

# 1 Einleitung

*Quae medicamenta non sanat, ferrum sanat. Quae ferrum non sanat, ignis sanat. Quae vero ignis non sanat, insanabilia reportari oportet.*

*(Jene, die durch Medikamente nicht geheilt werden, werden durch das Skalpell geheilt. Jene, die durch das Skalpell nicht geheilt werden, werden durch Hitze geheilt. Jene, die die Hitze nicht heilt, müssen als unheilbar betrachtet werden.)*

*Hippocrates (zitiert nach (Hobohm 2001))*

## 1.1 Hyperthermie-Therapie von Tumoren

Schon früh wurde erkannt, daß starkes Fieber zur Regression von Tumoren führen kann. Der französische Arzt Deidier stellte Anfang des 18. Jahrhunderts fest, daß bei Syphilis-Patienten häufiger von Tumoren geheilt werden konnten und daß bei Syphilis-infizierten Prostituierten seltener Tumore auftraten (Hobohm 2001). Diesen Effekt, der dem Auftreten starken Fiebers zugeschrieben wurde, suchte der Berliner Arzt Busch 1868 auszunutzen, als er eine Patientin mit einem Sarkom des Nackenbereiches mit *Streptococcus pyogenes* infizierte (Busch 1868). Er erreichte ein Teilremission, konnte jedoch das Tumorwachstum langfristig nicht aufhalten. W. Coley behandelte zur Jahrhundertwende 210 Patienten mit Sarkomen im Endstadium mit einer Vakzine aus hitzeinaktivierten *Streptococcus pyogenes* und *Serratia marcescens* und heilte 60 Patienten, welche in der Folge der Therapie mindestens 10 Jahre tumorfrei waren (Hobohm 2001). Die Induktion von hohem Fieber durch Pyrogene war jedoch riskant und an Nebenwirkungen. Die Fortschritte in der Chirurgie und der Chemoradiotherapie von Tumoren führten daher dazu, daß die Therapie von Tumoren auf diesem Weg immer seltener versucht wurde. Doch trotz aller Entwicklungen in der Chirurgie, der Chemo- und der Radiotherapie wurde in den letzten 100 Jahren keine Verbesserung der durchschnittlichen Überlebenszeit von Patienten mit Nieren-, Mamma- und der Ovarialcarcinomen, sowie mit Sarkomen gegenüber der Therapie von Coley erreicht (Hobohm 2001). Daher gibt es inzwischen wieder verstärkte Anstrengungen, Hyperthermie in der Behandlung von Tumoren dieser und anderer Tumorentitäten einzusetzen.

Bei der Anwendung von Hyperthermie unterscheidet man heute grundsätzlich drei Therapieformen. Bei der Ganzkörper-Hyperthermie wird die systemische Temperatur des

Patienten wie bei W. Busch und W. Coley durch Pyrogene oder äußere Applikation von Hitze im Dampfbad oder durch Infrarotstrahlen auf bis zu 42°C angehoben. Bei der regionalen oder lokalen Hyperthermie wird nur das Areal des Tumors erwärmt. Dies geschieht durch fokussierte elektromagnetische Strahlung im Gigaherzbereich oder nach Injektion magnetischer Partikel oder Flüssigkeiten im Magnetwechselfeld. Bei lokaler Hyperthermie können im Bereich des Tumors bis zu 45°C erreicht werden. Bei Tumoren einer Extremität, die entweder zu groß für die lokale Hyperthermie sind, oder die bereits in die efferenten Lymphbahnen metastasiert haben, kann die gesamte Extremität hyperthermiert werden. Sie wird vom Körperkreislauf abgekoppelt und über eine Herz-Lungen-Maschine unter Zugabe hoch dosierter Chemotherapeutika hypertherm perfundiert. Das Perfusat wird anschließend soweit möglich aus der Extremität gespült, bevor diese wieder an den Kreislauf angeschlossen wird.

Regionale Hyperthermie wird bei Patienten derzeit nur in Kombination mit Radio- oder Chemotherapie angewandt, da die Wirkung bei alleiniger Anwendung der Hyperthermie umstritten ist. Auch negative Effekte der alleinigen Hyperthermie-Therapie, wie eine verstärkte Metastasierung, werden diskutiert (Nathanson, Haas et al. 1987; Nathanson, Nelson et al. 1991). Regionale Hyperthermie wirkt synergistisch mit einigen häufig eingesetzten Chemotherapeutika (Takahashi, Emi et al. 2002). Sie erhöht die Durchblutung des behandelten Tumors, sowie die Stoffwechselaktivität der Zellen. So wird die Zugänglichkeit des Tumors für Chemotherapeutika verbessert. Zudem erhöht Hyperthermie die intrazelluläre Konzentration einiger Chemotherapeutika (Takahashi, Emi et al. 2002). Es besteht jedoch bei einer Hyperthermie-Behandlung die Gefahr der Resistenz gegen einige Chemotherapeutika (MDR = multi drug resistance), da das Gen für das MDR-induzierende Protein MDR 1 ein Hitzeschockelement im Promotor aufweist (Stein, Rau et al. 1999). In einer klinischen Studie konnte jedoch keine erhöhte MD-Resistenz nach Hyperthermie beobachtet werden (Stein, Rau et al. 1999). Bei bereits MD-resistenten Zelllinien ist die Temperatursensitivität gegenüber den parentalen Zelllinien erniedrigt (Lage, Jordan et al. 2000). Die MD-Resistenz von Tumorzelllinien kann durch Hyperthermie durchbrochen werden (Liu, Lillehei et al. 2001). Auch Hyperthermie und Radiotherapie wirken bei den meisten Tumorzelllinien, unter anderem dem murinen B16-Melanom synergistisch (Wahl, Brustad et al. 1979). Hyperthermie inhibiert die DNA-Reperatur nach Radiotherapie durch Denaturierung einer Untereinheit der DNA-abhängigen Proteinkinase (Matsumoto, Suzuki et

al. 1997. Zudem schädigt sie auch jenen Teil der Tumorzellen eines soliden Tumores, die sich nicht in der Zellteilung befinden, sondern hypoxisch oder pränekrotisch und so resistent gegen Radiotherapie sind und die den größten Teil des Tumors ausmachen (Dietzel 1983).

Bei verschiedenen Tumorentitäten gibt es keine wirksame Chemo- oder Radiotherapie. Mit Hilfe der in den letzten Jahren entwickelten immunologischen Therapien kann man zwar häufig eine tumorspezifische Immunstimulation erreichen, jedoch nur in Einzelfällen eine vollständige oder teilweise Remission des Tumors. In diesen Fällen wird eine Kombination von Hyperthermie und Immuntherapie diskutiert. Dieser Ansatz wird durch eine Vielzahl von Publikationen gestützt, die immunologische Wirkungen der der Hyperthermie-induzierten Hitzeschockproteine und des durch Streß ausgelösten Zelltods nachweisen.

## **1.2 Hitzeschockproteine und Zelltod nach Hyperthermie**

Hyperthermie führt im Tumor zum vermehrten Zelltod. Tumore sind meist hitzesensitiver, als gesunde Gewebe. Wie bereits Otto Warburg in den 30er Jahren feststellte, betreiben Tumorzellen zur ATP-Synthese anaerobe Glycolyse, die zur Anreicherung von Lactat führt. Ursache ist vermutlich die bei Tumoren häufig auftretende Hypoxie (Harris 2002, aber auch die oft durch die hohe Zellteilungsrate erniedrigte Zahl von Mitochondrien in Tumorzellen (Stubbs, McSheehy et al. 2000). Dennoch bleibt der intrazelluläre pH von Tumoren neutral oder leicht alkalisch, während der extrazelluläre pH sinkt (Stubbs, McSheehy et al. 2000). Der erniedrigte extrazelluläre pH erhöht die Hitzesensitivität von Tumorzellen und dadurch den Zelltod nach Hyperthermie (Zolzer and Streffer 1999; Ohtsubo, Park et al. 2000; Ohtsubo, Igawa et al. 2001).

Um sich bei hyperthermem oder anderem Streß gegen Zellschädigungen zu schützen, exprimieren alle prokaryonten und eukaryonten Zellen Hitzeschockproteine, auch Streßproteine genannt. Sie sind phylogenetisch stark konservierte Proteine, die in nahezu allen Zellkompartimenten vorhanden sind. Die Transkription einiger Hitzeschockproteine ist durch Streß wie Hitze oder chemische Agenzien induzierbar, während andere konstitutiv exprimiert werden. Verschiedene Hitzeschockproteine stabilisieren als Chaperone die Konformation hitzegeschädigter Proteine und helfen bei ihrer Renaturierung, während andere irreversibel geschädigte Proteine für die Degradation durch Proteasomen markieren. Durch ihre Funktion als Chaperone bewahren Hitzeschockproteine bei Hyperthermie einen großen Teil der Tumorzellen vor dem Zelltod, solange nicht eine sehr hohe Hyperthermie-

Temperatur zur vollständigen Degradation aller zellulären Proteine und Membranen und so zum Zusammenbruch der Zellfunktionen führt (zusammenfassend dargestellt in Garrido, Gurbuxani et al. 2001). Es gibt Hinweise, daß Hitzeschockproteine direkt manche Schritte der Apoptose inhibieren und so die Zellen vor dem Tod bewahren (Dressel, Elsner et al. 2000). In HSP 72-defizienten Tumorzellen kann Hitzeschock eine Resistenz gegen die Lyse durch zytotoxische T-Zellen auslösen, die wahrscheinlich auf einer Interaktion von HSP 72 mit Proteinen des Granzym/Perforin-Weges der Apoptose-Induktion beruht (Dressel, Elsner et al. 2000). Die Resistenz kann durch Elektroporation der Zellen mit HSP 72 vor der Applikation des Hitzeschocks durchbrochen werden. Das Hitzeschockprotein HSP 60, welches in den Mitochondrien lokalisiert ist, wirkt als einziges bekanntes Hitzeschockprotein proapoptotisch (Garrido, Gurbuxani et al. 2001).

Tritt statt des apoptotischen der nekrotische Zelltod ein, lysieren die Zellen und die intrazellulären Proteine werden freigesetzt. Apoptotischer Zelltod hingegen hat die Zerlegung der Zellen in apoptotische Körperchen zur Folge. Daher gelangen bei der Apoptose die intrazellulären zunächst kaum Proteine in den extrazellulären Raum. Stirbt eine große Zahl von Tumorzellen apoptotisch, so können Makrophagen die entstehenden apoptotischen Körperchen nicht schnell genug entfernen. In diesem Fall können die apoptotischen Körperchen lysieren. Man spricht in diesem Fall auch von einer sekundären Nekrose (Gough, Melcher et al. 2001). Es gibt also keine klare Trennung zwischen apoptotischem und nekrotischem Zelltod und auch Apoptose kann zur Freisetzung von intrazellulären Proteinen der sterbenden Zellen führen.

Während des nekrotischen Zelltods kann auch ohne Hyperthermie die Expression von Hitzeschockproteinen steigen, so daß beim Tod der Zelle Hitzeschockproteine freigesetzt werden (Melcher, Todryk et al. 1998). Nicht so beim apoptotischen Zelltod. Werden jedoch Tumorzellen vor der Induktion von Apoptose mittels Hitzeschock gestreßt und werden mit diesen apoptotischen Tumorzellen Mäuse vakziniert, so sind die Tiere bei späterer Injektion des Tumors gegen diesen geschützt (Feng, Zeng et al. 2001). Beim Hyperthermie-induzierten Zelltod bilden die Zellen in jedem Fall Hitzeschockproteine. Die Fähigkeit, Hitzeschockproteine zu bilden, kann bei in vitro kultivierten Zellen für einzelne Hitzeschockproteine verloren gehen Dressel, Elsner et al. 2000, ist in vivo jedoch noch nicht beschrieben worden. Die Bildung von Hitzeschockproteinen unmittelbar vor Eintreten des

Zelltods ist in der Tumorummunologie von großem Interesse, da Hitzeschockproteine vielfältige immunologische Wirkung haben. Diese werden im Folgenden beschrieben.

### ***1.2.1 Hitzeschockproteine als Alarmsignale für antigenpräsentierende Zellen***

Hitzeschockproteine haben neben ihrer protektiven Funktion auch immunstimulatorische Effekte. Einige Hitzeschockproteine dienen als Zytokine, die antigenpräsentierende Zellen aktivieren. HSP 72 kann in Monozyten die Bildung der proinflammatorischen Zytokine  $\text{TNF}\alpha$ , IL-1 $\beta$  und IL-6 induzieren (Asea, Kraeft et al. 2000). Nach Stimulation mit GP 96 sekretieren Makrophagen und Dendritische Zellen das ebenfalls proinflammatorische Stickstoffmonoxid (Panjwani, Popova et al. 2002). In Tumoren von HSP 72 transfizierten B16-Zellen können GM-CSF, ein Wachstumsfaktor für Antigenpräsentierende Zellen, der T-Zell-Wachstumsfaktor IL-2 und die TH 1-Zytokine, IL-12 und  $\text{IFN}\gamma$  nachgewiesen werden, während in Tumoren der B16-Wildtypzellen nur geringe Mengen IL-2 zu finden sind (Todryk, Melcher et al. 1999). Auch HSP 60 stimuliert Makrophagen zur Sekretion der proinflammatorischen Zytokine IL-12 und  $\text{TNF}\alpha$  (Chen, Syldath et al. 1999). Ein Protein der HSP 70-Familie und GP 96 stimulieren auch ohne Zugabe von Antigen T-Zellen, die in Kontakt mit Dendritischen Zellen sind (Breloer, Fleischer et al. 1999). Da Hitzeschockproteine aufgrund ihrer zytoplasmatischen Lokalisation oder ihrer ER-Retentionssequenz nicht sekretiert werden, werden sie vermutlich nur durch den Tod von Zellen freigesetzt. Ihre Zytokin-Wirkung wird daher als Alarmsignal betrachtet (Todryk, Melcher et al. 2000). Fehlt ein solches Alarmsignal, das auch durch bakterielle Lipopolysaccharide und andere Substanzen gegeben werden kann, so bleiben die Antigenpräsentierenden Zellen unreif und sind nicht in der Lage, T-Zellen zu aktivieren. Der Tod von Zellen, der nicht zur Freisetzung von Proteinen mit Alarmsignalfunktion führt, ist demzufolge immunologisch folgenlos. Die Alarmsignale ermöglichen dem Immunsystem so, bei fremden Antigenen zwischen gefährlich und ungefährlich zu unterscheiden. Die Wirkung von Hitzeschockproteinen als Alarmsignal ist in Abbildung 1 zusammenfassend schematisch dargestellt.

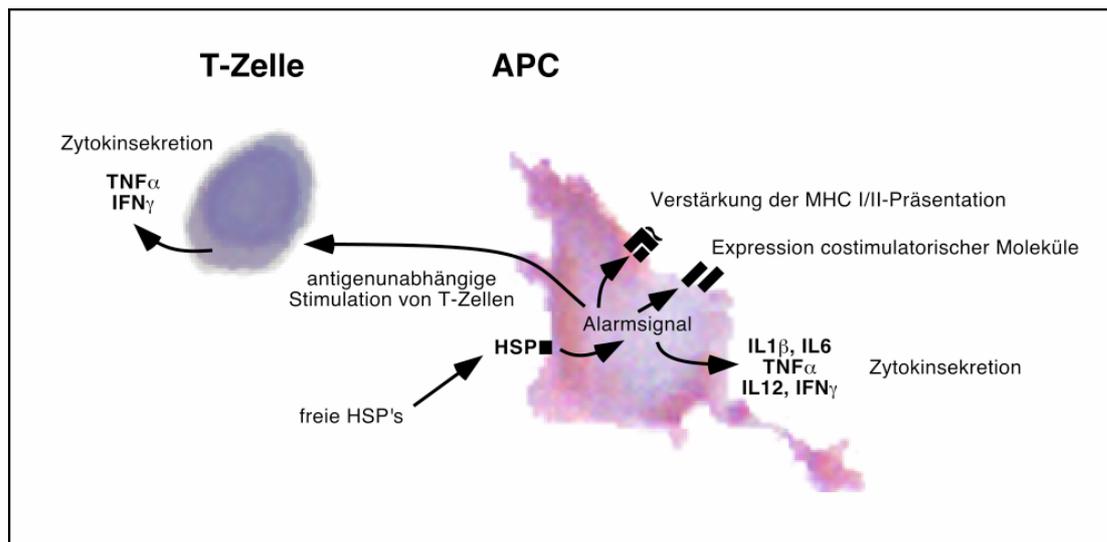


Abbildung 1: Hitzeschockproteine als Alarmsignal für antigenpräsentierende Zellen

### 1.3 Immunologische Effekte der Hyperthermie

#### 1.3.1 Hitzeschockproteine in der Antigenpräsentation

Manche Hitzeschockproteine werden konstitutiv exprimiert und haben als Chaperone eine entscheidende Funktion bei der Stimulation spezifischer T-Zell-Antworten auf Tumore. T-Zell-Antigene sind Peptide aus 7-9 Aminosäuren, die im Komplex mit der MHC I $\alpha$ -Kette und  $\beta_2$ -Mikroglobulin vorliegen. Die Peptide entstehen durch proteasomalen Abbau zellulärer Proteine, welche zuvor mittels des Hitzeschockproteins Ubiquitin für den Abbau markiert wurden. Die Bindung von Ubiquitin an degenerierte Proteine ist HSP 73-abhängig (Bercovich, Stancovski et al. 1997; Fisher, Zhou et al. 1997). Für die Generierung antigener Peptide muß das Proteasom die Untereinheiten LMP 2 und LMP 7 (beide im MHC Locus codiert, LMP = low molecular weight polypeptide), sowie LMP 10 (außerhalb des MHC Locus codiert) enthalten. Die entstandenen Peptide werden über den TAP-Transporter in das Endoplasmatische Retikulum gebracht, wo sie über Tapasin an MHC I übergeben werden. Beim Transport der Peptide vom Proteasom zum TAP-Transporter könnten Hitzeschockproteine der HSP 70-Familie beteiligt sein (Srivastava, Udono et al. 1994). Das im endoplasmatischen Retikulum lokalisierte GP 96 bindet vermutlich überzählige Peptide oder Peptide, die nicht dem MHC I-Bindungsmuster entsprechen (Lammert, Arnold et al. 1997), aber auch eine Rolle in der Bindung der Peptide an die MHC I $\alpha$ -Kette wird vermutet,

so z.B. der Schutz der Peptide durch Degradation oder Verhinderung der Sekretion (Srivastava, Udono et al. 1994; Boehm, Klamp et al. 1997). Der Komplex aus der MHC  $\alpha$ -Kette und  $\beta_2$ -Mikroglobulin wird bis zur Bindung eines Peptides durch zwei weitere Hitzeschockproteine stabilisiert. (Calnexin und Calreticulin). Der vollständige Komplex aus MHC  $\alpha$ -Kette,  $\beta_2$ -Mikroglobulin und Peptid wird über das Golgi-Netzwerk auf die Zellmembran transportiert und dient dort als Erkennungssignal für peptidspezifische T-Zellen. Etwa 20-35 % der MHC I-Komplexe einer Zelle werden stündlich reinternalisiert und in das Trans-Golgi-Netzwerk geschafft (Dasgupta, Watkins et al. 1988). Im sauren Milieu der Endosomen dissoziieren das gebundene Peptid und  $\beta_2$ -Mikroglobulin ab und die  $\alpha$ -Kette kann vermutlich neu mit Peptid beladen werden (Hochman, Jiang et al. 1991; Gromme, Uytdehaag et al. 1999). Es ist unklar, ob alle Zellen MHC I-Komplexe wiederverwerten, oder ob es sich auf wenige Zellen beschränkt.

### ***1.3.2 Stimulation einer spezifischen T-Zell-Antwort durch Hitzeschockproteine***

Die Suche nach Proteinen aus Tumorzellen, die bei Vakzination von Mäusen Immunität gegen den Tumor vermitteln, aus dem sie gewonnen wurden, führte zur Charakterisierung einiger Hitzeschockproteine als Tumorantigene. Bedeutsam sind in diesem Zusammenhang vor allem drei Familien der Hitzeschockproteine: die HSP 60-, die HSP 70- und die HSP 90-Familie. Das konstitutiv exprimierte HSP 73 (Synonym HSC 70), das streßinduzierbare HSP 72 (Synonyme HSP 70 und HSP 70i) und HSP 90 sind zytosolische Proteine, während GP 96 (Synonym GRP 94) ein Protein der HSP 90-Familie aus dem endoplasmatischen Retikulum stammt. HSP 60 ist in den Mitochondrien lokalisiert und kann während Inflammation und Wundheilung auf der Zellmembran gefunden werden (Chen, Syldath et al. 1999). Auch HSP 70 hom, ein Protein der HSP 70-Familie, ist mitochondrial lokalisiert.

Aufgrund der Tumorspezifität der Immunantwort nach Vakzination mit aufgereinigten Hitzeschockproteinen wurde zunächst vermutet, daß diese Proteine im Tumor häufig mutiert sind. Bei Vergleichen der cDNA-Sequenzen von Zellen verschiedener Tumorklinien und normalen Gewebezellen wurden im hsp 73 Gen tatsächlich Tumor-assoziierte Mutationen gefunden (Chouchane, Ahmed et al. 1997; Mestiri, Bouaouina et al. 2001). Allerdings waren Mutationen viel zu selten, um generell eine tumorspezifische Immunität zu erklären. Bei der Suche nach niedermolekularen, an Hitzeschockproteine gebundenen Substanzen fand man eine Vielzahl von immunogenen Peptiden verschiedener Länge. Sowohl HSP 72 und HSP 73,

als auch HSP 90 und GP 96 binden *in vivo* (Arnold, Faath et al. 1995; Breloer, Marti et al. 1998; Ishii, Udono et al. 1999) und *in vitro* (Blachere, Li et al. 1997) Peptide verschiedener Länge unabhängig von ihrer Sequenz, ohne daß Anker-Reste an bestimmten Positionen des Peptides vorliegen müssen. Die Hitzeschockproteine beider Familien besitzen eine dem MHC I vergleichbare Peptidbindungstasche (Rippmann, Taylor et al. 1991; Linderoth, Popowicz et al. 2000). Einer der bekannten Polymorphismen des HSP 70 hom-Gens, der in der Peptidbindungstasche zum Austausch eines Methionins gegen ein Threonin führt und so die Peptidbindungseigenschaften des HSP 70 hom-Proteins verändert, tritt bei Tumoren gehäuft auf (Chouchane, Ahmed et al. 1997).

Immunisierung von Mäusen und Menschen mit HSP 73, GP 96 und anderen Hitzeschockproteine mit gebundenen Peptiden führt zur Aktivierung Peptid-spezifischer zytotoxischer T-Zellen (Udono and Srivastava 1993; Arnold, Faath et al. 1995; Blachere, Li et al. 1997). Die Hitzeschockproteine werden über Rezeptoren, aber auch über Pinoytose von Antigenpräsentierenden Zellen aufgenommen (Wassenberg, Dezfulian et al. 1999). Als Rezeptor für GP 96 ist der  $\alpha$ 2-Makroglobulin-Rezeptor CD91 bekannt (Binder, Han et al. 2000), während für HSP 72 und HSP 73 noch kein Rezeptor gefunden wurde. Der LPS-Rezeptor CD 14 fungiert als Corezeptor für HSP 72 und HSP 73 (Asea, Kraeft et al. 2000). Auch die Toll-ähnlichen Rezeptoren (toll-like receptors), die Pathogen-assoziierte Moleküle wie Lektine erkennen, sind an der Bindung und von GP 96 und der anschließenden Signaltransduktion beteiligt. Lysate von HSP 72 transfizierten Zellen werden von Dendritischen Zellen stärker phagozytiert, als die Lysate der parentalen Zelllinie (Todryk, Melcher et al. 1999). Bereits nach 2 Stunden Inkubation der Dendritischen Zellen mit markierten Lysaten kann aufgenommenes HSP 72 in den Zellen nachgewiesen werden. Zugleich differenzieren sich die antigenpräsentierenden Zellen nach Phagozytose von HSPs von unreifen Zellen mit starker Phagozytoseaktivität zu reifen Zellen mit hoher MHC-Expression und costimulatorischer Aktivität (Singh-Jasuja, Scherer et al. 2000).

Die mit den Hitzeschockproteinen assoziierten Peptide werden von den antigenpräsentierenden Zellen in den MHC I-Weg der Antigenpräsentation eingeschleust (auch crosspriming genannt). Dieser Weg des Crosspriming nach der Phagozytose von Hitzeschockproteinen ist vor allem durch die Arbeitsgruppe von Srivastava mehrfach beschrieben worden (Suto and Srivastava 1995). Dendritische Zellen sind in der Lage, peptidspezifische T-Zellen zu aktivieren. Tumorzellen hingegen fehlen meist die

costimulatorischen Moleküle, die dabei als zweites Signal neben der Peptidpräsentation durch MHC I-Komplexe dienen. Findet die Peptidpräsentation ohne Costimulation statt, werden die naiven T-Zellen nicht aktiviert, sondern in Anergie versetzt. Das crosspriming und die Aktivierung von T-Zellen durch Dendritische Zellen nach Hyperthermie ist schematisch in Abbildung 2 dargestellt.

Aufgrund der bekannten Daten wird allgemein postuliert, daß nach Hyperthermie von Tumoren antigene Peptide an Hitzeschockproteine komplexiert und durch den Tod einzelner Tumorzellen freigesetzt werden. Über das Crosspriming könnten so in Folge einer Hyperthermie-Therapie tumorspezifische zytotoxische T-Zellen aktiviert werden.

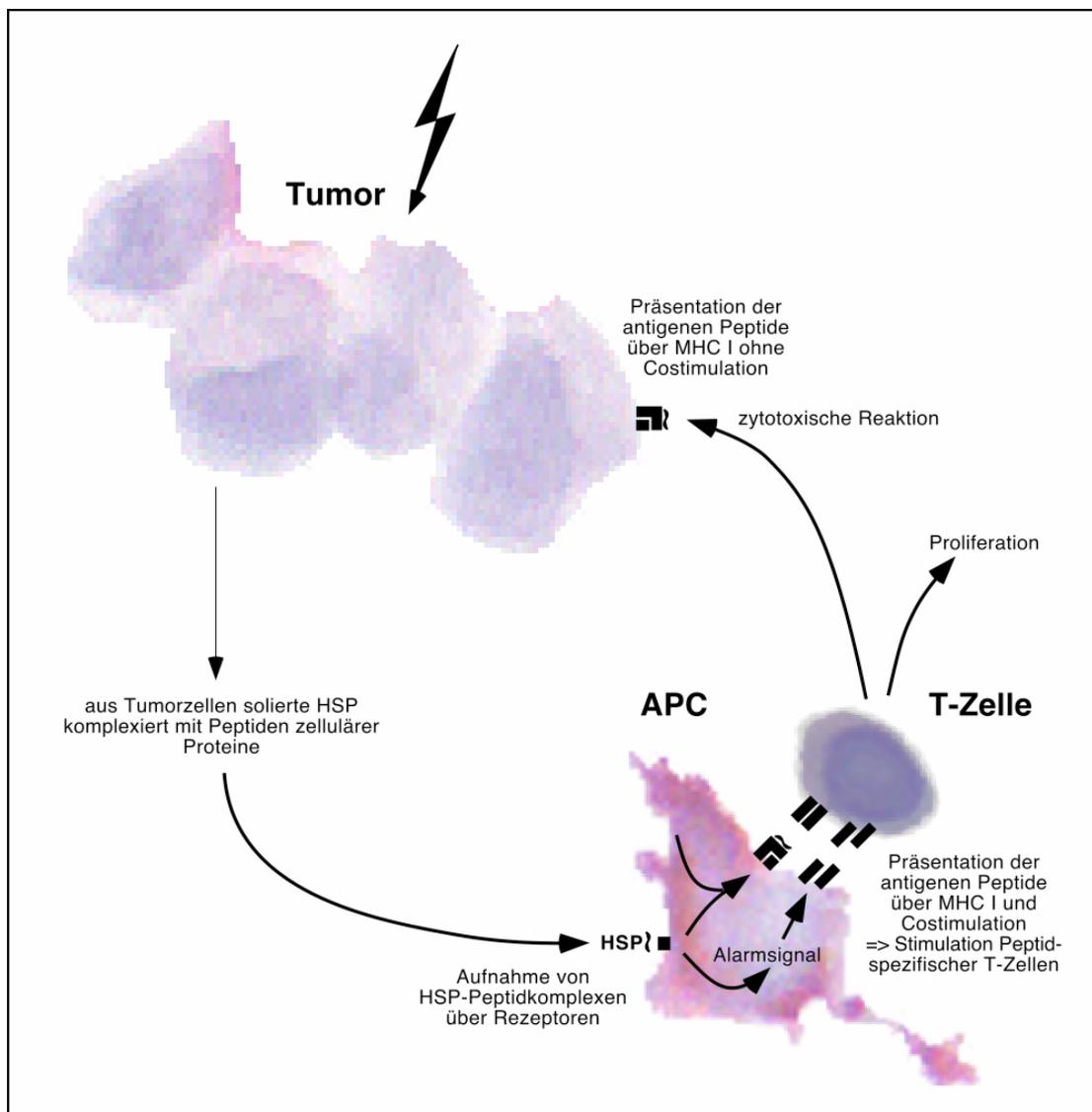


Abbildung 2: Crosspriming

Aufnahme von Hitzeschockprotein-Peptid-Komplexen, Präsentation der Peptide über MHC I-Komplexe und Aktivierung tumorspezifischer T-Zellen durch Dendritische Zellen.

### **1.3.3 NK- und $\gamma\delta$ -T-Zellen und Hitzeschockproteine**

Doch nicht nur der Transport antigener Peptide zu Antigenpräsentierenden Zellen, sondern auch die direkte Präsentation von Peptiden durch Hitzeschockproteine ist bekannt. Hitzeschockproteine der HSP 60-, der HSP 70- und der HSP 90-Familie können bei verschiedenen Tumorzelllinien auf der Oberfläche nachgewiesen werden, obwohl sie eine ER-Retentionssequenz und keine Transmembrandomäne besitzen (Ferrarini, Heltai et al. 1992; Kim, Nelson et al. 1995; Altmeyer, Maki et al. 1996; Multhoff 1997; Multhoff, Botzler et al. 1997; Robert, Menoret et al. 1999). Das im Endoplasmatischen Retikulum lokalisierte GP 96 hat eine Retentionsequenz, welche den Transport zur Zellmembran über Golgi-Vesikel verhindern sollte. Es wird vermutet, daß die Proteine über ein Membranprotein verankert sind (G.Multhof, persönliche Mitteilung) oder als Bestandteil eines Proteinkomplexes auf die Membran gelangen (Altmeyer, Maki et al. 1996). Durch Epitopkartierung des humanen HSP 72 in der Membran von Colocarcinomzellen wurde gezeigt, daß die C-terminale Peptid/Protein-Bindungsdomäne für Antikörper zugänglich ist, während die N-terminale ATPase-Domäne verdeckt ist (Botzler, Li et al. 1998). Membranär exprimierte Hitzeschockproteine der HSP 70-Familie, die tumorspezifische Peptide binden, werden von peptidspezifischen  $\gamma\delta$ -T-Zellen erkannt, die daraufhin die präsentierende Zelle lysieren (Kim, Nelson et al. 1995, Wei, Zhao et al. 1996). Auch Hitzeschockproteine der HSP 60-Familie werden auf der Oberfläche von Tumorzellen exprimiert und von  $\gamma\delta$ -T-Zellen erkannt (Laad, Thomas et al. 1999; Thomas, Samant et al. 2000). Es ist jedoch nicht bekannt, ob auch durch HSP 60 Peptide an die  $\gamma\delta$ -T-Zellen präsentiert werden.

Membranär exprimierte Hitzeschockproteine können neben  $\gamma\delta$ -T-Zellen auch NK-Zellen stimulieren. Nach nicht-lethaler Hyperthermie von humanen K 562-Zellen (Zellen einer chronisch myelogenen Leukämie des Knochenmarks), humanen Ewings Sarkom-Zellen und humanen CX2 Colocarcinomzellen konnte das hitzeinduzierbare HSP 72 auf der Zelloberfläche nachgewiesen werden (Multhoff 1997; Multhoff, Botzler et al. 1997). Die HSP 72-Expression induzierte eine HSP 72- und CD 94-abhängige Lyse der Tumorzellen durch IL 2-aktivierte NK-Zellen (Multhoff, Botzler et al. 1997; Multhoff, Mizzen et al. 1999). Das von NK-Zellen exprimierte CD 94 ist an der Bindung an HSP 72 beteiligt. CD 94 zählt zu den inhibitorischen Rezeptoren von NK-Zellen. Nach Stimulation mit HSP 72 proliferieren NK-Zellen und sekretieren verstärkt  $\text{IFN}\gamma$  (Multhoff, Mizzen et al. 1999). HSP 72 stimuliert zudem die Expression von CD 16 ( $\text{Fc}\gamma\text{RIIIA}$ ), CD 57 (Funktion

unbekannt) und CD 94 auf NK-Zellen (Multhoff, Mizzen et al. 1999). Es ist weiterhin bekannt, daß NK-Zellen an HSP 72-beschichtete Oberflächen adhären (Multhoff, Mizzen et al. 1999).

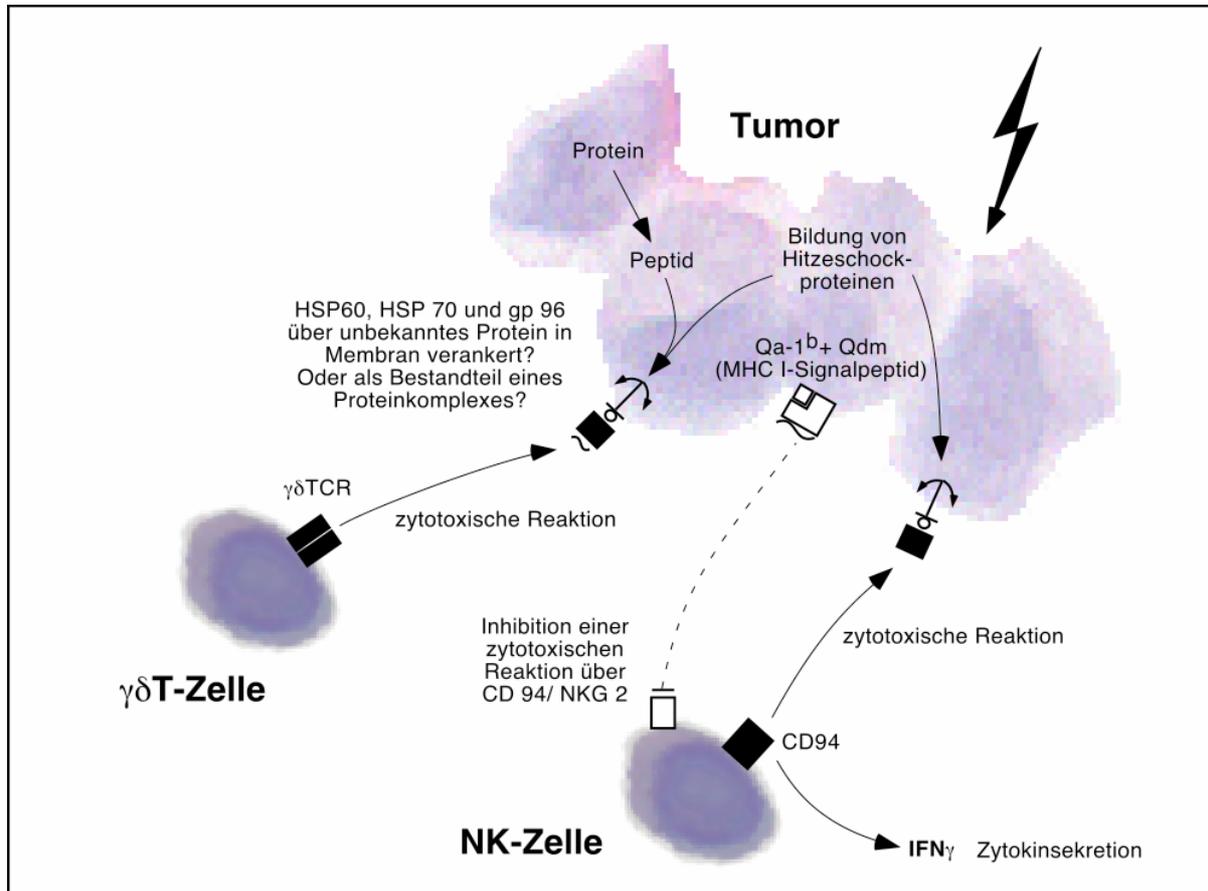


Abbildung 3: Tumorzellerkennung durch NK- und  $\gamma\delta$ -T-Zellen nach Hyperthermie

NK-Zellen erkennen MHC I-exprimierende Zellen über die Rezeptoren der Ly 49-Familie, die ihre zytotoxische Aktivität inhibieren. Doch auch Ly49-defiziente NK-Zellen, sowie manche CD 8-positiven T-Zellen sind in der Lage, über den CD 94/ NKG 2-Rezeptor die MHC I-Expression einer anderen Zelle zu überprüfen (Vance, Kraft et al. 1998; Jiang and Chess 2000). Das heterologe Dimer CD 94/ NKG 2 erkennt den nicht-klassischen MHC I-Komplex HLA-E (human), bzw. Qa-1<sup>b</sup> (murin) (Vance, Kraft et al. 1998), der von vielen murinen Zellen exprimiert wird. Qa-1<sup>b</sup> bindet und präsentiert präferentiell das Signalpeptid der klassischen MHC I $\alpha$ -Kette (Qdm), das im endoplasmatischen Retikulum abgespalten wird. Die Bindung des Qdm-Peptids an Qa-1<sup>b</sup> ist TAP-abhängig (Vance, Kraft et al. 1998).

Auf diese Weise kann die NK-Zelle sowohl die Translation der MHC I $\alpha$ -Kette, als auch die Funktion des TAP-Transporters überprüfen. Auch der CD 94/NKG 2-Rezeptor wirkt inhibierend auf die zytotoxische Aktivität der NK-Zelle (Vance, Kraft et al. 1998). Ein zu Qa-1<sup>b</sup> verwandtes Protein wird nach Hitzeschock verstärkt exprimiert (Imani and Soloski 1991). Die Reaktion von  $\gamma\delta$ -T-Zellen und NK-Zellen auf Tumorzellen, die membranär Hitzeschockproteine oder Qa-1<sup>b</sup> exprimieren, sind in Abbildung 3 zusammenfassend dargestellt.

#### **1.4 Hyperthermie-Therapie des malignen Melanoms**

Eine Tumorentität, die derzeit mittels hyperthermer Extremitätenperfusion, aber auch mittels regionaler Hyperthermie behandelt wird, ist das maligne Melanom der Haut. In Deutschland beträgt die Inzidenz derzeit 5-6 von 100.000 Einwohnern pro Jahr (Becker and Wahrendorf 1998). Die Mortalität beträgt 1-2 von 100.000 Einwohnern jährlich und die relative Fünfjahresüberlebensrate liegt bei 60-80%. Die Inzidenz ist bei Frauen etwas niedriger als bei Männern. Die relative Fünfjahres-Überlebensrate ist bei Frauen deutlich höher und die Mortalität ist niedriger. Das Risiko, an einem malignen Melanom zu erkranken, steigt mit zunehmendem Alter bis auf eine Inzidenz von 15-20 von 100.000 jährlich bei den über 85-jährigen. In der ehemaligen DDR waren bis 1990 Inzidenz und Mortalität niedriger als im Westen Deutschlands. Als wesentlicher Risikofaktor für die Entwicklung maligner Melanome ist Exposition gegenüber Sonnenlicht nachgewiesen. Begünstigt wird die Entstehung von Melanomen durch schwache Pigmentierung der Haut. In etwa 10 % der Fälle ist aufgrund familiärer Häufung eine genetische Prädisposition anzunehmen. Eine epidemiologische Studie zeigt, daß Menschen, die mehrere Infektionen mit Fieber über 38,5°C erleben, ein um 40 % reduziertes Risiko haben, Melanome zu entwickeln (Kölmel, Pfahlberg et al. 1999). Durch die Induktion von Fieber mit bakteriellen Vakzinen konnten die gleichen Autoren bei 3 von 15 Melanom-Patienten im fortgeschrittenen Tumorstadium eine Remission erzielen (Kölmel, Vehmeyer et al. 1991). Heute wird in der Therapie des Melanoms vor allem die hyperthermie Extremitätenperfusion mit einer hohen Dosis Chemotherapeutika im Perfusat eingesetzt (Ma and Ariyan 2000; Schaadt, Crowley et al. 2002).

Da fortgeschrittene metastasierte Melanome häufig auf eine Chemo- oder Radiotherapie nicht ansprechen, werden derzeit eine Vielzahl verschiedener, meist T-Zell-vermittelter

Immuntherapien für Melanome entwickeln. Bei vielen Patienten gelingt es zwar, Melanom-spezifische T-Zellen zu aktivieren, nicht aber, eine Tumorregression zu erreichen. Aufgrund der früheren erfolgsversprechenden Ergebnisse bei der Hyperthermie-Behandlung von Melanomen und der neuesten Erkenntnisse der Immuntherapie, wird inzwischen verstärkt über Kombinationstherapien aus Hyperthermie und Immuntherapie nachgedacht.

#### ***1.4.1 Das B16-Melanom als experimentelles Melanommodell***

Zur Entwicklung solcher neuen Therapien sind grundlegende Versuche bei Mäusen notwendig. Derzeit sind zwei murine Melanomzelllinien bekannt, die sich in syngene Mäuse transplantieren lassen (Ostrand-Rosenberg and Kruisbeek 2000). Das K1735-Melanom ist amelanotisch und exprimiert einige Proteine des Melaninstoffwechsels und der Melanosomen nicht, die bekannte Melanomantigene sind. Das einzige transplantierbare Melanom der Maus, das alle bekannten Antigene exprimiert, ist das B16-Melanom. Diese Zelllinie wurde aus einem spontanen Melanom der C57BL/6 Maus isoliert (Erstbeschreibung durch Fidler 1975). Es gibt mehrere Sublinien, die sich in ihren Metastasierungseigenschaften unterscheiden und nach mehrfachen Passagen in C57BL/6 Mäusen isoliert wurden.

Das B16-Melanom ist eines der am meisten verwendeten experimentellen Mausmodelle, das sowohl nach intra- oder subkutaner, als auch nach intravenöser Injektion der Zellen in C57BL/6-Mäuse gut zu soliden Tumoren anwächst. In den 5 Jahren vor Beginn dieser Arbeit wurden 1574 Publikationen zum B16-Melanom in der Datenbank der National Library of Medicine der USA (Medline) aufgeführt, von denen sich 413 mit der Immunologie des Tumors beschäftigen. Das B16-Melanom wird als schwach immunogen eingestuft, da die Vakzination von Mäusen mit bestrahlten und somit teilungsinhibierten B16-Zellen kaum gegen das Wachstum eines später injizierten B16-Tumors schützt (Overwijk and Restifo 2000). Es gilt daher als geeignetes Modell, um die Immunantwort auf humane Melanome zu untersuchen, die meist nur eine schwache Immunantwort auslösen.

#### ***1.4.2 T-Zell-Antigene des B16 Melanoms***

Als Tumor-assoziierte, aber nicht tumorspezifische T-Zell-Antigene des B16 Melanoms wurden mehrere Enzyme der Melanin-Synthese beschrieben (Bloom, Perry-Lalley et al. 1997; Dyall, Bowne et al. 1998; Overwijk, Tsung et al. 1998), die auch in Melanozyten exprimiert werden (Melanozyten-Differenzierungs-Antigene). T-Zellen gegen diese Proteine

sind auch von Patienten mit malignen Melanomen bekannt. Die für murines TRP 1 und TRP 2 bekannten T-Zell-Epitope sind H-2K<sup>b</sup>-restringiert, das für murines GP 100 bekannte Epitop ist H-2D<sup>b</sup>-restringiert. Ein weiteres bekanntes Melanom-Antigen ist Tyrosinase, das geschwindigkeitslimitierende Enzym des Melanin-Stoffwechsles. Während Tyrosinase beim Menschen eines der wichtigsten Melanomantigene ist, wurden in C57BL/6-Mäusen mit B16-Melanom bisher keine Tyrosinase-spezifischen T-Zellen nachgewiesen. Wegen seiner großen Bedeutung bei humanen Melanomen ist es dennoch ein interessantes Modellantigen. Tyrosinase ist ein Membranprotein und in den intrazellulären Melanosomen lokalisiert. Es wird posttranslational im endoplasmatischen Retikulum glycosyliert und existiert in Melanomen in verschieden stark glycosylierten Isoformen (Halaban, Cheng et al. 1997; Mosse, Meadows et al. 1998).

#### ***1.4.3 Das RMA-Thymom als experimentelles Tumormodell***

Das murine T-Zell-Lymphom RMA wurde aus einem mit dem murinen Leukämie Virus (MuLV) induzierten T-Zell Lymphom der C57BL/6 Maus isoliert (Erstbeschreibung durch Ljunggren and Karre 1985). Der transplantierbare Tumor gilt als stark immunogen, da die Vakzination von Tieren mit bestrahlten RMA-Zellen gegen das Wachstum eines später injizierten RMA-Tumors schützt (Iezzi, Rivolta et al. 1997). RMA-Zellen exprimieren die MHC I-Allele H-2K<sup>b</sup> und H-2D<sup>b</sup> und wurden daher in der vorliegenden Arbeit zur Untersuchung des Einflusses der Hyperthermie auf die MHC-Expression von Tumoren verwendet.

#### **1.5 Mausmodelle der regionalen Hyperthermie**

Schon seit den 70er Jahren gibt es ein Mausmodell der regionalen Hyperthermie (Wahl, Brustad et al. 1979). Die Applikation der regionalen Hyperthermie erfolgt meist durch Immersion des Tumors und des umliegenden Gewebes in ein temperiertes Wasserbad (Wahl, Brustad et al. 1979; Peck and Gibbs 1983; Hosono, Hosono et al. 1994; Imamura, Seki et al. 1998), doch auch die Implantation magnetischer Nanopartikel in den Tumor wurde an Mäusen erprobt (Jordan, Scholz et al. 1997). Die maximale bei Wasserbad-Hyperthermie eingesetzte Temperatur beträgt 44°C (Peck and Gibbs 1983; Imamura, Seki et al. 1998).

Von den meisten Autoren, die die regionale Hyperthermie von murinen Tumoren untersuchen, werden das B16-Melanom (Wahl, Brustad et al. 1979; Green, Samulski et al.

1990; Leibovici, Klorin et al. 1991; Avery, Nathanson et al. 1992; Stojkovic and Radacic 2002) oder das Mammacarcinom der C3H-Maus (Peck and Gibbs 1983; Stewart, Gibbs et al. 1983) verwendet. Da der Tumor der regionalen Hyperthermie zugänglich sein muß, werden die kultivierten Tumorzellen in allen publizierten Mausmodellen subkutan in den Schwanz, in eine hintere Extremität oder in die Flanke injiziert. Bei Injektion des Tumors in den Schwanz infiltriert dieser im Laufe des Wachstums meist die Schwanzvenen und metastasiert hämatogen in die Lunge. Tumore, die in eine Extremität transplantiert werden, metastasieren hingegen wie die bei Melanom-Patienten auftretenden Tumore meist lymphogen.

### ***1.5.1 Analyse der tumorspezifischen T-Zell-Antwort mittels TRECs***

Bei der Untersuchung der Immunreaktion auf einen Tumor ist die Verfolgung der T-Zell-Proliferation nach Restimulation isolierter T-Zellen mit Antigen und antigenpräsentierenden Zellen *in vitro* eine häufig verwendete Methode, die jedoch genaue Kenntnis des Antigens erfordert. Sie gibt Information über die Stimulierbarkeit der Zellen, aber nicht über die *in vivo* tatsächliche stattfindende Proliferation. Die Verfolgung der T-Zell-Proliferation *in vivo* geschieht entweder über die Injektion von BrdU oder von *ex vivo* isolierten und markierten T-Zellen. Beides ist mit einem erheblichen Eingriff in das Versuchstier verbunden und ist bei Patienten ausgeschlossen. Seit längerem ist bekannt, daß sich naive T-Zellen, die sich nach der Reifung und dem Verlassen des Thymus nicht mehr geteilt haben, durch DNA-Abschnitte charakterisieren lassen, die der Rekombination der T-Zell-Rezeptor-Gene entstammen (Okazaki, Davis et al. 1987). Bei der Bildung des T-Zell-Rezeptors werden wie bei Immunglobulin-Genen Genabschnitte rekombiniert, um eine große Diversität zu erreichen. Bei jedem Rekombinationsschritt werden Bereiche des Chromosoms als zirkulärer DNA-Strang exzidiert. Dies ist in Abbildung 4 am Beispiel des TCRD-TREC dargestellt, der bei der Rekombination der TCR $\alpha$ -Kette entsteht. Diese T-Zell-Rezeptor-Exzisionszirkel (TREC) werden nicht degradiert. Da TRECs bei der Mitose der Zelle nicht verdoppelt werden, können sie nur an je eine Tochterzelle weitergegeben werden, so daß die Zahl der TREC enthaltenden T-Zellen sich bei jeder Teilung halbiert (Hazenberg, Verschuren et al. 2001). Die Weitergabe der TRECs einer Zelle ist nicht gekoppelt, die verschiedenen bei den sukzessiven Rekombinationsschritten der TCR $\alpha$  bis  $\gamma$ -Ketten gebildeten TRECs können also an verschiedene Tochterzellen weitergegeben werden. Bisher wurde nicht versucht, anhand der Quantifizierung eines dieser TREC die T-Zell-Proliferation und Migration *in vivo* ohne vorherige Injektion von BrdU oder markierten T-Zellen zu messen.

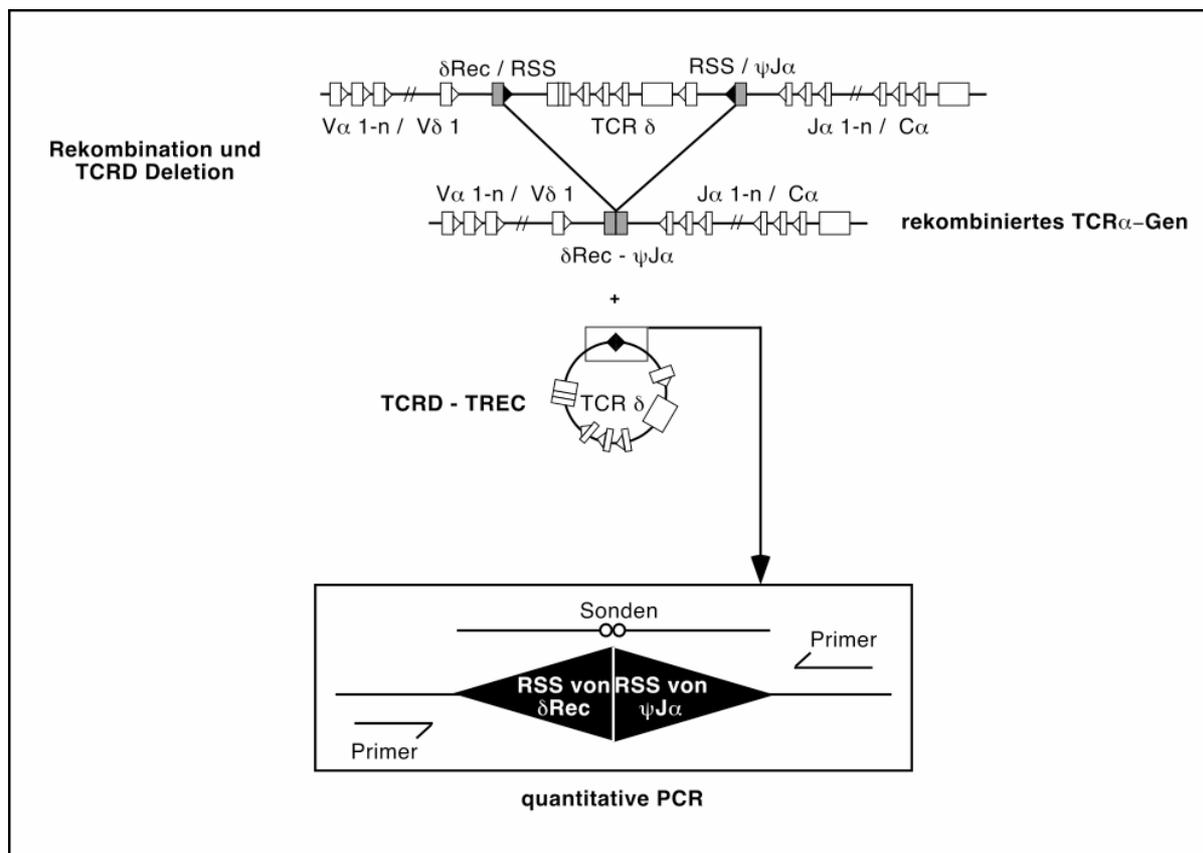


Abbildung 4: Prinzip der TREC-Analyse

Bei der Rekombination der TCR-Gene werden sukzessive mehrere zirkuläre DNA-Bereiche ausgeschnitten und bleiben als TREC erhalten. Für die Quantifizierung von T-Zellen mit rekombiniertem T-Zell-Rezeptor verwendet man jenen TREC, der bei der Deletion der TCR  $\delta$ -Genabschnitte entsteht (hier dargestellt). Der Nachweis erfolgt mittels quantitativer PCR mit Primern zu beiden Seiten der RSS-Sequenz und fluoreszenz-markierten Sonden, die die RSS-Sequenz überspannen. Nach Hazenberg et al. (Hazenberg, Verschuren et al. 2001).

### 1.5.2 Der Mausstamm C57BL/6

Die C57BL-Stämme sind die am häufigsten verwendeten Inzucht-Mäuse: Alleine der Stamm C57BL/6 wird in 14 % aller Studien mit Inzucht-Stämmen verwendet (The Jackson Laboratory). Der Mausstamm C57BL/6 geht auf ein Zuchtpaar des Jahres 1921 zurück, welches auch das Stammpaar des C57BL/10 Stammes ist. Die beiden Stämme wurden schon vor 1937 getrennt. Genetische Marker deuten darauf hin, daß bis zu 6,5 % des Genoms aus *Mus spretus* kommt, und daß das Y-Chromosom einer asiatischen Variante der *Mus musculus* entstammt (The Jackson Laboratory). Der Stamm gilt als genetisch uneinheitlich.

Weibliche C57BL/6-Mäuse haben verglichen mit anderen Mausstämmen und mit männlichen Tieren auffällig wenig Leukozyten, insbesondere Lymphozyten und Neutrophile Granulozyten sind reduziert (Weber, Salinger et al. 2000). Ein Teil ( etwa 7 %) der C57BL/6-Mäuse entwickeln im Laufe ihres Lebens eine Leukämie (The Jackson Laboratory ). Der MHC-Haplotyp der C57BL/6-Mäuse ist für alle MHC-Komplexe H-2<sup>b</sup>. Exprimiert werden die MHC-Komplexe H-2A<sup>b</sup> (MHC II), H-2D<sup>b</sup> und H-2K<sup>b</sup> (beide MHC I). Der MHC I-Komplex H-2L<sup>b</sup> wird nicht exprimiert.

## 1.6 Fragestellung

Über die Wirkung der regionalen Hyperthermie auf die Immunantwort gegen Tumore ist bisher wenig bekannt. Es liegt jedoch aufgrund der wichtigen Funktion von Hitzeschockproteinen nahe, eine Immunstimulation zu vermuten. Durch die Kombination einer Immuntherapie mit Hyperthermie könnten daher ebenso wie bei der hyperthermen Radio-Chemo-Therapie synergistische Effekte erreicht werden. Mit Hilfe immunologischer Therapien kann man zwar häufig eine tumorspezifische Immunstimulation erreichen, jedoch nur in Einzelfällen eine vollständige oder teilweise Remission des Tumors. In der Immuntherapie von Tumoren gibt es eine Vielzahl von Ansätzen, die meist die Aktivierung tumorspezifischer T-Zellen zum Ziel haben. Doch auch Antikörper- oder NK-Zell-vermittelte Immuntherapien werden eingesetzt. Die optimale Kombination der regionalen Hyperthermie mit einer Immuntherapie erfordert allerdings zunächst die genaue Kenntnis der Wirkung einer Hyperthermie-Behandlung auf die Immunantwort.

Ziel dieser Arbeit war, die Immunantwort bei der regionalen Hyperthermie eines klinisch relevanten soliden Tumors zu untersuchen und Ansatzpunkte für eine Kombination aus Hyperthermie und Immuntherapie zu finden. Zu diesem Zweck sollte ein Mausmodell der regionalen Hyperthermie entwickelt werden, das die Analyse der tumorspezifischen Immunantwort ermöglicht. Es sollte anschließend überprüft werden, ob Hyperthermie von Tumorzellen zu einer T- oder NK-Zell-Stimulation führen kann. Insbesondere sollte die MHC I-Präsentation von tumorassoziierten Antigenen nach Hyperthermie untersucht werden, sowie die Expression NK-Zell-stimulierender und -inhibierender Marker.

Wegen der hohen klinischen Relevanz der Melanome, den aggressivsten Hauttumoren, und ihrer häufigen Resistenz gegen klassische Tumorthérapien ist gerade hier die Entwicklung neuer Therapieansätze von zentraler Bedeutung. Da zudem einige Melanom-assoziierte Antigene charakterisiert sind, kann bei Melanomen die tumorspezifische Immunantwort gut analysiert werden. Das einzige bekannte, murine Melanommodell, das alle diese Antigene bildet, ist das B16-Melanom. Es gilt als schwach immunogen und spiegelt daher die häufig in Patienten anzutreffende Situation wieder. Es ist zudem durch eine Vielzahl von Publikationen gut charakterisiert. Vor diesem Hintergrund war das Ziel der vorliegenden Arbeit, am Beispiel B16-Melanoms ein Mausmodell der regionalen Hyperthermie entwickelt und daran der Einfluß einer Hyperthermie-Behandlung auf die Immunantwort untersucht werden.