieser Arbeit benutzt, um CTLA-4 und ein weiteres Epitop darzustellen. Hierbei war es entscheidend, auch die schwache Expression von CTLA-4 sichtbar zu machen. Wir arbeiteten daher mit einem Verstärkungssystem (*Tyramid Signal Amplification*). Hierbei wurde an den biotinylierten CTLA-4-Antikörper Streptavidin-Peroxidase gebunden, das dann mit Biotinyltyramid inkubiert wurde. Durch die Peroxidaseaktivität wurde Biotin aktiviert und ging kovalente Bindungen ein. Das Ergebnis war eine Häufung von Biotinresten in der unmittelbaren Umgebung von CTLA-4. Diese wurde mit Streptavidin-TRITC im letzten Schritt der Färbung sichtbar gemacht. Bei der Doppelfärbung wurde als Primärantikörper eine Kombination aus BNI3

(biotinyliert) und einem monoklonalen Antikörper einer anderen Subklasse benutzt. Der biotinylierte CTLA-4-Antikörper wurde nach Verstärkung (s.o.) durch Streptavidin-TRITC, die unmarkierten Antikörper durch ein subklassenspezifisches FITC-markiertes polyklonales Sekundärreagenz (Ziege-anti-Maus-IgG1-FITC) sichtbar gemacht.

Verfahren:

Die fixierten Präparate bzw. die Cytospins werden auf dem Objektträger mit einem Wachsstift umfahren. Alle weiteren Inkubationsschritte werden in einer feuchten Kammer bei Raumtemperatur durchgeführt, um ein Austrocknen zu verhindern. Für 10 min wird das zu färbende Objekt (Präparat oder Zellen) mit 20 µl Cohn II inkubiert, um unspezifische Bindungen an Fc-Rezeptoren von Monozyten und Makrophagen während der weiteren Schritte zu verhindern. Danach werden 50 µl Erstantikörpergemisch in PBS mit 10% humanem Serum für 1,5 Stunden oder alternativ über Nacht bei 4°C auf das Objekt gegeben. Nach zweimaligem fünfminütigen Waschen in PBS werden die Objekte für 10 min in 4% Paraformaldehyd nachfixiert und anschließend wieder gründlich in PBS gewaschen. Um die zelleigene Peroxidase auszuschalten werden die Objekte nun mit 50 µl 3% H₂O₂ inkubiert, danach wieder mit PBS gewaschen. Darauf folgt eine 30minütige Inkubation mit 50 µl Streptavidin-Peroxidase (1:200 in PBS), zweimaliges fünfminütiges Waschen in PBS, vier Minuten Inkubation mit 50 µl Biotinyltyramid (1:150 in amplification diluent) und erneutes Waschen in PBS. Im letzten Schritt werden die Objekte mit einer Kombination aus Streptavidin-TRITC (1:200 in PBS) und anti-Maus-IgG1-FITC (1:100 in PBS) für eine Stunde inkubiert, anschließend ein letztes Mal in PBS gewaschen, bevor sie mit ca. 20 µl *anti-fade solution* eingedeckt werden können., welches ein zu schnelles Ausbleichen der Fluoreszenzfarbstoffe verhindern soll.

Die Auswertung der Objekte findet am Fluoreszenzmikroskop statt. Mit zwei verschiedenen Filtern lassen sich die beiden Fluoreszenzfarbstoffe getrennt anregen (FITC: Anregungsfilter 450-490 nm, Sperrfilter 515-565 nm; TRITC: Anregungsfilter 546 nm, Sperrfilter 590 nm).

2.11.2 Anfertigen von Dauerpräparaten

Da die fluoreszenzgefärbten Präparate lediglich nur kurze Zeit anregbar sind, bietet es sich an, um auch noch nach längerer Zeit die Färbeergebnisse zu sehen, Dauerpräparate anzufertigen. Die Intensität der Dauerfärbung ist, verglichen mit der der Fluoreszenzfärbung, jedoch wesentlich geringer, so dass das Dauerpräparat eher als Dokumentationsobjekt zu sehen ist.

Die Dauerpräparatfärbung ist in den Schritten bis einschließlich der Inkubation mit Streptavidin-Peroxidase und dem anschließenden Waschen in PBS mit der Immunhistochemie identisch. Lediglich weggelassen wird der IgG1-Typ-Primärantikörper, da sich mit der Dauerfärbung nur ein Epitop darstellen lässt. An das Waschen schließt sich jetzt die Inkubation mit 100 µl AEC-Substanzgemisch an. Diese erfolgt unter Beobachtung am Durchlichtmikroskop für ca. 5 min. Gestoppt wird die Reaktion durch fünfminütiges Waschen der Objektträger in deionisiertem Wasser. Danach folgt eine einminütige Gegenfärbung der Kerne mit Hämatoxylin. Nach dieser Färbezeit werden die Objektträger für 5-10 min unter fließend kaltem Wasser gespült, um anschließend mit 60°C heißer Kaiser's Gelatine eingedeckt zu werden. Die Auswertung erfolgt unter dem Durchlichtmikroskop bei 20facher Vergrößerung.

2.12 Auswertung und Dokumentation

2.12.1 Auswertung der immunhistologischen Präparate

Die Betrachtung der Fluoreszenzpräparate erfolgt mit dem Axioskop 20. Dabei wird jedes Präparat einzeln ausgezählt und mindestens vier Gesichtsfelder der Objektivraasterung mit ca. 200 Zellen betrachtet und ausgewertet. Dies erfolgt bei einer 400fachen Vergrößerung.

Bei Immunfluoreszenzdoppelfärbungen werden bei der späteren Auswertung beispielsweise die CTLA-4-exprimierenden Zellen den CD3-positiven Zellen (T-Zellen) gegenüber in Relation gesetzt, teils auch CD4 (T-Helferzellen) gegen CTLA-4. Als Kontrolle werden Jurkat-CTLA-4-positive Zellen (Positivkontrolle, da diese Zellreihe zu etwa 90% CTLA-4 exprimiert) und als Normalkontrolle die PBLs eines Normalspenders gewählt.

2.12.2 Photographische Dokumentation

Auf dem Axioskop 20 ist eine Kleinbildkamera montiert, mit der die photographische Dokumentation erfolgt. Wegen der schwachen Lichtverhältnisse wird ein Kunstlichtfilm (Kodak, EPH 1600) verwendet, der um zwei Blendenstufen gepusht wird, um kurze Belichtungszeiten und ein Maximum an Schärfe zu gewährleisten. Die Durchlichtphotographien werden mit einem Kunstlichtfilm (Kodak, Ektachrome 64 T) aufgenommen.

Die Diapositive werden auf eine Foto-CD eingescannt, mit dem Programm Adobe Photoshop bearbeitet und beschriftet und mit einem Apple Color Style Writer 2500 Tintenstrahldrucker mit Farbpatrone ausgedruckt.

2.12.3 Photographische Auswertung mit Softwareunterstützung

Fluoreszenz-markierte Objektträger wurden an einem zweiten Fluoreszenzmikroskop ausgewertet, welches zusätzlich mit einem Computer verbunden war, so dass eine digitale Bildauswertung möglich war. Als Bildauswertungsprogramme wurden die Software-Programme OpenLab und Adobe Photoshop gewählt.

3 Ergebnisse

3.1 CTLA-4 Expression auf TIL im Melanomgewebe

Es sollte die Verteilung von CTLA-4 bei TIL von Melanomen untersucht werden. Dazu verwanden wir die Methode der immunhistochemischen Doppelfärbung von CTLA-4/CD3 bzw. CTLA-4/CD4 (Abb. 2). Insgesamt wurden 15 Melanome von 15 Patienten untersucht, die größtenteils eine hohe bis sehr hohe Infiltration mit TIL aufwiesen. Die Infiltration war entweder diffus (TIL gleichmäßig im Melanomgewebe verteilt) und/oder dicht (herdförmige Ansammlungen von TIL v.a. im Bereich der Bindegewebssepten [BG]). Die einzelnen Tumorgewebe ließen sich anhand ihrer Infiltrationsdichten mit TIL drei Gruppen einteilen:

- a) die Präparate mit einer massiven TIL-Infiltration (Melanome Nr. 1, 2, 3, 5, 6, 8, 10)
- b) die Präparate mit einer mäßiggradigen Infiltration (Melanome Nr. 11, 13, 14, 15)
- c) die Präparate mit einer geringen Infiltration (nur vereinzelt TIL sichtbar; Melanome Nr. 4, 7, 9)

Lediglich beim Präparat Nr. 12 fanden sich keine TIL.

Im Vergleich mit den geringen Frequenzen CTLA-4-positiver T-Zellen im peripheren Blut, die deutlich unter 5% lagen, war der Anteil CTLA-4-exprimierender CD3+ T-Zellen unter den TIL mit bis zu 30% sehr stark erhöht. Dabei zeigten sich große Unterschiede zwischen den einzelnen Tumoren (Tabelle 3). Wie Doppelfärbungen CTLA-4/CD4 zeigten, gehörte der Großteil der CTLA-4-positiven Zellen der Klasse der CD4-Zellen an. Der Anteil CTLA-4-positiver Zellen war mit der Infiltrationsdichte durch CD3-positiv TIL positiv korreliert: Bei Tumoren mit massiver TIL-Infiltration fand sich durchgängig eine CTLA-4-Expressionsrate von $\geq 20\%$ der T-Zellen, bei mäßiger TIL-Infiltration waren dies >5 bis $\leq 10\%$ und bei Tumoren, die nur mit wenigen TIL infiltriert waren, exprimierten weniger als 5% der T-Zellen CTLA-4 (Abb. 3a).

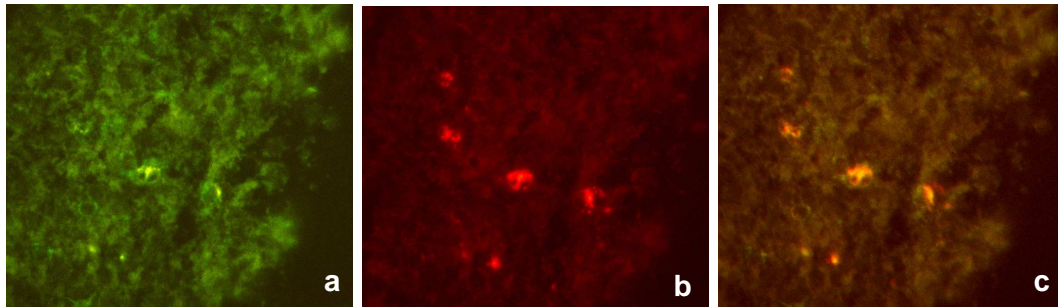


Abbildung 2:

Melanomgewebe mit Infiltration CD3-/CTLA-4-positiver Lymphozyten

(a) CD3 (FITC, grün), (b) CTLA-4 (TRITC, rot), (c) Doppelfärbung CD3/CTLA-4

Tabelle 3: Melanome und TIL-Verteilungsmuster mit CTLA-4-/CD3-Expression

Melanome	TIL-Verteilungsmuster	CTLA-4+ Zellen /CD3+ TIL (%)
Melanom 1	massive diffuse neben dichter Infiltration	20-30%
Melanom 2	massive diffuse neben dichter Infiltration	30%
Melanom 3	massive diffuse Infiltration	24%
Melanom 4	geringe dichte und keine diffuse Infiltration	5%
Melanom 5	massive dichte Infiltration	20%
Melanom 6	massive diffuse Infiltration	20%
Melanom 7	geringe diffuse Infiltration	2%
Melanom 8	massive diffuse neben dichter Infiltration	30%
Melanom 9	geringe diffuse neben dichter Infiltration	5%
Melanom 10	massive diffuse neben dichter Infiltration	30%
Melanom 11	mäßige diffuse neben dichter Infiltration	10%
Melanom 12	keine Infiltration	/
Melanom 13	mäßige dichte und keine diffuse Infiltration	5-10%
Melanom 14	mäßige dichte und keine diffuse Infiltration	5-10%
Melanom 15	mäßige dichte und keine diffuse Infiltration	10%

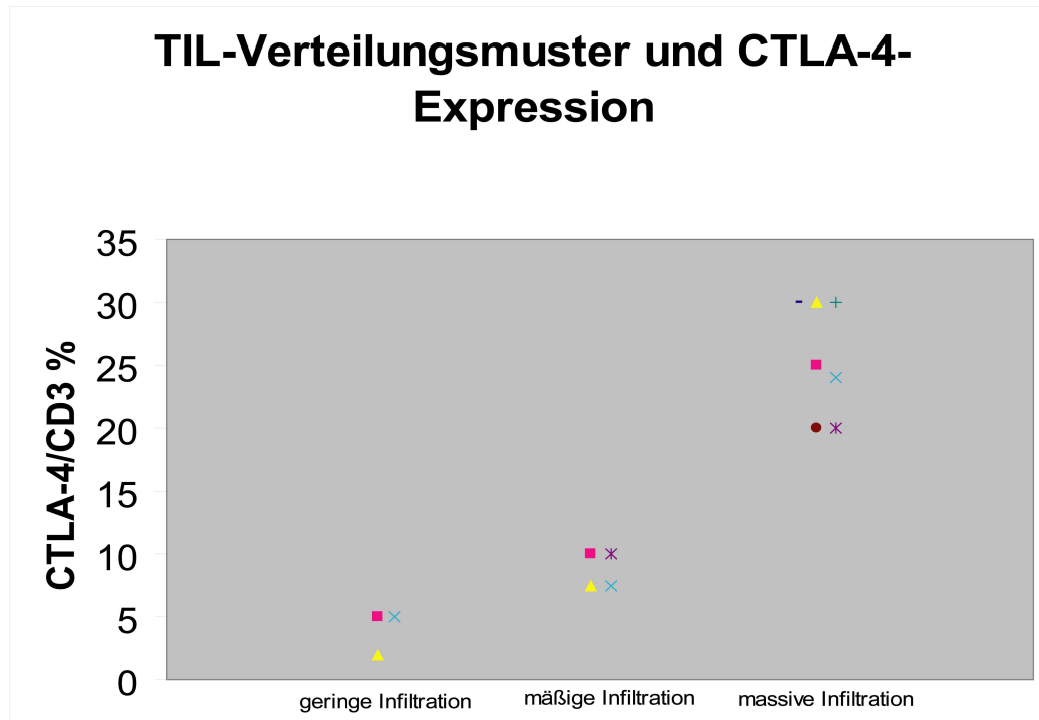


Abbildung 3a:

Mit ansteigendem TIL-Infiltrationsgrad kommt es zu einem Anstieg der CTLA-4-Expression der TIL (weitere Daten s. Anhang).

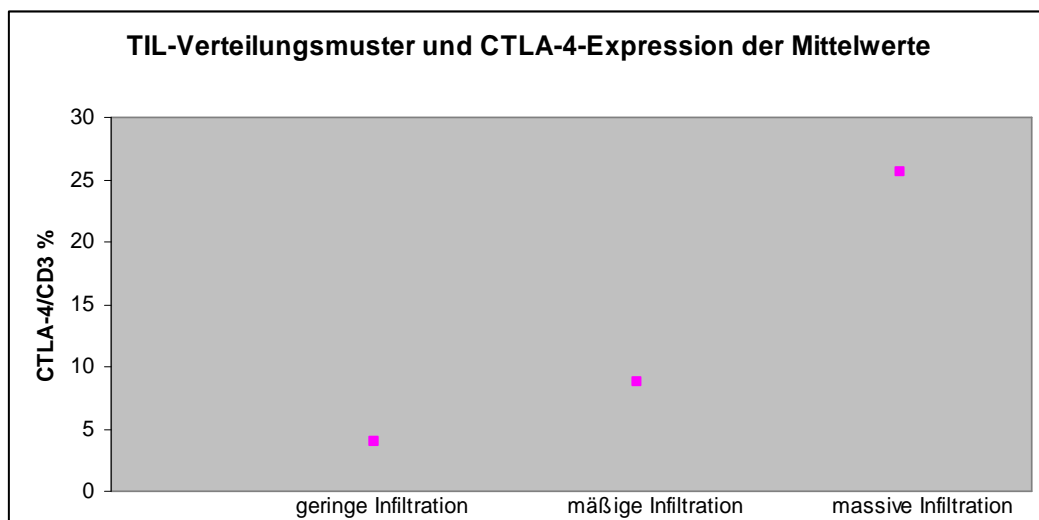


Abbildung 3b:

Der TIL-Infiltrationsgrad und die TIL-CTLA-4/CD3-Expression korrelieren positiv (Pearson-Korrelationskoeffizient 0,952).

Die mit 15 relativ geringe Anzahl von Präparaten lässt keine aussagekräftige statistische Auswertung der CTLA-4-Expression zu biographischen und klinischen Parametern zu. Es können lediglich Tendenzen konstatiert werden (genaue klinische Angaben s. Anhang).

Zu den Patienten der Präparate 2, 3, 4, 12 und 14 lagen leider keine weiteren klinischen Informationen vor, so dass diese nur bedingt ausgewertet werden können.

Die Geschlechterverteilung verhielt sich wie folgt:

8 weibliche und 6 männliche Patienten (einmal Geschlecht unbekannt). Die Primärmelanome (zum Zeitpunkt unserer Untersuchung bereits soweit bekannt allesamt metastasiert) waren histologisch zweimal superfiziell spreitende Maligne Melanome (SSM), viermal primär nodulär wachsende Maligne Melanome (NM) sowie ein amelanotisches Malignes Melanom (AMM). Ihr Breslow-Index (entspricht der Tumoreindringtiefe in mm) reichte von 1,0 bis 5,4 (Median 2,18 mm). Dies ist weit mehr als der Durchschnitt der in der Bevölkerung gefundenen Melanome (Median 0,98 mm [Kittler et al., 2001]).

Der Grad der Tumordinfiltration mit TIL sowie die CTLA-4-Expression korrelierten nicht mit den vorliegenden biographischen und klinischen Parametern wie Geschlecht, histologischer Primärmelanomtyp, Eindringtiefe, HLA-Typ und Zeitraum zum Auftreten der ersten Metastasierung (Details der Auswertung s. Anhang).

3.2 Auswirkungen einer Hyperthermiebehandlung auf die CTLA-4-Expression

Die PBLs der mit Hyperthermie behandelten Patienten wurden nach dem Protokoll der immunhistochemischen Doppelfärbung gefärbt (s. **2.11.1**). Pro Patient wurden die im Cytospin auf Objektträger aufgebrauchten PBLs von verschiedenen Tagen vor und nach der Hyperthermiebehandlung gefärbt. Bei der Doppelfärbung wurde CD3 (T-Zell-Marker; FITC-markiert) sowie CTLA-4 (TRITC-markiert) gefärbt. Es fiel auf, dass alle CTLA-4-positiven Zellen auch CD3-positiv waren. Zur besseren Klassifikation der CTLA-4-positiven Zellen wurden diese auch in einer Doppelfärbung gegen CD4 (Marker für T-Helfer-

Zellen) bzw. gegen CD8 (Marker für zytotoxische T-Zellen) gefärbt. Es kam heraus, dass sämtliche CTLA-4-positive Zellen zur Klasse der CD4-Zellen gehörten, also T-Helfer-Zellen waren.

10 Patienten (HAT 1-10) absolvierten eine Hyperthermiebehandlung nach o.g. Schema (s. 2.7). Während und bis maximal Tag 9 nach Behandlung wurden mehrfach Blutproben entnommen. Eine immunzytochemische Doppelfärbung von Zytozentrifugationspräparaten isolierter PBL (Abb. 4) ergab folgendes: Bis zum Tag 5 nach Behandlung blieb die CTLA-4-Expression auf den T-Zellen unverändert. Der Anteil CTLA-4-positiver T-Zellen war mit etwa 1% sehr gering. Zwischen Tag 5 zu Tag 6 hingegen kam es zu einem signifikanten Anstieg der Fraktion CTLA-4 exprimierender T-Zellen auf durchschnittlich 5,2%. Anschließend nahm die CTLA-4 Expression der T-Zellen wieder ab (Abb. 5; weitere Ergebnisse im Anhang).

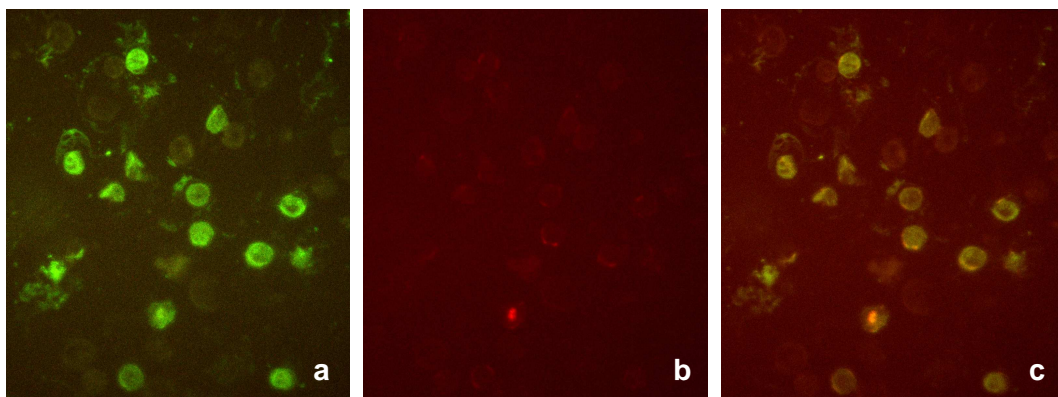


Abbildung 4

CTLA-4/CD3-Anfärbung von PBL Hyperthermie-behandelter Patienten

(a) CD3 (FITC, grün), (b) CTLA-4 (TRITC, rot), (c) Doppelfärbung CD3/CTLA-4

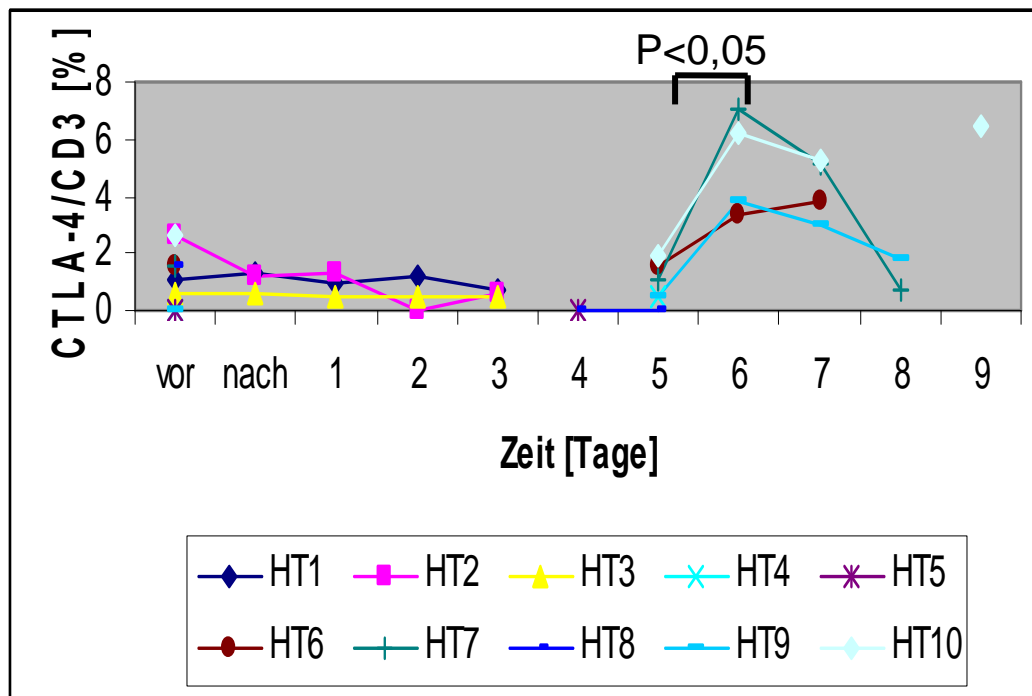


Abbildung 5

Verlauf der CTLA-4-Expression der CD3-positiven PBL vor und bis 9 Tage nach Hyperthermiebehandlung

Für die Untersuchungen der CTLA-4-Expressionen bei Patienten nach wiederholter Hyperthermiebehandlung, lagen leider nur Proben bis maximal drei Tage nach der Behandlung vor (Abb. 6). Die CTLA-4-Expressionswerte lagen hier auf einem deutlich höheren Niveau als bei den Proben der ersten Behandlung von Tag 1-3). So beträgt der Mittelwert der CTLA-4-Expressionswerte bei Proben der ersten Hyperthermiebehandlung $\leq 1,14\%$ (Standardabweichung von maximal 0,99). Die Mittelwerte für eben diesen Zeitraum liegen bei den Proben der zweiten bzw. dritten Behandlung zwischen 1,84 und 3,86% (Standardabweichung von 1,51 bis 3,46). Im Verlauf der CTLA-4-Expressionswerte der wiederholten Hyperthermien zeigen sich jedoch keine signifikanten Unterschiede ($p > 0,05$) oder Tendenzen.

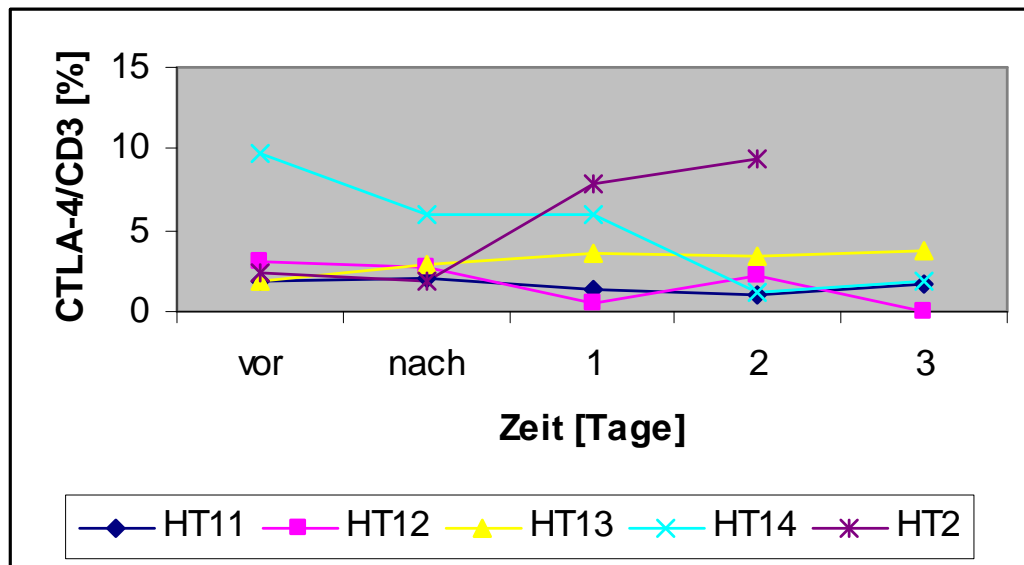


Abbildung 6

Verlauf der CTLA-4-Expression der CD3-positiven PBL vor und bis 3 Tage nach Hyperthermiebehandlung bei Patienten mit bereits mehrfacher Hyperthermie

3.3 Hyperthermie-Proliferationstests

Aus der Literatur war bekannt, dass CTLA-4 nach Aktivierung von CD4-positiven Zellen verstärkt exprimiert wird, so dass es trotz seiner inhibitorischen Funktion als Aktivierungsmarker gelten kann. Nach Hyperthermiebehandlung kommt es an Tag 6 post-Hyperthermie zu einem signifikanten Anstieg der CTLA-4-Expression (s. 3.2). Dies deutet also auf eine Aktivierung der T-Zellen hin. Um herauszufinden, ob Hyperthermie zu einer Steigerung der Antigenpräsentation und damit zu einer verstärkten T-Zellstimulation führt, wurden T-Zellen aus dem peripheren Blut gesunder Spender isoliert (siehe 2.8.3) und mit antigenpräsentierenden Zellen verschiedener Konzentrationen stimuliert (siehe 2.8.4). Dabei wurden das T-Zellmitogen PHA (Phytohämagglutinin) oder die Antigene PPD (Tuberkulin-Antigen) bzw. ein antigener Extrakt aus *Plasmodium falciparum* (Pf) eingesetzt. Nach der Inkubation mit Mitogen oder Antigen wurden einige APC-Kulturen einer Hyperthermie ausgesetzt, bevor die T-Zellen hinzugefügt wurden. Die Stimulation und Proliferation(smessung) wurde dann, wie in 2.8.4 beschrieben, durchgeführt. Dabei wurde jeweils eine Platte regulär über fünf Tage bei 37°C inkubiert und diente als Kontrollplatte (Ansatz 1). Die

APC der zweiten Platte wurden vorher noch für eine Stunde bei 41,8°C inkubiert, um die Hyperthermie zu simulieren (Ansatz 2). Die Versuche wurden zweimal durchgeführt (Versuchsreihe 1 und 2).

Antigenpräsentierende Zellen mit PHA oder dem Extrakt aus *Plasmodium falciparum* bzw. PHA (in einem der beiden Experimente) stimulierten die T-Zellen zur Proliferation. Eine vorangehende Erwärmung auf Hyperthermie-temperaturen steigerte die aktivierende Wirkung nicht, eher war teilweise sogar eine Inhibition der Proliferation zu beobachten (Abb. 7-14). Lediglich unter PHA-Zusatz war im ersten Versuch unter Hyperthermie eine Proliferationssteigerung im Vergleich zur Nicht-Hyperthermiebehandlung zu erkennen (Abb. 10), jedoch keine Reproduzierbarkeit beim zweiten Versuch (Abb. 14).

Im Folgenden finden sich die graphischen Auswertungen der ersten Versuchsreihe:

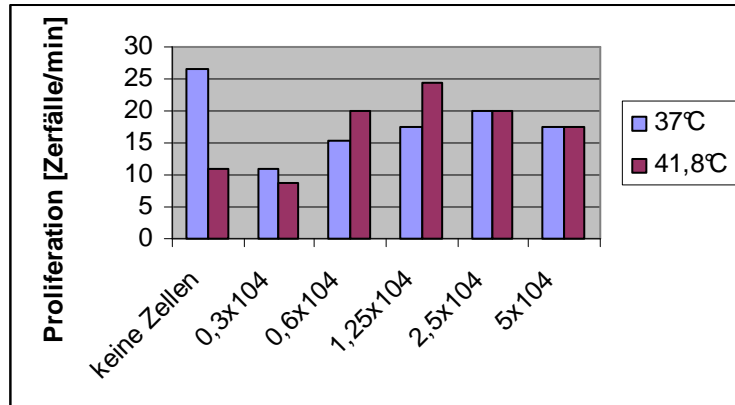


Abbildung 7: Versuch 1 ohne Zusatz

Ansatz 1 (blau): 37°C Inkubationstemperatur (Proliferationsmessung in [Zerfälle/min])

Ansatz 2 (violett): mit einstündiger Vor-Inkubation bei 41,8°C, anschließend 37°C Inkubationstemperatur (Proliferationsmessung in [Zerfälle/min])

Die Angabe der ansteigenden Zellzahlen der x-Achse bezieht sich auf die APC (E').

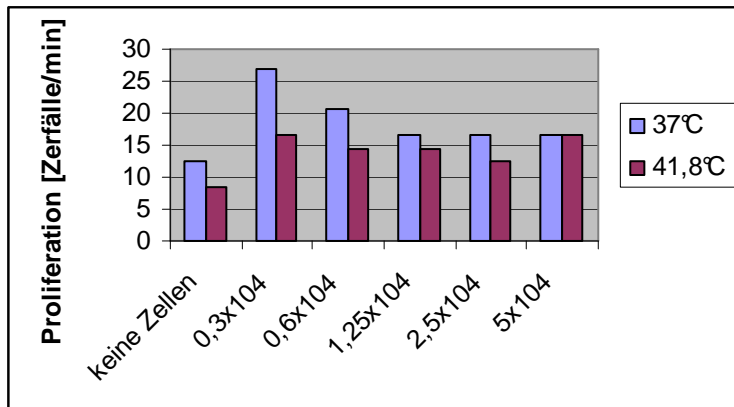


Abbildung 8: Versuch 1 mit PPD-Zusatz

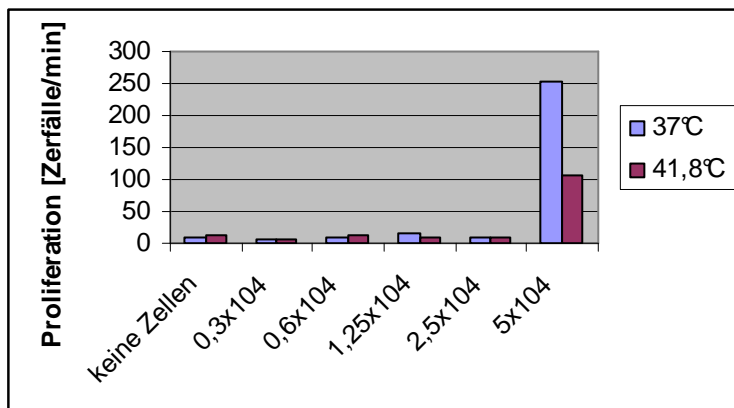


Abbildung 9: Versuch 1 mit Pf-Zusatz

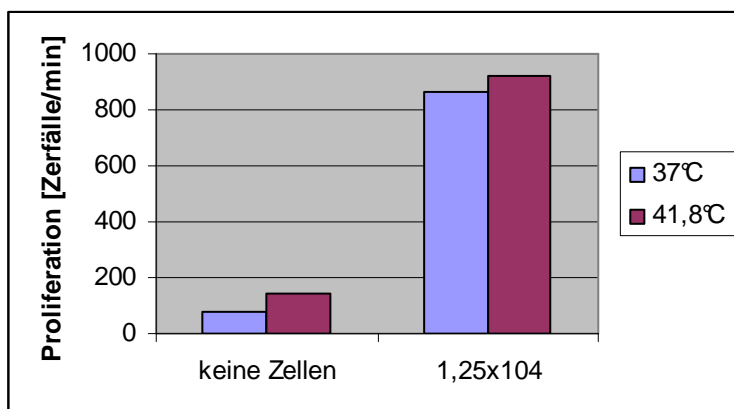


Abbildung 10: Versuch 1 mit PHA-Zusatz

Im Folgenden finden sich die graphischen Auswertungen der zweiten Versuchsreihe:

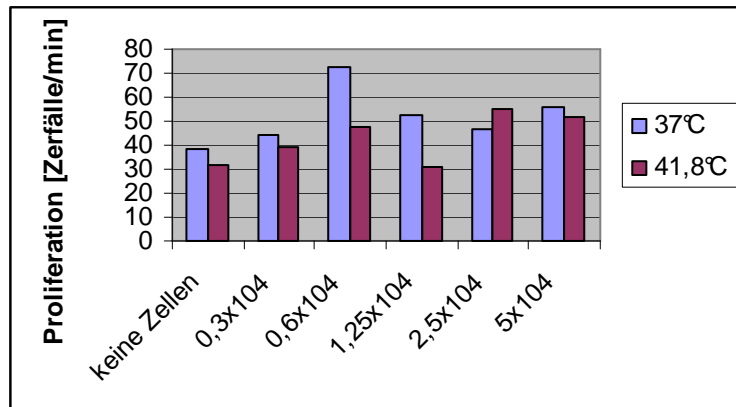


Abbildung 11: Versuch 2 ohne Zusatz

Ansatz 1 (blau): 37°C Inkubationstemperatur (Proliferationsmessung in [Zerfälle/min])

Ansatz 2 (violett): mit einstündiger Vor-Inkubation bei 41,8°C, anschließend 37°C Inkubationstemperatur (Proliferationsmessung in [Zerfälle/min])

Die Angabe der ansteigenden Zellzahlen der x-Achse bezieht sich auf die APC (E⁻).

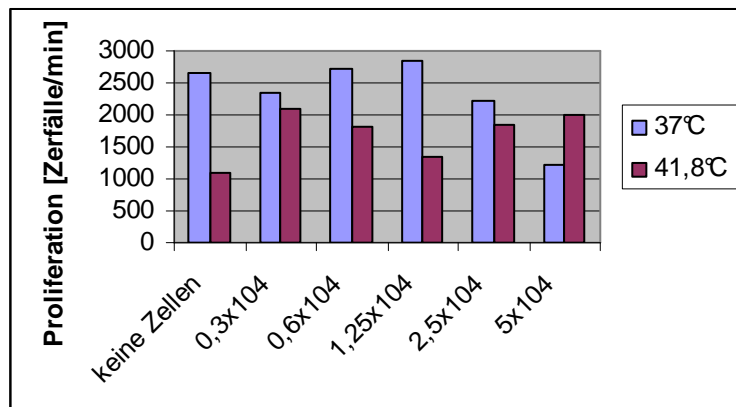


Abbildung 12: Versuch 2 mit PPD-Zusatz

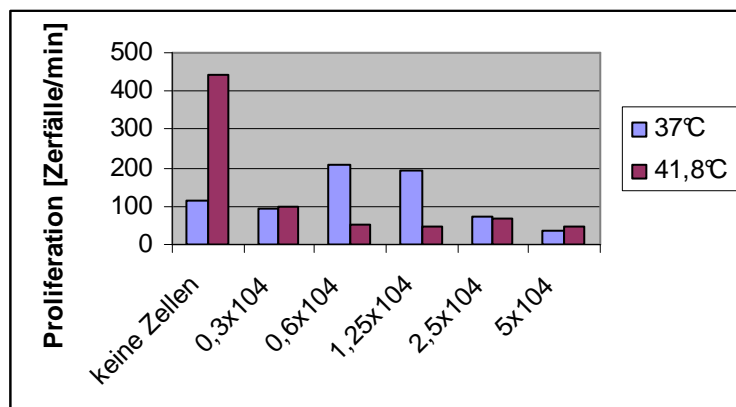


Abbildung 13: Versuch 2 mit Pf-Zusatz

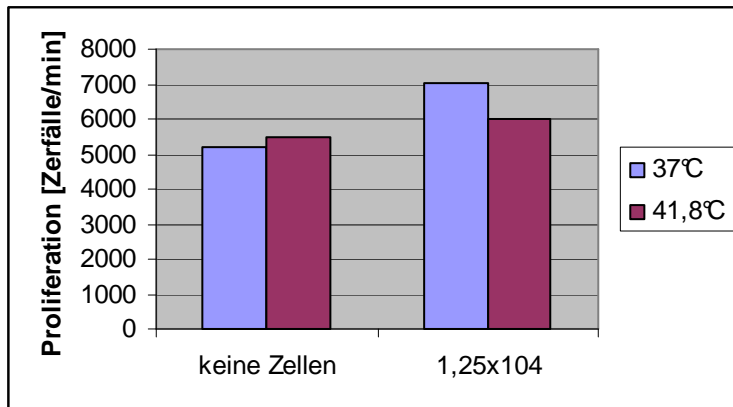


Abbildung 14: Versuch 2 mit PHA-Zusatz

3.4 Entwicklung eines Verfahrens zur automatischen Quantifikation CTLA-4-positiver Zellen

Die bislang gewählte sehr subjektive Auszähltechnik CTLA-4-positiver Zellen sollte automatisiert und objektiviert werden. Dies sollte mittels eines computergestützten Verfahrens erfolgen. Wir wählten hierzu das Programm Adobe Photoshop, das die Anzahl fluoreszierender Objekte und ihre Fluoreszenzintensität angeben kann.

3.4.1 Vorarbeiten

Zunächst wurde das Verfahren der Fluoreszenzintensitätsmessung mithilfe von fluoreszierenden Kalibrierungsbeads getestet. Die Beads waren größenhomogen und enthielten verschiedene Mengen eines Fluoreszenzfarbstoffs. Die Mengenverhältnisse waren bekannt und variierten um einen Faktor von bis zu 300. Jede Messung wurde dreimal wiederholt (ausführliche Daten s. Anhang). Die Mittelwerte der gemessenen Fluoreszenzintensitäten verhalten sich proportional zur Menge des inkorporierten Fluoreszenzfarbstoffs (Abb. 15 und 16). Dies gilt gleichermaßen für die beiden getesteten Kalibrationsfarbstoffe *InSpeck Green* und *InSpeck Red*. Prinzipiell erscheint diese Methode also für die Quantifizierung der Fluoreszenz-markierter Zellen auf einem Objektträger geeignet zu sein.

Graph InSpeck Kalibrationsfarbstoff Green

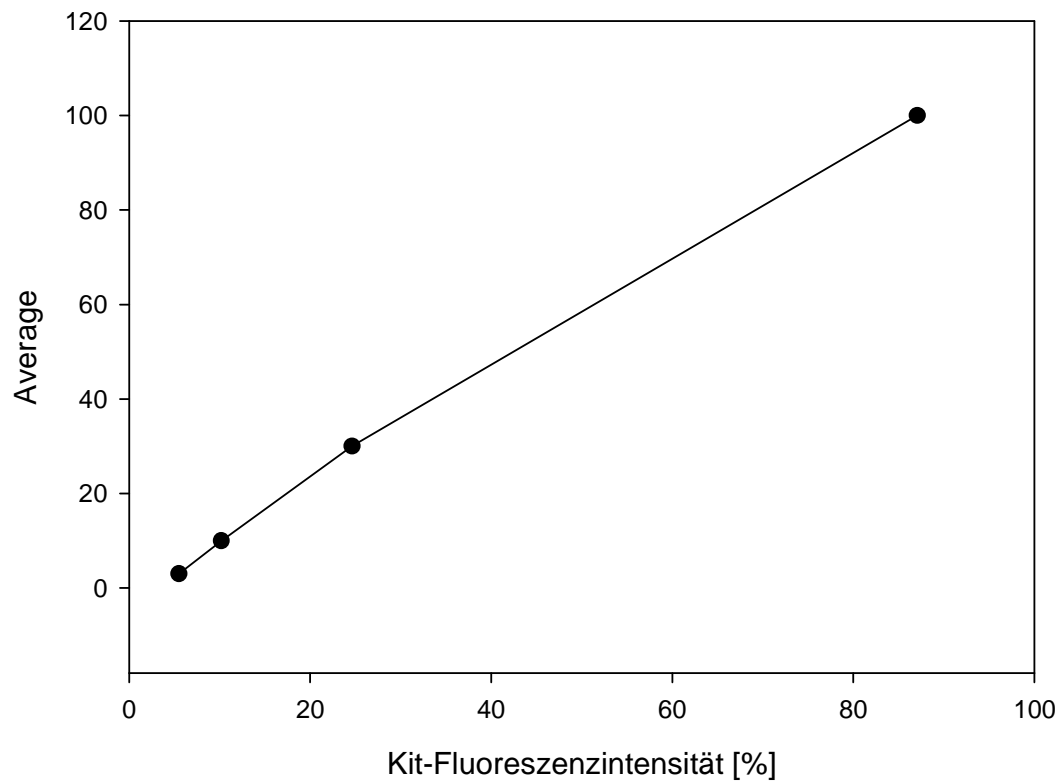


Abbildung 15: Berechnung der Fluoreszenzintensität verschiedener Konzentrationen des Kalibrationsfarbstoffs Green

Die Konzentration des grünen Fluoreszenzfarbstoffs (Extinktionswellenlänge 505, Emissionswellenlänge 515, entspricht FITC) ist proportional zur gemessenen Fluoreszenzintensität.

In der Graphik ist leicht zu erkennen, dass sich das Bild einer Geraden ergibt. Es handelt sich also nahezu um eine lineare Abhängigkeit des *Average*-Wertes von der Fluoreszenzintensität. Die errechnete Funktion der idealen Geraden vom 3% zum 100%-Wert lautet: $f(x) = 0,841x + 3,001$

Fluoreszenzen unterhalb einer Farbstoffkonzentration von 3% waren nicht messbar.

Für den Kalibrationsfarbstoff *InSpeck Red* ergibt sich unter gleichen Bedingungen eine ähnlicher Graph (ausführliche Daten s. Anhang):

Graphik InSpeck Kalibrationsfarbstoff Red

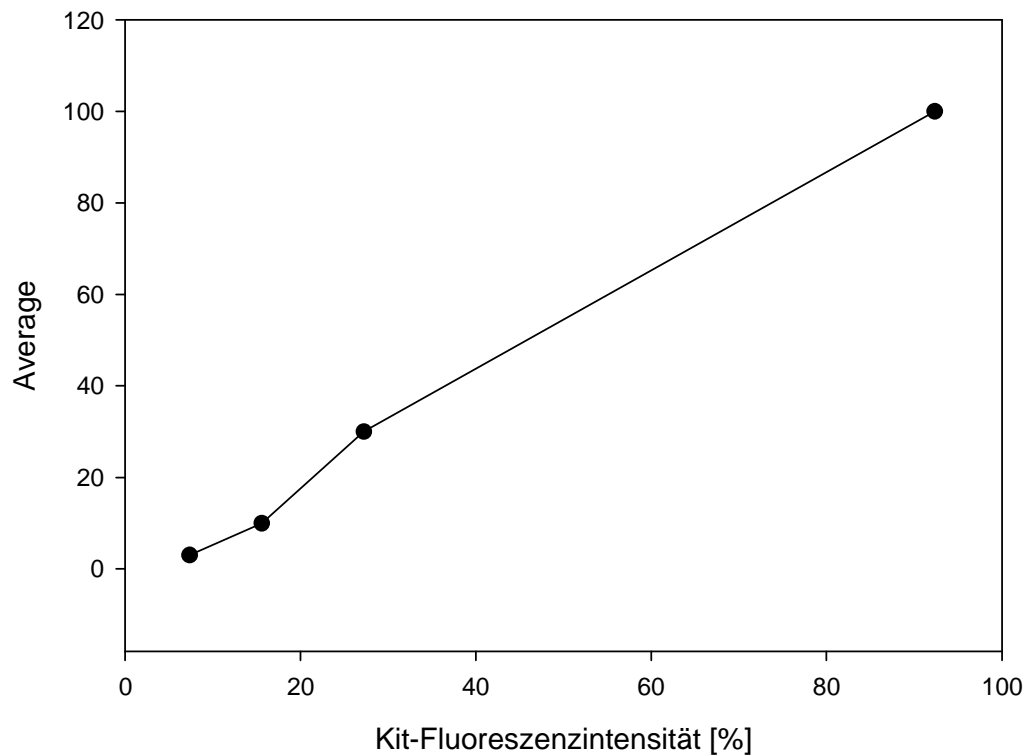


Abbildung 16: Berechnung der Fluoreszenzintensität verschiedener Konzentrationen des Kalibrationsfarbstoffs Red

Die Konzentration des roten Fluoreszenzfarbstoffs (Extinktionswellenlänge 580, Emissionswellenlänge 605, entspricht TRITC) ist proportional zur gemessenen Fluoreszenzintensität.

In der Graphik ergibt sich das Bild einer Geraden mit einer linearen Abhängigkeit des *Average*-Wertes von der Fluoreszenzintensität. Die errechnete Funktion der idealen Geraden vom 3% zum 100%-Wert lautet: $f(x) = 0,876x + 4,742$

Fluoreszenzen unterhalb einer Farbstoffkonzentration von 3% waren nicht messbar.

3.4.2 Vergleich der Computer-gestützten mit der manuellen Auszählung von Immunfluoreszenzfärbungen

Nach Bestätigung des Linearitätsverhältnisses zwischen Farbintensität und den gemessenen Fluoreszenz-Durchschnittswerten ging es nun darum, die Vergleichbarkeit zwischen der manuellen und der Computer-gestützten Auswertung von Fluoreszenz-gefärbten Zellen zu prüfen. Wie bereits gezeigt wurde, kann mit dem Programm Adobe-Photoshop sehr gut die Fluoreszenz in einem bestimmten Bildausschnitt quantifiziert werden. Adobe-Photoshop ist jedoch kein Bildauswertungsprogramm, d. h. einzelne Objekte, wie z. B. Beads oder Zellen können nicht erkannt und deshalb auch nicht gezählt werden. Es ist jedoch möglich, die Intensität der CTLA-4-Färbung zur Intensität einer T-Zellfärbung in Beziehung zu setzen und auf diese Weise ein Maß für die CTLA-4-Expression zu erhalten. Hierzu wurden auf einen Objektträger mittels Cytospin aufgebrachte PBL (siehe 2.7.3 und 2.8) CD3- (FITC-Farbstoff) und CTLA-4- (TRITC-Farbstoff) gefärbt. Mittels der oben beschriebenen Computerauswertung wurde die *Average*-Werte verschiedener Bildausschnitte für die FITC- und TRITC-Färbung berechnet.

Der Quotient aus TRITC und FITC $\times 100\%$ ($\frac{\textit{Average} - \textit{TRITC}}{\textit{Average} - \textit{FITC}} \times 100\%$) ist ein

Maß für die CTLA-4-Expression der T-Zellen Dieser Parameter sollte mit den Ergebnissen der mikroskopischen Auszählung des Prozentsatzes CTLA-4-positiver T-Zellen verglichen werden.

Hierfür wurden an 30 verschiedenen Bildausschnitte verschiedener Präparate mit beiden Methoden quantifiziert (3-fache Bildwiederholung, ausführliche Daten s. Anhang). Dabei zeigt sich eine deutliche positive Korrelation (Korrelationskoeffizient $\rho=0,84$) zwischen der manuellen Auszählung und der Computer-gestützten Messung (Abb. 17).

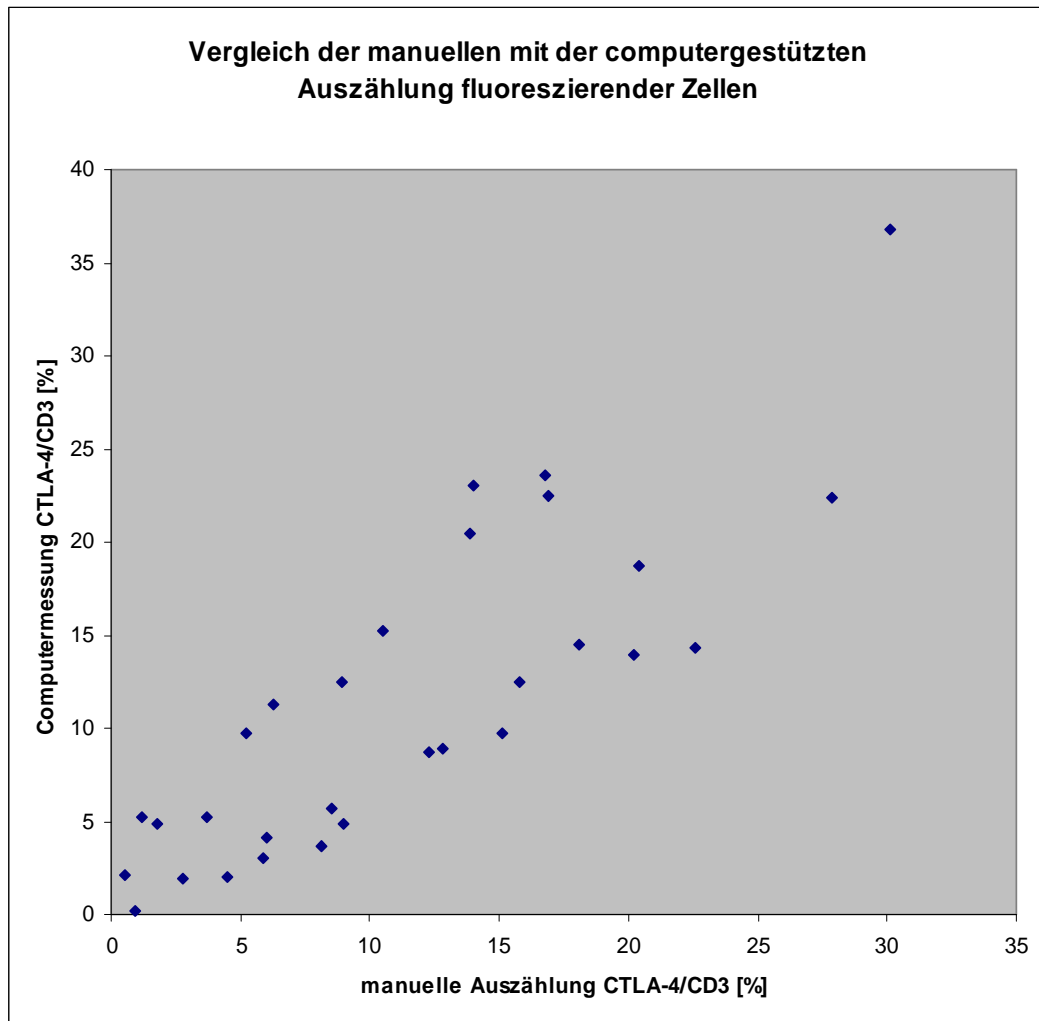


Abbildung 17: Jeder Punkt entspricht einem Wertepaar aus manueller Auszählung und Computermessung der CTLA-4-Expression der CD3-Zellen. Die computergestützte Messung korreliert mit der manuellen Auszählung fluoreszenzmarkierter Zellen (Korrelationskoeffizient $\rho=0,84$).

4 Diskussion

4.1 CTLA-4 auf tumorinfiltrierenden Lymphozyten von Melanomen

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass die TIL bei Melanomen starke CTLA-4-Expressionen aufwiesen. Der Grad der Tumorinfiltration mit TIL sowie die CTLA-4-Expression korrelierten jedoch nicht mit den vorliegenden biographischen und klinischen Parametern wie Geschlecht, histologischer Primärmelanomtyp, Eindringtiefe, HLA-Typ und Zeitraum bis zum Auftreten der ersten Metastasierung. Ein prognostischer Wert der Tumorinfiltration mit TIL und der TIL-CTLA-4-Expression lässt sich deshalb aus diesen Daten, die allerdings an lediglich 15 Tumorpatienten erhoben wurden, nicht ableiten. Dies wäre im Sinne einer körpereigenen Tumorabwehr eventuell zu vermuten gewesen (starke Infiltration einhergehend mit besserer Prognose?).

Möglicherweise wirkt CTLA-4, welches diese Zellen in großer Menge exprimieren, hemmend auf die TIL. Eine CTLA-4-Blockade durch monoklonale anti-CTLA-4-Antikörper könnte in diesem Fall die Zellen reaktivieren und eine effektive Tumorbekämpfung induzieren. Bei den aktuellen klinischen Studien mit CTLA-4-AK zur Tumortherapie erfolgt die Patientenselektion unabhängig von der Höhe der CTLA-4-Expression auf TIL des Primärtumors bzw. der vorliegenden Metastasen. Um eine höhere Effektivität mit dem Einsatz von CTLA-4-Antikörpern zu erreichen, liegt es nach dieser Arbeit nahe, zukünftig nur solche Patienten zu behandeln, die eine nachweislich hohe CTLA-4-Expression im (Primär-)Tumor oder den Filiae aufweisen. So würde der Therapieeffekt einer (kostenintensiven) CTLA-4-Blockade wesentlich effizienter genutzt werden. Zudem würde Patienten mit niedriger TIL-CTLA-4-Expression eine (voraussichtlich) erfolglose und nicht nebenwirkungsarme CTLA-4-AK-Therapie erspart. Somit könnten sie schneller einer eventuell erfolgreichereren anderen Therapieform zugeführt werden.

Neue experimentelle Daten deuten auch an, dass eine CTLA-4-Blockade mittels monoklonaler AK bei Tumorpatienten effektiv sein könnte, wenn in den Tumoren hohe IL-10-Konzentrationen vorliegen. Denn es ist bekannt, dass CTLA-4-

Ligation eine Hochregulation des inhibitorischen IL10 bewirkt (Schwarz et al., 2000; Jovasevic et al., 2004). Durch eine CTLA-4-Blockade wird IL10 herabreguliert, was einer Immunstimulation gleichkommt. Jovasevic und Mitarbeiter zeigten im Mausmodell 2004 tatsächlich, dass anti-CTLA-4-AK und IL10-neutralisierende AK die Tumorabstoßung vergleichbar steigern, vermutlich weil beide Interventionen die gleiche Endstrecke haben, nämlich die IL10-Reduktion. Eine Kombination von CTLA-4- und IL10-AK zeigte bei diesen Tumoren therapeutisch keinen zusätzlichen Nutzen, was die These unterstützt. Wenn jedoch die Tumorzellen selbst große Mengen an IL10 produzierten, waren die Tumoren resistent gegenüber anti-CTLA-4-Antikörpern. Denn die Tumorzellen exprimieren kein CTLA-4, so dass eine CTLA-4-Blockade nur auf die Immunzellen wirkt und selektiv deren IL10-Sekretion unterdrückt. IL10 sezernierende Tumoren reagierten wie erwartet auf eine reine anti-IL10-Therapie (Jovasevic et al., 2004). Auch eine Kombination aus anti-CTLA-4-AK und anti-IL10-AK könnten in solchen Fällen sinnvoll sein. Tumoren, die keine eigene IL10-Produktion aufweisen, ließen sich hingegen im Mausmodell sehr erfolgreich mit einer anti-CTLA-4-Therapie behandeln (Leach et al., 1996).

In den letzten Jahren, nach Abschluss der experimentellen Arbeiten, entwickelten sich Treg zu einem Schwerpunkt der immunologischen Forschung. Da die natürlich vorkommenden Treg konstitutiv CTLA-4 an ihrer Oberfläche exprimieren (Cesana et al., 2006), könnte ein Teil der in dieser Arbeit charakterisierten TIL tatsächlich Treg mit immunsuppressiver Funktion darstellen. In zukünftigen Versuchen sollte dieses überprüft werden, z. B. durch eine simultane Färbung des für Treg charakteristischen Transkriptionsfaktors FoxP3. Von großem Interesse wäre auch, ob die Antikörperblockade des CTLA-4-Rezeptors auf CD4⁺CD25⁺ (Treg) und/oder CD4⁺CD25⁻ (T-Helferzelle) essentiell für die Eigenschaft der Immunaktivierung zur Tumorabwehr ist.

Dass es sich bei den CTLA-4-exprimierenden TIL dieser Arbeit um CTL handelt, konnte ausgeschlossen werden, da CTL CD8-positiv sind, die CTLA-4⁺ TIL jedoch CD4⁺ waren.

4.2 CTLA-4-Expressionsdynamik auf peripheren Blutlymphozyten von Hyperthermie-behandelten Tumorpatienten

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass am sechsten Tag nach einer Hyperthermiebehandlung die CD4⁺ T-Zellen im peripheren Blut CTLA-4 deutlich hochregulieren. Dies wäre entsprechend der ideale Zeitpunkt für den Beginn einer zusätzlichen anti-CTLA-4-Antikörper-Therapie, um die durch die Hyperthermie ausgelöste Immunaktivierung (erkennbar an der CTLA-4-Expressionsverstärkung) aufrechtzuerhalten. Dieses CTLA-4-Expressionsmaximum nach Hyperthermie ist deutlich später als das Expressionsmaximum nach 2-3 Tagen nach PHA-Stimulation (Walunas et al., 1994) oder dem CTLA-4-mRNA-Peak nach 24-36 Stunden nach PHA- und PMA-Stimulation in vitro (Lindsten et al., 1993). Diese Differenz mag an den völlig unterschiedlichen Systemen liegen, zum einen Patient mit Hyperthermiebehandlung plus Zytostatikabehandlung, an Tag 5 zusätzlich Gabe von G-CSF, zum anderen die Zellkultur mit einem Immunstimulanz. Dass die G-CSF-Gabe ein wichtiger Faktor sein mag, wird dadurch unterstützt, dass die G-CSF-Gabe an Tag 5 post-Hyperthermie stattfand und am Tag 6 erst ein signifikanter Anstieg der CTLA-4-Expression zu verzeichnen war.

Um die Frage zu klären, welchen Stellenwert der Faktor Hyperthermie der APC bei Immunaktivierung spielt, wurden in dieser Arbeit zusätzlich Lymphozytenproliferationsversuche unter Hyperthermiebedingungen durchgeführt. Lediglich die Stimulation durch PHA zeigte eine reproduzierbare Proliferationssteigerung. Diese ließ sich in einem Versuch durch den Faktor Hyperthermie zusätzlich steigern. In der Versuchswiederholung fand sich unter Hyperthermie jedoch eine Proliferationsabnahme. Stimulationen durch PPD und Pf zeigten in beiden Versuchen weder eine Proliferationssteigerung noch eine Hyperthermie-getriggerte erhöhte Proliferation.

Somit lässt sich sagen, dass die Hyperthermiebehandlung der APC keinen reproduzierbaren Einfluss auf die Proliferation der T-Zellen hatte. Teils wirkte die Hyperthermie zudem eher antiproliferativ. Wenn technische oder methodische Fehler im Versuchsaufbau nicht vorgelegen haben sollten, müssen noch bislang unbekannte Faktoren eine Rolle spielen. Ein möglicher Faktor könnte die G-CSF-

Gabe am Tag 5 der Hyperthermiebehandlung der Tumopatien sein. Eine G-CSF-Gabe hatte im Modellversuch nicht stattgefunden. In zukünftigen Experimenten sollte daher der Effekt einer G-CSF-Gabe in Bezug auf T-Zellproliferation unter Hyperthermiebedingungen überprüft werden.

4.3 Einführung einer Computer-gestützten Auswertungsmethode von Fluoreszenz-markierten Zellen

Im letzten Teil dieser Arbeit sollte eine computergestützte und damit deutlich unabhängige Methodik zur Messung Fluoreszenz-positiver Zellen (speziell Lymphozyten) eingeführt werden. Dabei wurde die manuell ausgezählte Prozentzahl der CTLA-4-positiven von den CD-3-positiven Zellen mit dem computergestützt errechneten Wert der Fluoreszenzintensität und -fläche des Verhältnisses der CTLA-4-positiven zu den CD-3-positiven Zellen verglichen. Dabei zeigte sich eine starke Korrelation zwischen den beiden unterschiedlichen Messmethoden (Korrelationskoeffizient $\rho=0,84$). Die bestehenden Differenzen lassen sich zum einen erklären durch die vom Computer mitberechneten Farbartefakte, die der Beobachter korrekterweise nicht als Zelle wertet und damit nicht in die Prozentberechnung mit einbezieht. Zum anderen zählt der Beobachter die einzelne farbpositive Zelle unabhängig von ihrer Farbintensität. Er setzt also einen Schwellenwert, der abhängig von der Lichtempfindlichkeit des Auges ist. Der Computer hingegen hat seine eigene Technik-basierte Sensitivität und Auflösung und zieht für die Berechnung des *Average*-Wertes die Parameter Farbintensität und Farbfläche heran (also nicht bloß die einzelne positive Zelle!). Um die Computer-gestützte Auszählung fluoreszenzgefärbter Zellen zu optimieren, wäre eine Bildauswertungs-Software günstig, die in der Lage ist zelluntypische Strukturen (Artefakte) zu erkennen und aus der Berechnung auszuschließen.

Eine alternative Messmethode Fluoreszenz-markierter Zellen stellt die Durchflusszytometrie (FACS) dar. Sie erlaubt es, Zellen in Suspension zu färben und quantitativ auszuwerten (also keine Zellfixierung auf einem Objektträger nötig). Dazu bedarf es jedoch sehr großer Zellzahlen ($>10^4$), welche nicht immer

verfügbar sind. Auch ist darauf zu achten, nur FACS-kompatible Fluoreszenz-Farbstoffe zu verwenden.

Für kleine Zellzahlen der Zellkultur sowie für Gewebeschnitte bleibt die manuelle, alternativ nach weiterer Etablierung und Weiterentwicklung die oben beschriebene Computer-gestützte Auswertung die Methode der Wahl.

5 Zusammenfassung

Im ersten Teil dieser Arbeit wurde gezeigt, dass ein Großteil der TIL bei Primärmelanomen hohe Expressionswerte des anti-inflammatorischen T-Zellmarkers CTLA-4 aufweist. Der in klinischen Studien bereits gezeigte stimulierende Effekt für die Tumorantwort durch die Blockade von CTLA-4 mittels monoklonaler Antikörper mag daher zumindest teilweise durch die Reaktivierung dieser TIL bedingt sein. Ob es sich bei den beschriebenen TIL um Treg handelt, ist noch zu zeigen.

Im zweiten Teil dieser Arbeit wurde die CTLA-4-Expression von PBL von Hyperthermie-behandelten Tumorpatienten gemessen. Dabei zeigte sich ein Expressionsmaximum am sechsten Tag nach Hyperthermie. Eine zusätzliche therapeutische CTLA-4-AK-Gabe nach Hyperthermie sollte daher an diesem Tag oder früher erfolgen, um einen größtmöglichen therapeutischen Nutzen zu erzeugen.

Im dritten Teil dieser Arbeit wurde ein Computer-gestütztes Messsystem für die CTLA-4-Expression von PBL etabliert, welche eine Alternative zur bislang manuellen Auszählung darstellt.

6 Literaturverzeichnis

Alegre ML, Noel PJ, Eisfelder BJ, Chuang E, Clark MR, Reiner SL, Thompson CB (1996) Regulation of surface and intracellular expression of CTLA-4 on mouse T cells. *J Immunol* 157:4762-4770

Attia P, Phan GQ, Maker AV, Robinson MR, Quezado MM, Yang JC, Sherry RM, Topalian SL, Kammula US, Royal RE, Restifo NP, Haworth LR, Levy C, Mavroukakis SR, Nicholl G, Yellin MJ, Rosenberg SA (2005) Autoimmunity correlates with tumor regression in patients with metastatic melanoma treated with anti-cytotoxic T-lymphocyte antigen-4. *J Clin Oncol* 23:6043-53

Baroja ML, Luxenberg D, Chau T, Ling V, Strathdee CA, Carreno BM, Madrenas J (2000) The inhibitory function of CTLA-4 does not require its tyrosine phosphorylation. *J Immunol* 164(1):49-55

Blair PJ, Riley JL, Levine BL, Lee KP, Craighead N, Francomano T, Perfetto SJ, Gray GS, Carreno BM, June CH (1998). CTLA-4 ligation delivers a unique signal to resting human CD4 T cells that inhibits interleukin-2 secretion but allows Bcl-X(L) induction. *J Immunol* 160(1):12-5

Brunner MC, Chambers CA, Chan FK, Hanke J, Winoto A, Allison JP (1999). CTLA-4-Mediated inhibition of early events of T cell proliferation. *J Immunol* 162(10):5813-20

Calvo CR, Amsen D, Kruisbeek AM (1997) Cytotoxic T lymphocyte antigen 4 (CTLA-4) interferes with extracellular signal-regulated kinase (ERK) and Jun N-terminal kinase (JNK) activation, but does not affect phosphorylation of T cell receptor ζ and ZAP-70. *J Exp Med* 186: 1645-53

Carreno BM, Bennett F, Chau TA, Ling V, Luxenberg D, Jussif J, Baroja ML, Madrenas J (2000) CTLA-4 (CD152) can inhibit T cell activation by two different

mechanisms depending on its level of cell surface expression. *J Immunol* 165: 1352-6

Castan J, Tenner-Racz K, Racz P, Fleischer B, Bröker BM (1997). Accumulation of CTLA-4 expressing T lymphocytes in the germinal centres of human lymphoid tissues. *Immunology* 90(2):265-71

Castan J, Klauenberg U, Kalmar P, Fleischer B, Bröker BM (1998). Expression of CTLA-4 (CD152) on human medullary CD4+ thymocytes. *Med. Microbiol. Immunol. (Berl.)* 187(1):49-52

Cesana GC, DeRaffele G, Cohen S, Moroziewicz D, Mitcham J, Stoutenburg J, Cheung K, Hesdorffer C, Kim-Schulze S, Kaufman HL (2006) Characterization of CD4+CD25+ regulatory T cells in patients with high-dose interleukin-2 for metastatic melanoma or renal cell carcinoma. *J Clin Oncol* 24 (7): 1169-1176

Chambers CA, Kuhns MS, Jackson, G (2001) CTLA-4-mediated inhibition in regulation of T cell responses: mechanisms and manipulation in tumor immunotherapy. *Annu Rev Immunol.* 19:565-94

Chen W, Jin W, Wahl SM (1998) Engagement of cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 (CTLA-4) induces transforming growth factor beta (TGF-beta) production by murine CD4(+) T cells. *J Exp Med.* 188(10):1849-57

Chikuma S, Bluestone JA (2002) CTLA-4: Acting at the synapse. *Mol Intervent* 2(4): 205-208

Chikuma S, Abbas AK, Bluestone JA (2005) B7-independent inhibition of T cells by CTLA-4. *J Immunol* : 177-181

Chitnis T, Najafian N, Abdallah KA, Dong V, Yagita H, Sayegh MH, Khoury SJ (2001) CD28-independent induction of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Clin Invest* 107: 575-583

Cinek T, Sadra A, Imboden JB (2000). Cutting edge: tyrosine-independent transmission of inhibitory signals by CTLA-4. *J Immunol* 164(1):5-8

Doyle AM, Mullen AC, Villarino AV, Hutchins AS, High FA, Lee HW, Thompson CB, Reiner SL (2001). Induction of cytotoxic T lymphocyte antigen 4 (CTLA-4) restricts clonal expansion of helper T cells. *J Exp Med* 194(7):893-902

Fallarino F (2003) Modulation of tryptophan catabolism by regulatory T cells. *Nature Immunol* 4: 1206-1212

Gomes NA, Gattass CR, Barreto-De-Souza V, Wilson ME, DosReis GA (2000). TGF-beta mediates CTLA-4 suppression of cellular immunity in murine kalaazar. *J Immunol* 164(4):2001-8

Greene JL, Leytze GM, Emswiler J, Peach R, Bajorath J, Cosand W, Linsley PS (1996) Covalent dimerization of CD28/CTLA-4 and oligomerization of CD80/CD86 regulate T cell costimulatory interactions. *J Biol Chem* 271(43):26762-71

Greenwald RJ, Oosterwegel MA, van der Woude D, Kubal A, Mandelbrot DA, Boussiotis VA, Sharpe AH (2002) CTLA-4 regulates cell cycle progression during a primary immune response. *Eur J Immunol* 32(2): 366-73

Greenwald RJ, Freeman GJ, Sharpe AH (2005) The B7 family revisited. *Annu Rev Immunol* 23: 515-48

Gribben JG, Freeman GJ, Boussiotis VA, Rennert P, Jellis CL, Greenfield E, Barber M, Restivo VA Jr, Ke X, Gray GS, Nadler LM (1995) CTLA4 mediates antigen-specific apoptosis of human T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92(3): 811-5

Grohmann U, Orabona C, Fallarino F, Vacca C, Calcinaro F (2002) CTLA-4-Ig regulates tryptophan catabolism in vivo. *Nature Immunol* 3: 1097-1101

Harding FA, McArthur JG, Gross JA, Raulet DH, Allison JP (1992) CD28-mediated signaling costimulates murine T cells and prevents induction of anergy in T cell clones. *Nature* 356:607-609

Harper K, Balzano C, Rouvier E, Mattei MG, Luciani MF, Golstein P (1991) CTLA-4 and CD28 activated lymphocyte molecules are closely related in both mouse and human as to sequence, message expression, gene structure and chromosomal location. *J. Exp. Med.* 147(3):1037-1044

Hodi FS, Mihm MC, Soiffer RJ, Haluska FG, Butler M, Seiden MV, Davis T, Henry-Spires R, MacRae S, Willman A, Padera R, Jaklitsch MT, Shankar S, Chen TC, Korman A, Allison JP, Dranoff G (2003) Biologic activity of cytotoxic T-lymphocyte antigen 4 antibody blockade in previously vaccinated metastatic melanoma and ovarian carcinoma patients. *Proc Natl Acad Sci* 100:4712-7

Huang AY, Golumbek P, Ahmadzadeh M, Jaffee E, Pardoll D, Levitsky H (1994) Role of bone marrow-derived cells in presenting MHC class I-restricted tumor antigens. *Science* 264(5161):961-5

Humrich J, Riemekasten G (2006) Regulatorische T-Zellen in der Rheumatologie. *Dtsch Med Wochenschr* 131:2288-91

Hurwitz AA, Yu TF, Leach DR, Allison JP (1998) CTLA-4 blockade synergizes with tumor-derived granulocyte-macrophage colony-stimulating factor for treatment of an experimental mammary carcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95(17):10067-71

Hwang KW, Sweatt WB, Brown IE, Blank CB, Gajewski TF, Bluestone JA, Alegre ML (2002) Targeted ligation of CTLA-4 in vivo by membrane-bound anti-CTLA-4-antibody prevents rejection of allogeneic cells. *J Immunol* ...

Jaeger E, Bernhard H, Romero P, Ringhoffer M, Arand M, Karbach J, Ilsemann C, Hagedorn M, Knuth A (1996) Generation of cytotoxic T-cell responses with

synthetic melanoma-associated peptides in vivo: implications for tumor vaccines with melanoma-associated antigens. *Int J Cancer* 66(2):162-9

Jaeger E, Arand M, Ringhoffer M, Karbach J, Jaeger D, Ilsemann C, Hagedorn M, Oesch F, Knuth A (1996) Cytolytic T cell reactivity against melanoma associated differentiation antigens in peripheral blood of melanoma patients and healthy individuals. *Melanoma Research* 6:419-425

Jaeger E, Ringhoffer M, Dienes HP, Arand M, Karbach J, Jaeger D, Ilsemann C, Hagedorn M, Oesch F, Knuth A (1996) Granulocyte macrophage colony-stimulating factor enhances immune responses to melanoma associated peptides in vivo. *Int J Cancer* 67:54-62

Jovasevic VM, Gorelik L, Bluestone JA, Mokyr MB (2004) Importance of IL-10 for CTLA-4-mediated inhibition of tumor-eradicating immunity. *J Immunol* 172(3): 1449-1454

Kantarci OH, Hebrink DD, Achenbach SJ, Atkinson EJ, Waliszewska A, Buckle G, McMurray CT, de Andrade M, Hafler DA, Weinshenker BG (2003) CTLA4 is associated with susceptibility to multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 134: 133-41

Kittler H, Binder M, Wolff K, Pehamberger H (2001) A ten-year analysis of demographic trends for cutaneous melanoma: analysis of 2501 cases treated at the University Department of Dermatology in Vienna (1990-1999). *Wien Klin Wochenschr* 113(9):321-7

Krummel MF, Allison JP (1995) CD28 and CTLA-4 have opposing effects on the response of T cells to stimulation. *J Exp Med* 182(2):459-65

Le NT, Chao N (2007) Regulating regulatory T cells. *Bone Marrow Transplantation* 39: 1-9

Leach DR, Krummel MF, Allison JP (1996) Enhancement of antitumor immunity by CTLA-4 blockade. *Science* 271(5256):1734-6

Lee KM, Chuang E, Griffin M (1998) Molecular basis of T cell inactivation by CTLA-4. *Science* 282: 2263-2266

Leibson PJ (2004) The regulation of lymphocyte activation by inhibitory receptors. *Curr Opin Immunol* 16: 328-336

Lenschow DJ, Walunas TL, Bluestone JA (1996) CD28/B7 system of T cell costimulation. *Annu Rev Immunol* 14:233-58

Lindsten T, Lee KP, Harris ES, Petryniak B, Craighead N, Reynolds PJ, Lombard DB, Freeman GJ, Nadler LM, Gray GS, et al. (1993) Characterization of CTLA-4 structure and expression on human T cells. *J Immunol* 151(7):3489-99

Linsley PS, Greene JL, Brady W, Bajorath J, Ledbetter JA, Peach R (1994) Human B7-1 (CD80) and B7-2 (CD86) bind with similar avidities but distinct kinetics to CD28 and CTLA-4 receptors. *Immunity* 1:793-801

Linsley PS, Bradshaw J, Greene J, Peach R, Bennett KL, Mittler RS (1996) Intracellular trafficking of CTLA-4 and focal localization toward sites of TCR engagement. *Immunity* 4:535-543

Luhder F, Hoglund P, Allison JJP, Benoist C, Mathis D (1998) Cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 (CTLA-4) regulates the unfolding of autoimmune diabetes. *J Exp Med* 187: 427-432

Maker AV, Attia P, Rosenberg SA (2005) Analysis of the cellular mechanism of antitumor responses and autoimmunity in patients treated with CTLA-4 blockade. *J Immunol* 175:7746-54

Maker AV, Phan GQ, Attia P, Yang JC, Sherry RM, Topalian SL, Kammula US, Royal RE, Haworth LR, Levy C, Kleiner D, Mavroukakis SA, Yellin M, Rosenberg SA (2005) Tumor regression and autoimmunity in patients treated with

cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 blockade and interleukin 2: A phase I/II study. *Ann Surg Oncol* 12(12):1005-16

Maker AV, Yang JC, Sherry RM, Topalian SL, Kammula US, Royal RE, Hughes M, Yellin MJ, Haworth LR, Allen T, Mavroukakis SA, Attia P, Rosenberg SA (2006) Inpatient dose escalation of anti-CTLA-4 antibody in patients with metastatic melanoma. *J Immunother* 29(4):455-63

Masteller EL, Chuang E, Mullen AC, Reiner SL, Thompson CB (2000) Structural analysis of CTLA-4 function in vivo. *J Immunol* 164: 5319-27

Nakaseko C, Miyatake S, Iida T, Hara S, Abe R, Ohno H, Saito Y, Saito T (1999) Cytotoxic T lymphocyte antigen 4 (CTLA-4) engagement delivers an inhibitory signal through the membrane-proximal region in the absence of the tyrosine motif in the cytoplasmic tail. *J Exp Med* 190(6):765-74

Olsson C, Riesbek K, Dohlsten M, Michaelsson E, Riebek K (1999) CTLA-4 ligation suppresses CD28-induced NF- κ B and AP-1 activity in mouse T cell blasts. *J Biol Chem* 274: 14400-5

O'Mahony D, Morris JC, Quinn C, Gao W, Wilson WH, Gause B, Pittaluga S, Neelapu S, Brown M, Fleisher TA, Gulley JL, Schlom J, Nussenblatt R, Albert P, Davis TA, Lowy I, Petrus M, Waldmann TA, Janik JE (2007) A pilot study of CTLA-4 blockade after cancer vaccine failure in patients with advanced malignancy. *Clin Cancer Res* 13(3):985-64

Perez VL, Van Parijs L, Biuckians A, Zheng XX, Strom TB, Abbas AK (1997) Induction of peripheral T cell tolerance in vivo requires CTLA-4 engagement. *Immunity* 6(4):411-7

Phan GQ, Yang JC, Sherry RM, Hwu P, Topalian SL, Schwartzentruber DJ, Restifo NP, Haworth LR, Seipp CA, Freezer LJ, Morton KE, Mavroukakis SA, Duray PH, Steinberg SM, Allison JP, Davis TA, Rosenberg SA (2003) Cancer regression and autoimmunity induced by cytotoxic T lymphocyte-associated

antigen 4 blockade in patients with metastatic melanoma. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 100(14):8372-7

Reuben JM, Lee BN, Li C, Gomez-Navarro J, Bozon VA, Parker CA, Hernandez IM, Gutierrez C, Lopez-Berestein G, Camacho LH (2006) Biologic and immunomodulatory events after CTLA-4 blockade with ticilimumab in patients with advanced malignant melanoma. *Cancer* 106:2437-44

Rivoltini L, Kawakami Y, Sakaguchi K, Southwood S, Sette A, Robbins PF, Marincola FM, Salgaller ML, Yannelli JR, Appella E (1995) Induction of tumor-reactive CTL from peripheral blood and tumor-infiltrating lymphocytes of melanoma patients by in vitro stimulation with an immunodominant peptide of the human melanoma antigen MART-1. *J Immunol.* 154(5):2257-65

Rodriguez MR, Nunez-Roldan A, Aguilar F, Valenzuela A, Garcia A, Gonzalez-Escribano MF (2002) Association of the CTLA4 3' untranslated region polymorphism with the susceptibility to rheumatoid arthritis. *Hum Immunol* 63: 76-81

Saito T (1998) Negative regulation of T cell activation. *Curr Opin Immunol.* 10(3):313-21

Sanderson K, Scotland R, Lee P (2005) Autoimmunity in a phase I trial of a fully human anti-CTLA-4 monoclonal antibody with multiple peptides and Montanide ISA 51 for patients with resected stages III/IV melanoma. *J Clin Oncol* 23:741-50

Santulli-Marotto S, Nair SK, Rusconi C, Sullenger B, Gilboa E (2003) Multivalent RNA aptamers that inhibit CTLA-4 and enhance tumor immunity. *Cancer Res.* 63(21):7483-9

Schlotmann T, Waase I, Jülch C, Klauenberg U, Müller-Myhsok B, Dietrich M, Fleischer B, Bröker BM (2000) CD4 alphabeta T lymphocytes express high levels of the T lymphocyte antigen CTLA-4 (CD152) in acute malaria. *J. Inf. Dis.* 182(1):367-70

Schwartz RH (1990) A cell culture model for T lymphocyte clonal anergy. *Science* 248:1349-1356

Schwarz A, Beissert S, Grosse-Heitmeyer K, Gunzer M, Bluestone JA, Grabbe S, Schwarz T (2000) Evidence for functional relevance of CTLA-4 in ultraviolet-radiation-induced tolerance. *J Immunol* 165(4): 1824-1831

Shrikant P, Khoruts A, Mescher MF (1999) CTLA-4 blockade reverses CD8+ T cell tolerance to tumor by a CD4+ T cell- and IL-2-dependent mechanism. *Immunity* 11(4):483-93

Sotomayor EM, Borrello I, Tubb E, Allison JP, Levitsky HI (1999) In vivo blockade of CTLA-4 enhances the priming of responsive T cells but fails to prevent the induction of tumor antigen-specific tolerance. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96(20):11476-81

Steiner K, Waase I, Dietrich M, Fleischer B, Bröker BM (1999) Enhanced expression of CTLA-4 (CD152) on CD4+ T cells in HIV infection. *Clin. Exp. Immunology* 115(3):451-7

Steiner K, Moosig F, Csernok E, Selleng K, Gross WL, Fleischer B, Bröker BM (2001) Increased expression of CTLA-4 (CD152) by T and B lymphocytes in Wegener's granulomatosis. *Clin Exp Immunol* 126(1):143-50

Takahashi T, Tagami T, Yamazaki S, Uede T, Shimizu J, Sakaguchi N, Mak TW (2000) Immunologic self-tolerance maintained by CD25(+)CD4(+) regulatory T cells constitutively expressing cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4. *J Exp Med* 192(2):303-10

Tivol EA, Borriello F, Schweitzer AN, Lynch WP, Bluestone JA, Sharpe AH (1995) Loss of CTLA-4 leads to massive lymphoproliferation and fatal multiorgan tissue destruction, revealing a critical negative regulatory role of CTLA-4. *Immunity* 3(5):541-7

Ueda H, Howson JM, Esposito L (2003) Association of the T-cell regulatory gene CTLA4 with susceptibility to autoimmune disease. *Nature* 423:506-11

van der Merwe PA, Bodian DL, Daenke S, Linsley P, Davis SJ (1997) CD80 (B7-1) binds both CD28 and CTLA-4 with a low affinity and very fast kinetics. *J Exp Med* 185(3):393-403

van der Zee J (2002) Heating the patient: a promising approach? *Ann Oncol.* 13(8):1173-84

van Elsas A, Hurwitz AA, Allison JP (1999) Combination immunotherapy of B16 melanoma using anti-cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 (CTLA-4) and granulocyte/macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF)-producing vaccines induces rejection of subcutaneous and metastatic tumors accompanied by autoimmune depigmentation. *J Exp Med* 190(3):355-66

van Elsas A, Suttmuller RP, Hurwitz AA, Ziskin J, Villasenor J, Medema JP, Overwijk WW, Restifo NP, Melief CJ, Offringa R, Allison JP (2001) Elucidating the autoimmune and antitumor effector mechanisms of a treatment based on cytotoxic T lymphocyte antigen-4 blockade in combination with a B16 melanoma vaccine: comparison of prophylaxis and therapy. *J Exp Med.* 194(4):481-9

Van Parijs L, Refaeli Y, Lord JD, Nelson BH, Abbas AK, Baltimore D (1999) Uncoupling IL-2 signals that regulate T cell proliferation, survival, and Fas-mediated activation-induced cell death. *Immunity* 11(3):281-8

Vijakrishnan L, Slavik JM, Illes Z, Greenwald RJ, Rainbow D (2004) An autoimmune disease-associated CTLA-4 splice variant lacking the B7 binding domain signals negatively in T cells. *Immunity* 20: 563-575

Visseren MJ, van Elsas A, van der Voort EI, Rensing ME, Kast WM, Schrier PI, Melief CJ (1995) CTL specific for the tyrosinase autoantigen can be induced from healthy donor blood to lyse melanoma cells. *J Immunol.* 154(8):3991-8

Walunas TL, Lenschow DJ, Bakker CY, Linsley PS, Freeman GJ, Green JM, Thompson CB (1994) CTLA-4 can function as a negative regulator of T cell activation. *Immunity* 1(5):405-13

Waterhouse P, Penninger JM, Timms E, Wakeham A, Shahinian A, Lee KP, Thompson CB (1995) Lymphoproliferative disorders with early lethality in mice deficient in *Ctla-4*. *Science* 270(5238):985-8

Wust P, Hegewisch-Becker S, Issels R. (2003) Hyperthermia: current status and therapeutic results. *Dtsch Med Wochenschr.* 128(39):2023-9

Yang YF, Zou JP, Mu J, Wijesuriya R, Ono S, Walunas T, Bluestone J (1997) Enhanced induction of antitumor T-cell responses by cytotoxic T lymphocyte-associated molecule-4 blockade: the effect is manifested only at the restricted tumor-bearing stages. *Cancer Res* 57(18):4036-41

7 Danksagung

Ganz herzlich möchte ich mich bei Prof. Fleischer bedanken, dass er mir das sehr interessante und spannende Thema überlassen hat und ich die Arbeit in seiner Abteilung durchführen konnte. Weiter möchte ich bei Frau Prof. Bröker für die perfekte Betreuung, die anregenden Diskussionen und die Geduld bedanken. Frau Klauenberg, Tim Greve und Uwe Speck sei ganz besonders gedankt, da sie mich in die verschiedenen Techniken und den Laboralltag eingewiesen haben und immer für Fragen offen standen.

Frau Dr. Jäger möchte ich für die Bereitstellung des Untersuchungsmaterials danken.

Danke an die gesamte Abteilung für Mikrobiologie und Immunologie des Bernhard-Nocht-Instituts für die schöne Zeit, die spannende Arbeit und das kollegiale Klima.

Meinen Eltern und meiner Ehefrau Annika danke ich ganz herzlich für die Unterstützung.

8 Lebenslauf

Aus Datenschutzgründen wird der Lebenslauf in der elektronischen Version nicht angezeigt.

9 Anhang

Zu 3.1:

Klinische Angaben zu den 15 Melanompatienten:

Nr.	Geburtsjahrgang	Geschlecht	HLA-Klasse 1	HLA-Klasse 2	Erstdiagnose (Alter [Jahren] bei ED)
1	1935	m	A3,24 B7,27 Cw2 w7	DRB1: 1,15	1994 (59)
2	n. bek.	f			
3	n.bek.	f			
4	n. bek.	f			
5	1938	f	A1,30 B35,17 Cw4		5/1985 (47)

Nr.	Histologie	Primärmanifestation	Initiales Stadium (klin. Stadium, Clark, Breslow)	Metastasierung	Bemerkung
1	SSM	Re supramamillär	Level 3; 1,0 mm	1/99 Lymphkn.	Urothel-CA 6/99
2					
3					
4					
5	SSM	Li Unterschenkel	Level 3; 2,65 mm	89/90 LK, seit 94 lokal u. LK, seit 6/95 (sub)cutan	

Nr.	Geburtsjahrgang	Geschlecht	HLA-Klasse 1	HLA-Klasse 2	Erstdiagnose (Alter [Jahren] bei ED)
6	1949	f	A24,32 B27,15 Cw2,3	DR4,16	3/96 LK (57)
7	1948	f	A1,2 B8,6D Cw3,7	DRB1: 1,3	1985 (37)
8	1944	m	A2,3 B7,27 Cw2	DRB1: 1,15	12/91 LK (47)
9	1927	f	n.d.	n.d.	1/98 (71)
10	1960	f	A1,23 B7,44 Cw4	n.d.	1984 (24)

Nr.	Histologie	Primärmanifestation	Initiales Stadium (klin. Stadium, Clark, Breslow)	Metastasierung	Bemerkung
6	n. bek.	n. bek.	Tx N1? Mx	5/96 Lk u. Lunge, 12/98 V.a. abd. Met.	
7	n. bek.	nuchal	n.bek.	10/97 NN, Lu, Darm, 4/99 Bauchwand, 8/99 Hirn	
8	amelanotisch	n.bek.	TxN1Mx	11/95 LK, 4/99 Weichteil retroperitoneal, 8/99 Hirn	
9	Nodulär, exulceriert	re Knie	Level 5, pT4a N1 Mx	1/98 LK, 3/99 LK	
10	nodulär	li parietal	n. bek.	10/92 subcutan, 1/93 LK, 4/93 spinal, 3/98 Weichteil	

Nr.	Geburtsjahrgang	Geschlecht	HLA-Klasse 1	HLA-Klasse 2	Erstdiagnose (Alter [Jahren] bei ED)
11	1945	m	n.d.	n.d.	7/90 (45)
12	n.bek.	m			
13	1941	m	A26,32 B51,78	DRB1: 13,14	7/98 (57)
14					
15	1940	m	n.d.	n.d.	1994 (54)

Nr.	Histologie	Primärmanifestation	Initiales Stadium (klin. Stadium, Clark, Breslow)	Metastasierung	Bemerkung
11	n. bek.	Rücken	Level 3	3/98 Lk, Lu, duodenal, 5/98 Hirn	

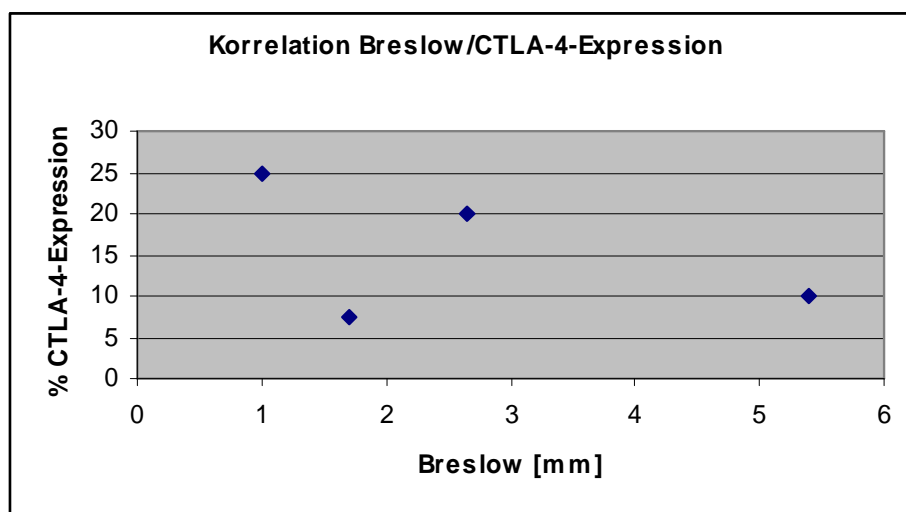
12					
13	nodulär	Oberarm re	Level 4, 1,7 mm	2/99 subcutan	M. Parkinson
14					
15	nodulär	Hochparietal re	Level 5, 5,4 mm	11/98 LK, subcutan	

Legende: n.d.: nicht durchgeführt; LK: Lymphknoten; Lu: Lunge; NN: Nebenniere

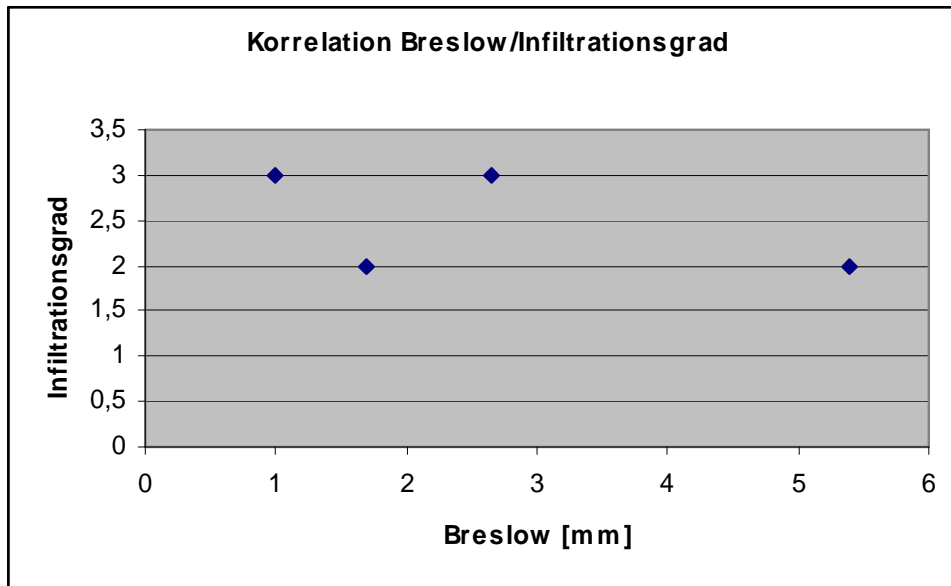
TIL-Verteilungsmuster und CTLA-4-Expression:

	Mittelwert CTLA-4- Expression /CD3 [%]	Standardabweichung
geringe Infiltration	4,00	1,73
mäßige Infiltration	8,75	1,44
massive Infiltration	25,57	4,54

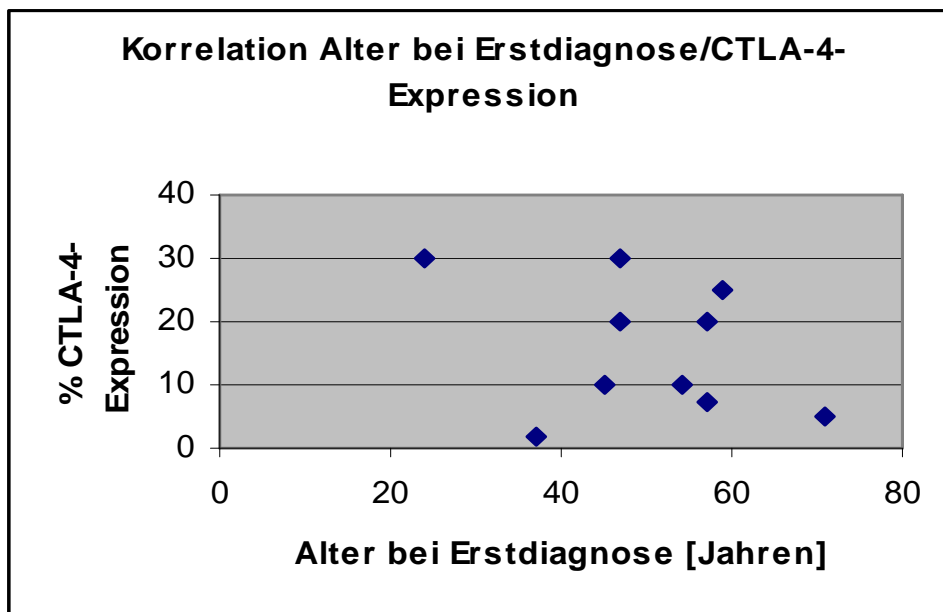
Statistische Auswertung der Daten zu den 15 Melanomen:



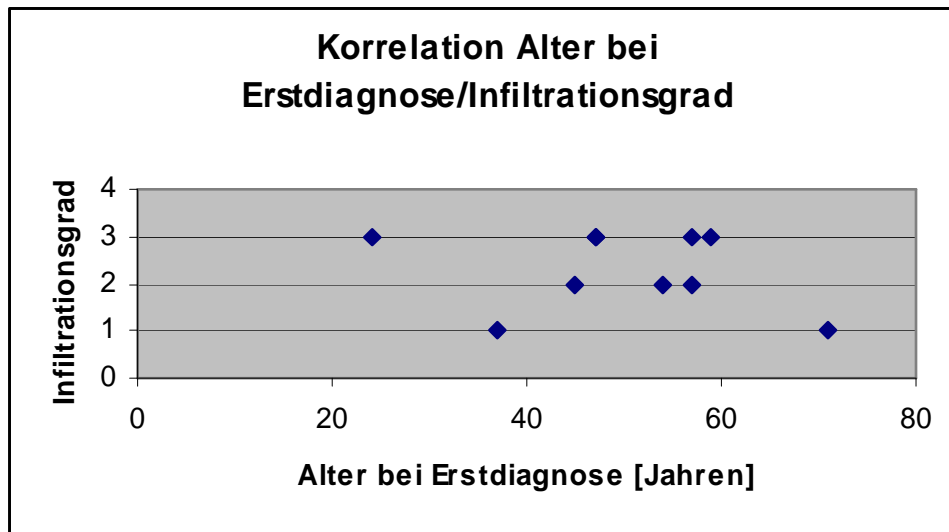
Legende: % CTLA-4-Expression entspricht dem CTLA-4-positiven Anteil der CD3-positiven Zellen



Legende: Infiltrationsgrad 1: gering; Infiltrationsgrad 2: mäßig; Infiltrationsgrad 3: massiv

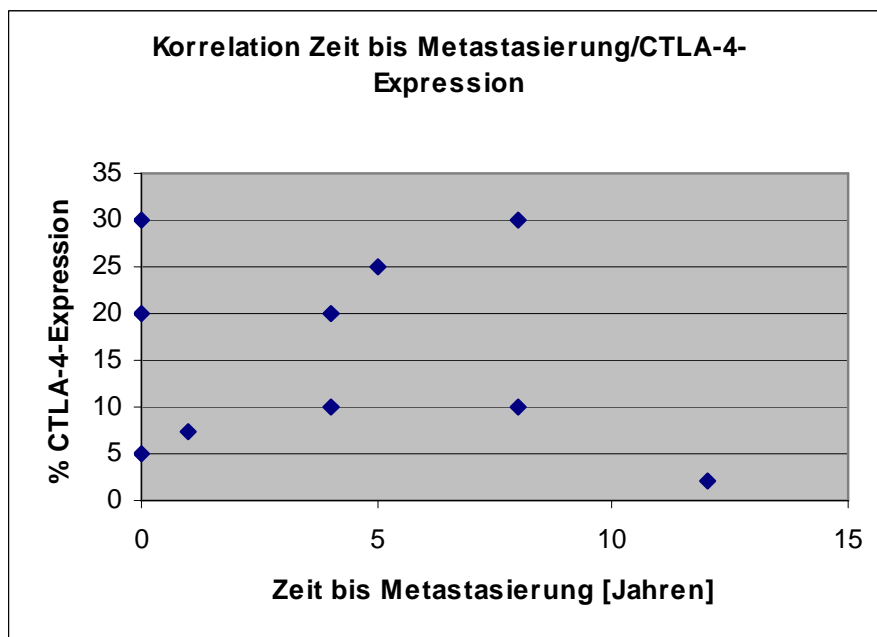


Korrelationskoeffizient ρ : -0,34 (keine Korrelation)

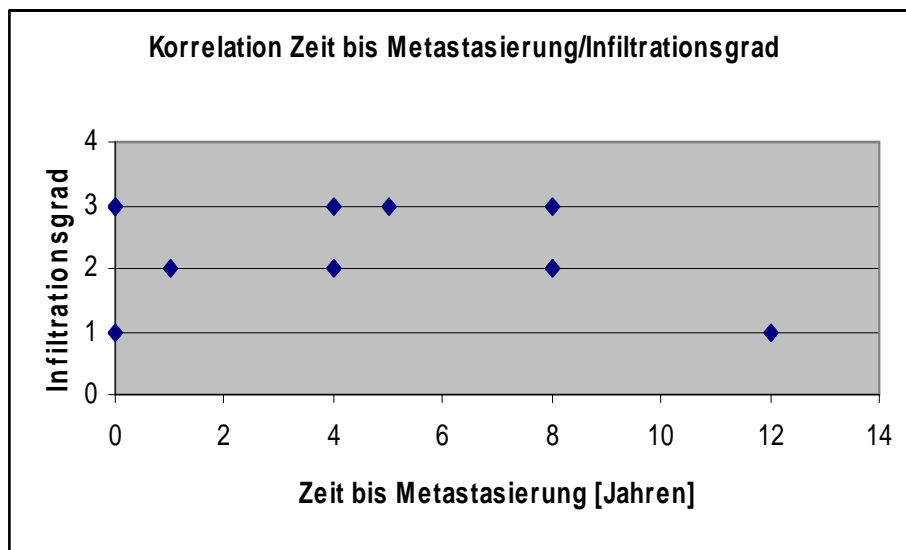


Legende: Infiltrationsgrad 1: gering; Infiltrationsgrad 2: mäßig; Infiltrationsgrad 3: massiv

Korrelationskoeffizient ρ : -0,24 (keine Korrelation)

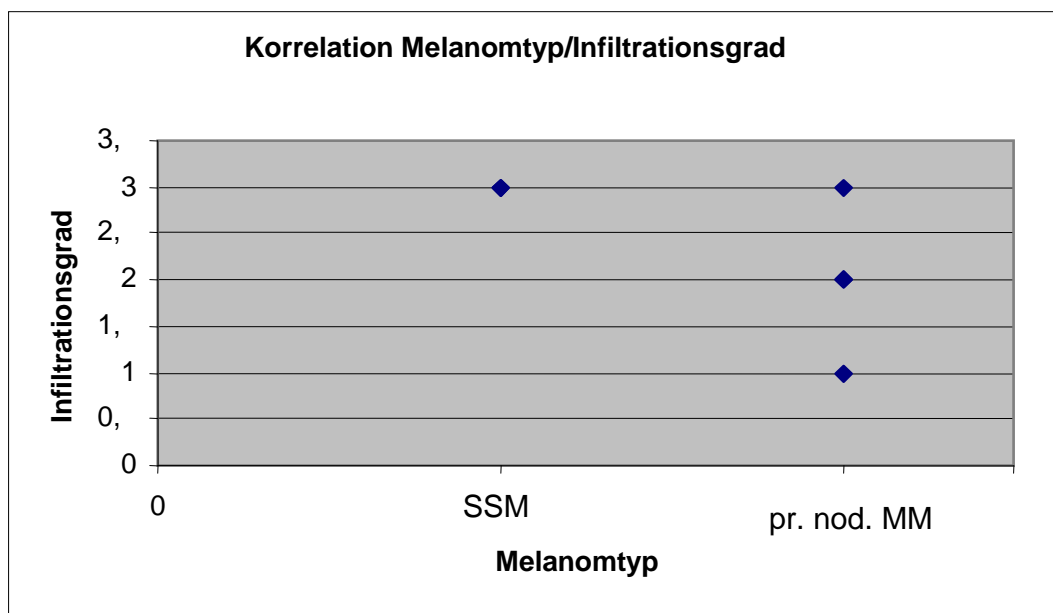


Korrelationskoeffizient ρ : -0,19 (keine Korrelation)

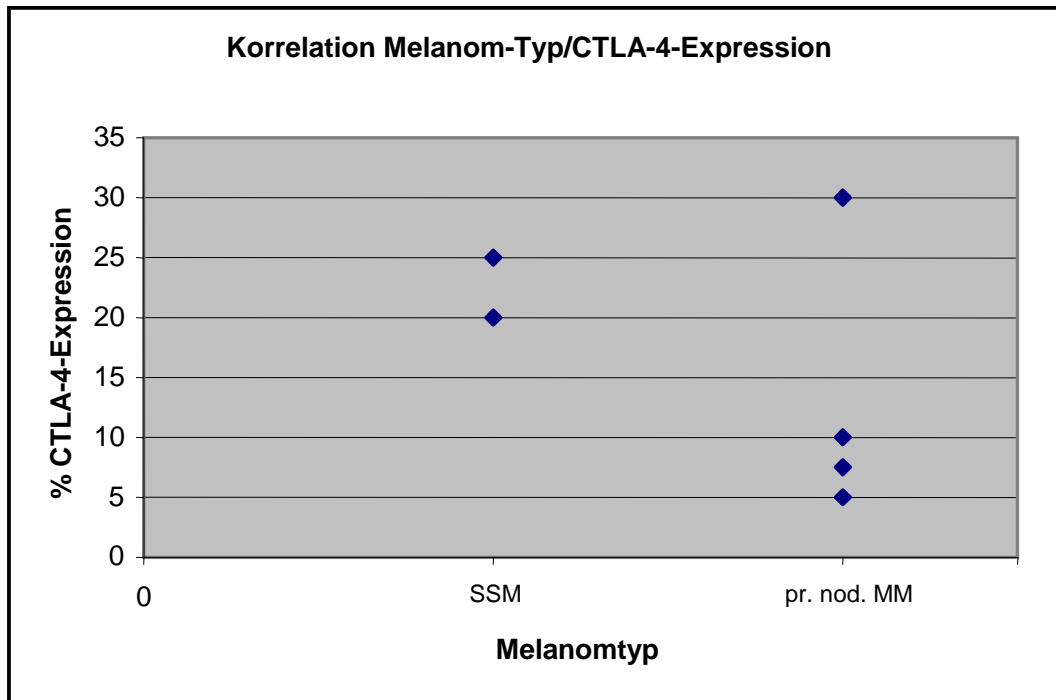


Legende: Infiltrationsgrad 1: gering; Infiltrationsgrad 2: mäßig; Infiltrationsgrad 3: massiv

Korrelationskoeffizient ρ : -0,25 (keine Korrelation)

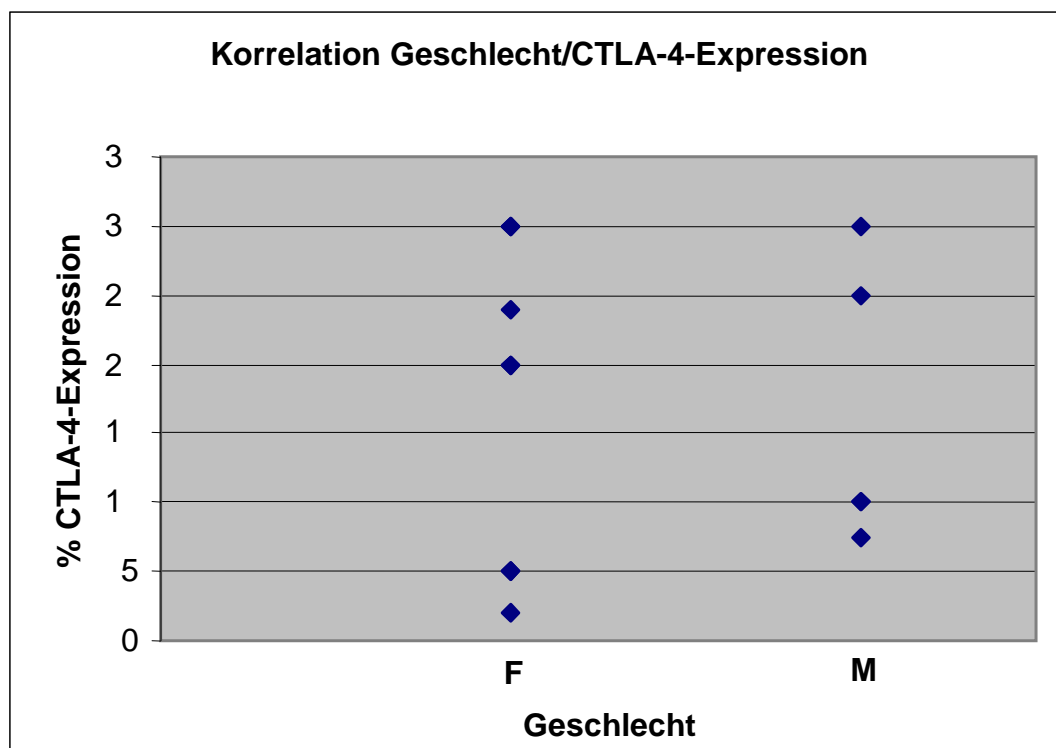


Legende: Infiltrationsgrad 1: gering; Infiltrationsgrad 2: mäßig; Infiltrationsgrad 3: massiv

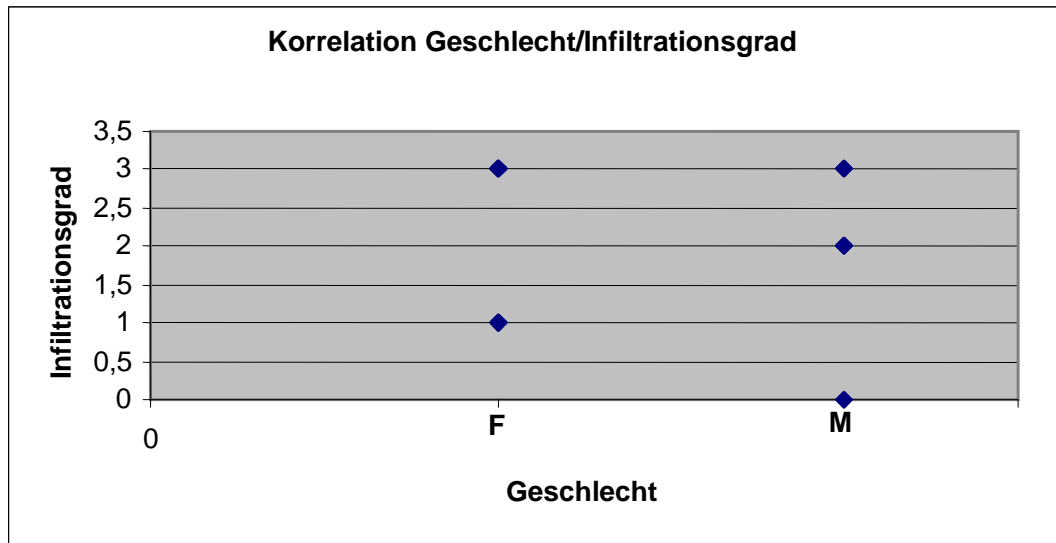


Korrelationskoeffizient ρ : -0,47 (keine Korrelation)

Mann-Whitney-U-Test: $p=0,80$



Mann-Whitney-U-Test: $p=0,83$



Legende: Infiltrationsgrad 1: gering; Infiltrationsgrad 2: mäßig; Infiltrationsgrad 3: massiv

Mann-Whitney-U-Test: $p=1,00$

Zu 3.2

CTLA-4-Werte der PBLs während erstmaliger Hyperthermie-Behandlung:

	vor	nach	Tag1	Tag2	Tag3	Tag4	Tag5	Tag6	Tag7	Tag8	Tag9
HT1	1,08	1,31	0,96	1,18	0,7						
HT2	2,6	1,24	1,35	0	0,6						
HT3	0,61	0,63	0,5	0,48	0,52						

HT4	0						0,5				
HT5	0					0					
HT6	1,5						1,5	3,4	3,8		
HT7	1,5						1,1	7,1	5,1	0,7	
HT8	1,5					0	0				
HT9	0						0,5	3,8	3	1,8	
HT10	2,6						1,9	6,25	5,2		6,5
Mittelwert	1,14	1,05	0,94	0,55	0,61	0	0,92	5,14	4,28	1,25	6,5
Standardabw.	0,99	0,39	0,43	0,59	0,09	0	0,71	1,82	1,06	0,78	0

Legende: HTx: Codierung der Hyperthermie-Patienten; vor: Probe direkt vor Hyperthermiebeginn; nach: Probe direkt nach Hyperthermiebehandlung

Student-t-Test für gepaarte Stichproben der 1. Hyperthermie-Behandlung

	vor/nach	nach/Tag 1	Tag 1/2	Tag 2/3	Tag 3/4
p=	0,53	0,47	0,51	0,88	0,50

	Tag 4/5	Tag 5/6	Tag 6/7	Tag 7/8
p=	0,44	0,02	0,18	0,33

	vor/Tag 1	vor/Tag 2	vor/Tag 3	vor/Tag 4
p=	0,32	0,42	0,30	0,50

	vor/Tag 5	vor/Tag 6	vor/Tag 7	vor/Tag 8
p=	0,44	0,02	0,002	0,77

CTLA-4-Werte während der 2. Hyperthermie-Behandlung:

	vor	nach	Tag1	Tag2	Tag3
HT11	1,88	2	1,39	0,99	1,69
HT12	2,99	2,72	0,46	2,26	0
HT13*	1,79	2,91	3,59	3,33	3,7
HT14	9,73	5,92	6,04	1,21	1,95
HT2**	2,36	1,79	7,82	9,39	
Mittelwert	3,75	3,07	3,86	3,44	1,84
Standard-abw.	3,38	1,66	3,09	3,46	1,51

*: bei HT13 bereits 3. Hyperthermiebehandlung; **: HT2 auch zuvor während erster Hyperthermie-Behandlung ausgewertet (s.o.)

Student-t-Test für gepaarte Stichproben der 2. bzw. 3. Hyperthermie-Behandlung:

	vor/nach	nach/Tag1	Tag1/2	Tag2/3
p=	0,46	0,60	0,74	0,89

	vor/Tag1	vor/Tag2	vor/Tag3
p=	0,95	0,91	0,36

Zu 3.3:

Proliferationsversuch 1:

Ansatz 1: 37°C Inkubationstemperatur (Proliferationsmessung in [Zerfälle/min])

37°C	Kein Zusatz	PPD	PF	PHA
5x10 ⁴ Zellen	17,6	16,5	253,6	
2,5x10 ⁴ Zellen	19,9	16,5	10,7	
1,25x10 ⁴ Zellen	17,6	16,5	17,0	867,1
0,6x10 ⁴ Zellen	15,4	20,7	10,7	
0,3x10 ⁴ Zellen	11,0	26,9	6,4	
Keine Zellen	26,5	12,4	8,5	78,6

Ansatz 2: mit einstündiger Vor-Inkubation bei 41,8°C, anschließend 37°C

Inkubationstemperatur (Proliferationsmessung in [Zerfälle/min])

41,8°C	Kein Zusatz	PPD	PF	PHA
5x10 ⁴ Zellen	17,6	16,5	106,5	
2,5x10 ⁴ Zellen	19,9	12,4	10,7	
1,25x10 ⁴ Zellen	24,3	14,5	10,7	922,4
0,6x10 ⁴ Zellen	19,9	14,5	12,8	
0,3x10 ⁴ Zellen	8,8	16,5	6,4	
Keine Zellen	11,0	8,3	12,8	140,3

Proliferationsversuch 2:

Ansatz 1: 37°C Inkubationstemperatur (Proliferationsmessung in [Zerfälle/min])

37°C	Kein Zusatz	PPD	PF	PHA
5x10 ⁴ Zellen	55,9	1215,3	38,6	
2,5x10 ⁴ Zellen	46,4	2203,5	71,1	
1,25x10 ⁴ Zellen	52,4	2840,7	193,25	7012,6
0,6x10 ⁴ Zellen	72,3	2720,1	209,7	
0,3x10 ⁴ Zellen	44,2	2335,6	92,8	
Keine Zellen	38,2	2647,4	116,3	5205,5

Ansatz 2: mit einstündiger Vor-Inkubation bei 41,8°C, anschließend 37°C
Inkubationstemperatur (Proliferationsmessung in [Zerfälle/min])

41,8°C	Kein Zusatz	PPD	PF	PHA
5x10 ⁴ Zellen	51,9	1095,7	45,2	
2,5x10 ⁴ Zellen	54,9	2099,8	66,1	
1,25x10 ⁴ Zellen	31	1800,5	47,4	5983,4
0,6x10 ⁴ Zellen	47,4	1328,7	53,6	
0,3x10 ⁴ Zellen	39,3	1842,6	96,5	
Keine Zellen	31,7	2007,4	441,2	5487,5

Zu 3.4.1:**InSpeck Kalibrationsfarbstoff Green:**

einfache Bildwiederholung:

Kit- Fluoreszenzintensität	3%	10%	30%	100%
Average	5,524	10,198	24,630	87,072

InSpeck Kalibrationsfarbstoff Red:

einfache Bildwiederholung:

Kit- Fluoreszenzintensität	3%	10%	30%	100%
Average	7,375	15,587	27,241	92,339

Zu 3.4.2:**Vergleich der Computer-gestützten mit der manuellen
Auszählung von Immunfluoreszenzfärbungen**

Ausgezählter Wert: $\frac{CTLA - 4}{CD3} \times 100\%$	0,5	0,9	1,2	1,8	2,8	3,7	4,5	5,2	5,9	6,0
Errechneter Wert: $\frac{Average - TRITC}{Average - FITC} \times 100\%$	2,1	0,2	5,2	4,9	1,9	5,2	2,0	9,7	3,0	4,1

Ausgezählter Wert: $\frac{CTLA - 4}{CD3} \times 100\%$	6,3	8,1	8,5	8,9	9,0	10,5	12,3	12,8	13,9	14,0
Errechneter Wert: $\frac{Average - TRITC}{Average - FITC} \times 100\%$	11,3	3,7	5,7	12,5	4,9	15,2	8,7	8,9	20,5	23,0

Ausgezählter Wert: $\frac{CTLA - 4}{CD3} \times 100\%$	15,1	15,8	16,8	16,9	18,1	20,2	20,4	22,6	27,9	30,1
Errechneter Wert: $\frac{Average - TRITC}{Average - FITC} \times 100\%$	9,7	12,5	23,6	22,5	14,5	13,9	18,7	14,3	22,4	36,8

EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG:

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Unterschrift: