

**Charakterisierung der Immunantwort auf Tumore
nach regionaler Hyperthermie
im Mausmodell des malignen Melanoms**

**Dissertation
zur Erlangung
des akademischen Grades
doctor rerum naturalium**

im Fach Biochemie

**eingereicht am Fachbereich Biologie, Chemie und Pharmazie
der Freien Universität Berlin**

von

Wiebke Wetzel

eingereicht 26. August 2002

Tag der mündlichen Prüfung 24. Februar 2003

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Laboratoriumsmedizin und Pathobiochemie der Charité, Campus Virchow-Klinikum, Humboldt-Universität zu Berlin unter der Anleitung von Dr. R. Geßner und Dr. H. Renz angefertigt.

Das Projekt wurde im Rahmen des Sonderforschungsbereichs 273 und des Graduiertenkollegs 331 der Deutschen Forschungsgemeinschaft bearbeitet.

Gutachter: Prof. Dr. Eckart Köttgen
Institut für Laboratoriumsmedizin und Pathobiochemie
Fachbereich Medizin, Humboldt-Universität zu Berlin

Gutachter: Prof. Dr. Volker Erdmann
Institut für Biochemie
Fachbereich Biologie, Chemie und Pharmazie, Freie Universität Berlin

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Hyperthermie-Therapie von Tumoren	1
1.2	Hitzeschockproteine und Zelltod nach Hyperthermie	3
1.2.1	Hitzeschockproteine als Alarmsignale für antigenpräsentierende Zellen	5
1.3	Immunologische Effekte der Hyperthermie	6
1.3.1	Hitzeschockproteine in der Antigenpräsentation	6
1.3.2	Stimulation einer spezifischen T-Zell-Antwort durch Hitzeschockproteine	7
1.3.3	NK- und $\gamma\delta$ -T-Zellen und Hitzeschockproteine	10
1.4	Hyperthermie-Therapie des malignen Melanoms	12
1.4.1	Das B16-Melanom als experimentelles Melanommodell	13
1.4.2	T-Zell-Antigene des B16 Melanoms	13
1.4.3	Das RMA-Thymom als experimentelles Tumormodell	14
1.5	Mausmodelle der regionalen Hyperthermie	14
1.5.1	Analyse der tumorspezifischen T-Zell-Antwort mittels TRECs	15
1.5.2	Der Mausstamm C57BL/6	16
1.6	Fragestellung	18
2	Material und Methoden	19
2.1	Zelllinien	19
2.2	Mäuse	20
2.3	Tierexperimentelle Methoden	20
2.3.1	Narkose und Sedierung von Mäusen	20
2.3.2	Tumortransplantation in Mäuse	20
2.3.3	Regionale Hyperthermie von Mäusen	21
2.3.4	Immunisierung von Mäusen	21
2.3.5	Intravenöse Injektion von Leukozyten	22
2.3.6	Venöse Blutabnahme	22
2.4	Gewinnung von Leukozyten aus murinen lymphatischen Geweben	23
2.4.1	Isolierung von Leukozyten aus Blut und lymphatischen Organen	23
2.4.2	Isolierung von Dendritischen Zellen aus Vorläuferzellen des Knochenmarks	24
2.5	Funktionelle Analyse von murinen Leukozyten ex vivo	25
2.5.1	Phagozytose von hyperthermierten B16F0-Zellen durch Dendritische Zellen	25
2.5.2	Phagozytoseaktivität der Monozyten des peripheren Bluts und der Lymphknoten	25
2.5.3	Messung der Zell-Proliferation durch die Markierung mit CFSE	26
2.5.4	Messung der Zell-Proliferation mittels T-Zell-Rezeptor Excisionszirkeln	26
2.6	Hyperthermie kultivierter Zellen	27
2.7	Induktion der MHC-Expression bei B16F0	27

2.8	Nachweis der Proteinexpression von Zellen und Geweben	28
2.8.1	Immunfärbung für die Durchflußzytometrie	28
2.8.2	Durchflußzytometrie (fluorescence activated cell scanning = FACS)	29
2.8.3	Immunfluoreszenznachweis von Proteinen bei kultivierten Zellen	30
2.8.4	Herstellung von Zellysaten für Western Blots	31
2.8.5	Einengung von Zellkulturüberständen zum Nachweis freigesetzter Proteine	32
2.8.6	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)	32
2.8.7	Coomassie-Färbung von Proteinen in Polyacrylamidgelen	33
2.8.8	Silbernitrat-Färbung von Proteinen in Polyacrylamidgelen	33
2.8.9	Transfer von Proteinen auf Nitrozellulose-Membran	34
2.8.10	Ponceau-Färbung von Proteinen auf Nitrozellulose-Membran	34
2.8.11	Immunfärbung von Proteinen auf Nitrozellulose-Membran	34
2.8.12	Mehrfache Verwendung von Western Blots	36
2.9	Nachweis der RNA-Expression bei Zellen und Geweben	36
2.9.1	Isolierung von Gesamt-RNA mit Trizol	36
2.9.2	Auftrennung von RNA in denaturierenden Formalin-Gelen	37
2.9.3	Reverse Transkription von mRNA in cDNA	38
2.10	PCR von cDNA	39
2.10.1	Quantitative PCR von cDNA	39
2.10.2	Klonierung und Sequenzierung der PCR-Produkte	41
2.11	Histologie und Immunhistologie von Gewebeschnitten	42
2.11.1	Hämatoxylin/Eosin- und immunhistologische Färbung von Kryoschnitten	42
3	Ergebnisse	45
3.1	Freisetzung von Hitzeschockproteinen nach Hyperthermie	45
3.1.1	Hyperthermie-induzierter Zelltod von B16F0-Zellen in vitro	45
3.1.2	Expression und Freisetzung von Hitzeschockproteinen	48
3.1.3	Phagozytose von Fragmenten hyperthermierter B16-Zellen durch DC	50
3.2	Entwicklung und Charakterisierung eines Mausmodells der regionalen HT	52
3.2.1	Entwicklung des Mausmodells	52
3.2.2	Histologie und Leukozyteninfiltration von B16F0-Tumoren	54
3.2.3	Leukozytendifferenzierung in den regionalen Lymphknoten nach HT	58
3.2.4	Phagozytoseaktivität der Monozyten im Blut	58
3.2.5	MHC II-Präsentation und B16F0-spezifische Antikörper nach Hyperthermie	59
3.2.6	Analyse der T-Zell-Proliferaion mittels CFSE	60
3.2.7	T-Zell-Rezeptor Exzisionszirkel (TREC) als Marker für die T-Zell Proliferation	63
3.3	Antigenpräsentation nach Hyperthermie	68
3.3.1	Expression Melanom-assoziiertes T-Zell-Antigens bei B16F0 nach Hyperthermie	68
3.3.2	TAP-Expression nach Hyperthermie	73
3.3.3	MHC I-Expression nach Hyperthermie	73
3.4	Expression von Markern für NK-Zellen und $\gamma\delta$ T-Zellen nach Hyperthermie	77
4	Diskussion	80
4.1	Freisetzung von Hitzeschockproteinen nach Hyperthermie	80

4.1.1	Hyperthermie-induzierter Zelltod von B16F0-Zellen und -Tumoren	80
4.1.2	Expression der Hitzeschockproteine HSP 72 und GP 96 nach Hyperthermie	81
4.1.3	Phagozytose von hyperthermierten B16F0-Zellen durch Dendritische Zellen	83
4.2	Charakterisierung eines Mausmodells der regionalen Hyperthermie	84
4.2.1	Entwicklung des Mausmodells	84
4.2.2	Histologie und Leukozyteninfiltration des Tumors nach Hyperthermie	85
4.2.3	Leukozytendifferenzierung in den regionalen Lymphknoten nach Hyperthermie	86
4.2.4	Phagozytoseaktivität der Monozyten im peripheren Blut	87
4.2.5	MHC II Präsentation und B16-spezifische Antikörper nach Hyperthermie	87
4.2.6	Analyse der T-Zell-Proliferation mittels CFSE	88
4.2.7	T-Zell-Rezeptor Excisionszirkel (TREC) als Marker für die T-Zell Proliferation	89
4.3	Antigenpräsentation nach Hyperthermie	91
4.3.1	Proteasomale Degradation von Tyrosinase bei B16F0 nach Hyperthermie	91
4.3.2	TAP-Expression nach Hyperthermie	93
4.3.3	MHC I-Expression nach Hyperthermie	95
4.4	Expression von Markern für NK-Zellen und $\gamma\delta$ T-Zellen nach HT	99
5	Zusammenfassung und Ausblick	101
6	Literatur	104
7	Anhang 116	
7.1	Abbildungsverzeichnis	116
7.2	Tabellenverzeichnis	117
7.3	Eigene Veröffentlichungen	118
7.4	Curriculum vitae	119
7.5	Danksagung	120

Abkürzungsverzeichnis

ADCC	Antikörper-abhängige zelluläre Zytotoxizitätsreaktion (antibody dependent cellular cytotoxicity)
AP	Alkalische Phosphatase
APC	antigenpräsentierende Zelle
Bp	Basenpaare
BCA	Bichinonsäure
BSA	Bovines Serumalbumin
β-ME	β-Mercaptoethanol
β2-MG	β2-Mikroglobulin
CD	Oberflächenantigene von Leukozyten (cluster of differentiation)
CFDA-SE	Carboxyfluoresceindiacetat-Succinimidylester
CFSE	Carboxyfluoresceinsuccinimidylester
ConA	Concanavalin A
DC	Dendritische Zelle
DMEM	Dulbecco's modified eagle medium (Zellkulturmedium)
DMSO	Dimethylsulfoxid
ER	endoplasmatisches Retikulum
FBS	Fötales Rinderserum (fetal bovine serum)
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
g	Erdbeschleunigung
GM-CSF	granulocyte/macrophage coloniestimulating factor
GP	Glycoprotein
GP 96	Hitzeschockprotein, (GRP 94)
h	Stunden
HRP	Merrettich Peroxidase (hoeseradish peroxidase)
HSP	Hitzeschockprotein
HSP 72	induzierbares Protein der HSP 70-Familie (HSP 70i, HSP 70)
HSP 73	konstitutiv exprimiertes Protein der HSP 70-Familie (HSC 70)
HT	Hyperthermie
IFN	Interferon
IL	Interleukin

kD	Kilodalton
LPS	Lipopolysaccharide
M	Molar (mol pro Liter)
mA	Milliampere
mAk	monoklonaler Antikörper
MHC	major histocompatibility complex
min	Minuten
MOPS	3-(N-Morpholino)Propansulfonsäure
PAGE	Polyacrylamidgel-Elektrophorese
PBS	Phosphat-gepufferte isotone Salzlösung
RPMI 1640	Zellkulturmedium
RT	Reverse Transkription
SAv	Streptavidin
SDS	Natriumdodecylsulfat
TAP	Transporter assoziiert mit Antigenpräsentation
TBS	Tris-gepufferte isotone Salzlösung
Temed	N,N,N',N'-Tetramethy-Ethylendiamin
TNF	Tumornekrosefaktor
TREC	T-Zell-Rezeptor-Exzissionszirkel
Toll-ähnliche Rezeptoren	„toll“ ist keine Abkürzung, sondern entstammt dem Deutschen. Drosophila-Forscher fanden ein Gen so erstaunlich, eben „toll“, daß sie es auch so benannten. Bei Säugern heißen die homologen Proteine daher toll-like-receptors.
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
Tween 20	Polyoxyethylensorbitanmonolaurat
U	Einheiten (units)
UV	Ultraviolett