

3 Ergebnisse

3.1 Freisetzung von Hitzeschockproteinen nach Hyperthermie

In einer ersten Versuchsreihe wurde die Expression und Freisetzung von Hitzeschockproteinen bei B16F0-Zellen nach Hyperthermie untersucht. Anhand der Ergebnisse wurde die optimale Temperatur zur Untersuchung der Hyperthermie-abhängigen Immunantwort auf das B16F0-Melanom im Mausmodell bestimmt.

3.1.1 *Hyperthermie-induzierter Zelltod von B16F0-Zellen in vitro*

Die Quantifizierung des Zelltods von B16F0-Zellen nach Hyperthermie erfolgte mittels eines fluorometrischen Test. Zellen des B16F0-Melanoms wurden 30 Minuten im Wasserbad hyperthermiert und nach 24 Stunden geerntet. Lebende Zellen wurden anhand ihrer Esterase-Aktivität mittels Calcein nachgewiesen und Zellen mit geschädigter Membran wurden mit Propidiumjodid gefärbt. Nach Hyperthermie bei 43°C wiesen 10-24 % der Zellen eine geschädigte Zellmembran auf, die für Propidiumjodid durchlässig war, und ein Marker für nekrotischen und spätapoptotischen Zelltod darstellt (Abbildung 8A). Bis zu einer Hyperthermie-Temperatur von bis zu 41°C war dagegen keine Erhöhung der Nekroserate gegenüber den unbehandelten Zellen festzustellen.

Um zu differenzieren, ob der nachgewiesenen Zelltod nekrotisch oder apoptotisch erfolgt, wurde die Apoptose-Rate von B16F0-Zellen nach Hyperthermie bestimmt. Zum Nachweis apoptotischer Zellen diente Phosphatidylserin, welches bei vitalen Zellen auf der zytoplasmatischen Seite der Zellmembran lokalisiert ist. Bei frühapoptotischen Zellen erscheint Phosphatidylserin auf der Außenseite der Membran und läßt sich mittels Annexin V nachweisen. Bei 43°C waren 90 Minuten nach Hyperthermie deutlich mehr apoptotische B16F0-Zellen nachweisbar, als in unbehandelten Kulturen (20 % versus 10 %, Abbildung 9A). Diese Zellen waren zu einem großen Teil mit Propidiumjodid anfärbbar und damit spätapoptotisch. Die Zahl der Annexin V-positiven Zellen 3 Stunden nach Hyperthermie korreliert mit der Zahl spätapoptotischer Zellen mit einem verminderten DNA-Gehalt nach 24 Stunden. Der Anteil von spätapoptotischen Zellen mit subzellulärem DNA-Gehalt blieb bis zu einer Hyperthermie-Temperatur von 41°C konstant, nach einer Hyperthermie bei 43°C nahm er von 10 % auf 20 % zu (Abbildung 9B).

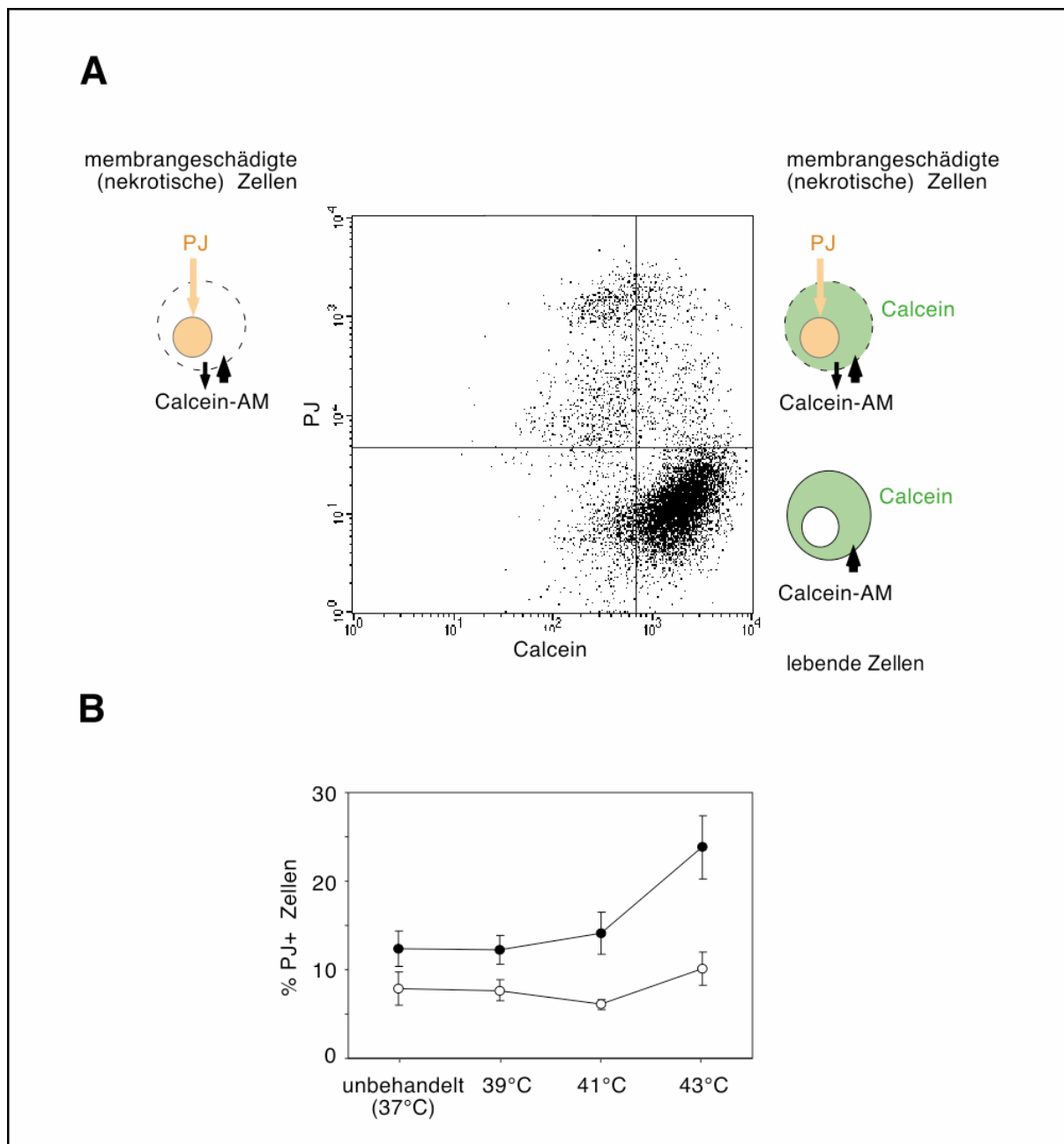


Abbildung 8: Nekrose und späte Apoptose von B16F0-Zellen 24h nach Hyperthermie

A: Interpretation des Calcein-Propidiumjodid-Zytotoxizitätstests, B: Anteil membrangeschädigter Zellen nach Hyperthermie. B16F0-Zellen wurden *in vitro* 30 min hyperthermiert und 24 h später geerntet. Lebende Zellen wurden mit Calcein, tote Zellen mit Propidiumjodid angefärbt. Die Analyse erfolgte durchflußzytometrisch. Dargestellt sind Mittelwert und Standardabweichung. $n=3$ für jeden Meßwert. Zwei unabhängige Experimente sind dargestellt (offene und geschlossene Symbole).

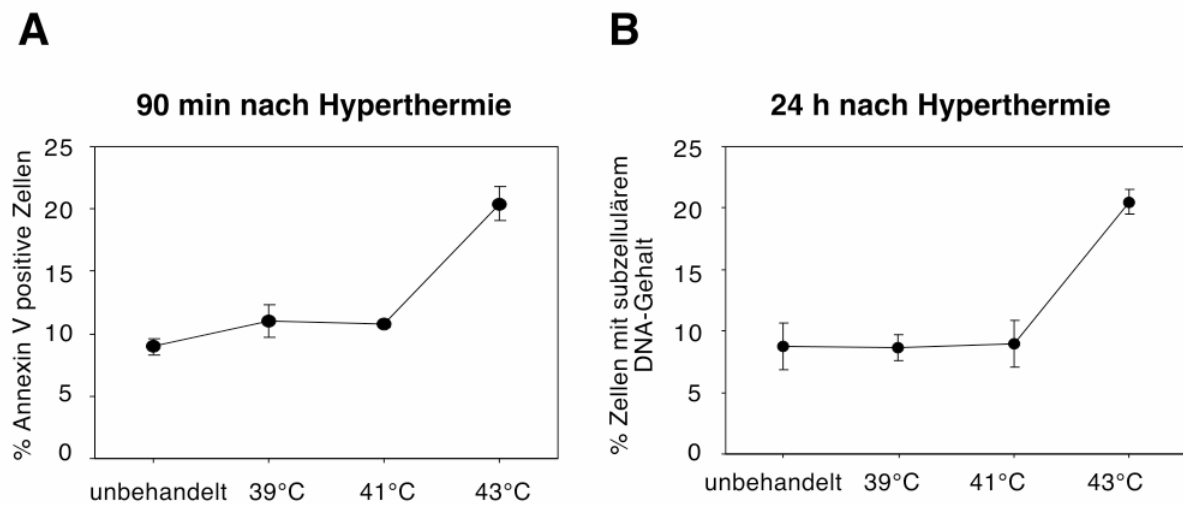


Abbildung 9: Frühe Apoptose von B16F0-Zellen nach Hyperthermie

A: Phosphatidyserin-positive Zellen nach 90 min, B: Zellen mit subzellulärem DNA-Gehalt nach 24 h. B16F0-Zellen wurden *in vitro* 30 min hyperthermiert und 90 min, bzw. 24 h später geerntet. Phosphatidyserin auf der äußeren Membran wurde mittels Annexin V-FITC nachgewiesen. Zur Bestimmung des DNA-Gehalts wurden die Zellen mit 2 % Formalin fixiert und mit 0,5 % Saponin und Propidiumjodid permeabilisiert und gefärbt. Die Analyse beider Untersuchungen erfolgte durchflußzytometrisch. Dargestellt sind Mittelwert und Standardabweichung. $n=3$ für jeden Meßwert.

Zur Bestimmung der Koloniebildungsrate wurden Zellen des B16F0-Melanoms in niedriger Zelldichte ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen 30 Minuten hyperthermiert. Nach weiteren 3 Tagen Inkubation im Brutschrank wurden die Zellen mit Kristallviolett gefärbt und die Anzahl der Kolonien manuell ausgezählt. Die Koloniebildungsrate wurde wie folgt berechnet:

$$\text{Koloniebildungsrate} = 100 \times \text{Anzahl Kolonien} / \text{Anzahl ausplattierte Zellen}$$

Hyperthermie bei 39-41°C führt zu einer leichten Abnahme der Koloniebildungsrate von 60 % auf 55 % (Abbildung 10). Nach 30 Minuten Hyperthermie bei 43°C sinkt die Rate der Kolonie-bildenden Zellen auf 44 %. Zugleich sind die Kolonien nach Hyperthermie bei 43°C kleiner (d.h. sie bestehen aus weniger Zellen, ohne Abbildung).

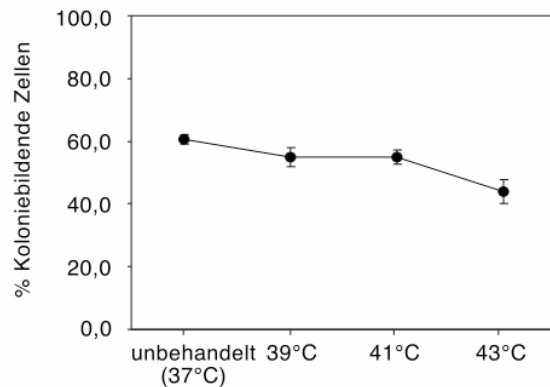


Abbildung 10: Koloniebildungsrate von B16F0-Zellen nach Hyperthermie. Die Zellen wurden mit Kristallviolett gefärbt und manuell ausgezählt. Dargestellt sind Mittelwert und Standardabweichung. $n = 3$ für jeden Meßwert.

3.1.2 Expression und Freisetzung von Hitzeschockproteinen

Die Expression der Hitzeschockproteine HSP 72 und HSP 73 der HSP 70-Familie wurde im Western Blot überprüft. Es wurde ein monoklonaler Antikörper verwendet, der sowohl mit dem konstitutiv exprimierten HSP 73, als auch mit dem hitzeinduzierten HSP 72 reagiert. Nach Hyperthermie stieg die Expression deutlich an und blieb auch 24 Stunden nach Hyperthermie noch leicht erhöht (Abbildung 11). Im Gegensatz hierzu veränderte sich die Expression des ebenfalls hitzeinduzierbaren Hitzeschockproteins GP 96 (GRP 94) aus der HSP 90-Familie nach Hyperthermie nicht. Auch unbehandelte Zellen wiesen eine starke GP 96-Expression auf (Abbildung 11).

Nach Hyperthermie sind sowohl die Hitzeschockproteine HSP 72 und HSP 73, als auch GP 96 im Überstand nachweisbar (Abbildung 12). In einem 7,5 % SDS-Polyacrylamid-Gel ist im Überstand von Zellen, die bei 43°C hyperthermiert wurden, bei etwa 70 kD eine zusätzliche Bande nachzuweisen. Im Western Blot mit anti-HSP 72/73 ist auf gleicher Höhe eine Doppelbande zu sehen (Abbildung 12A und B, vergrößerte Ausschnitte). Die untere der beiden Banden entspricht dem hitzeinduzierbaren HSP 72 (schwarzer Pfeil), die obere dem konstitutiv exprimierten HSP 73 (weißer Pfeil). Letzteres ist auch in den Überständen unbehandelter und mild hyperthermierter (39°C-41°C) Zellen nachweisbar. GP 96 wird von den B16F0-Zellen erst nach Hyperthermie bei 39°C oder höheren Temperaturen freigesetzt, nicht jedoch von unbehandelten Zellen.

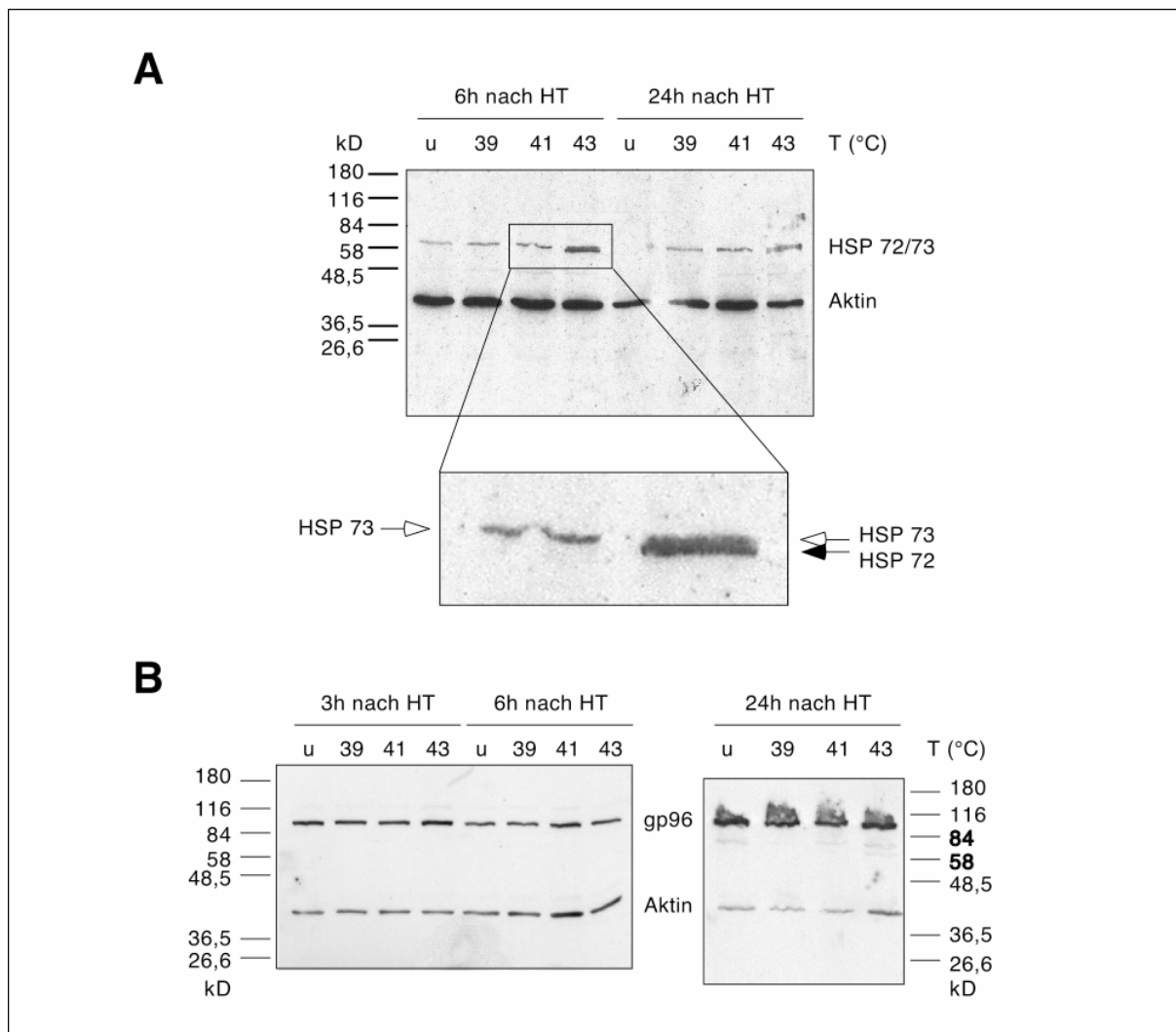


Abbildung 11: Expression von HSP 72/ HSP 73 und von GP 96 in B16F0-Zellen

A: HSP 72/72, B: GP 96 3, 6 und 24 Stunden nach Hyperthermie. Je 25 µg Gesamtprotein aus B16F0-Zellen wurde mittels Western Blot analysiert. Der Nachweis von Aktin erfolgte mit aufgereinigtem Kaninchen-anti-Aktin und der Nachweis von HSP 72/HSP 73, bzw. GP 96 mit monoklonalem Antikörpern sowie passenden HRP-markierten Sekundärantikörpern.

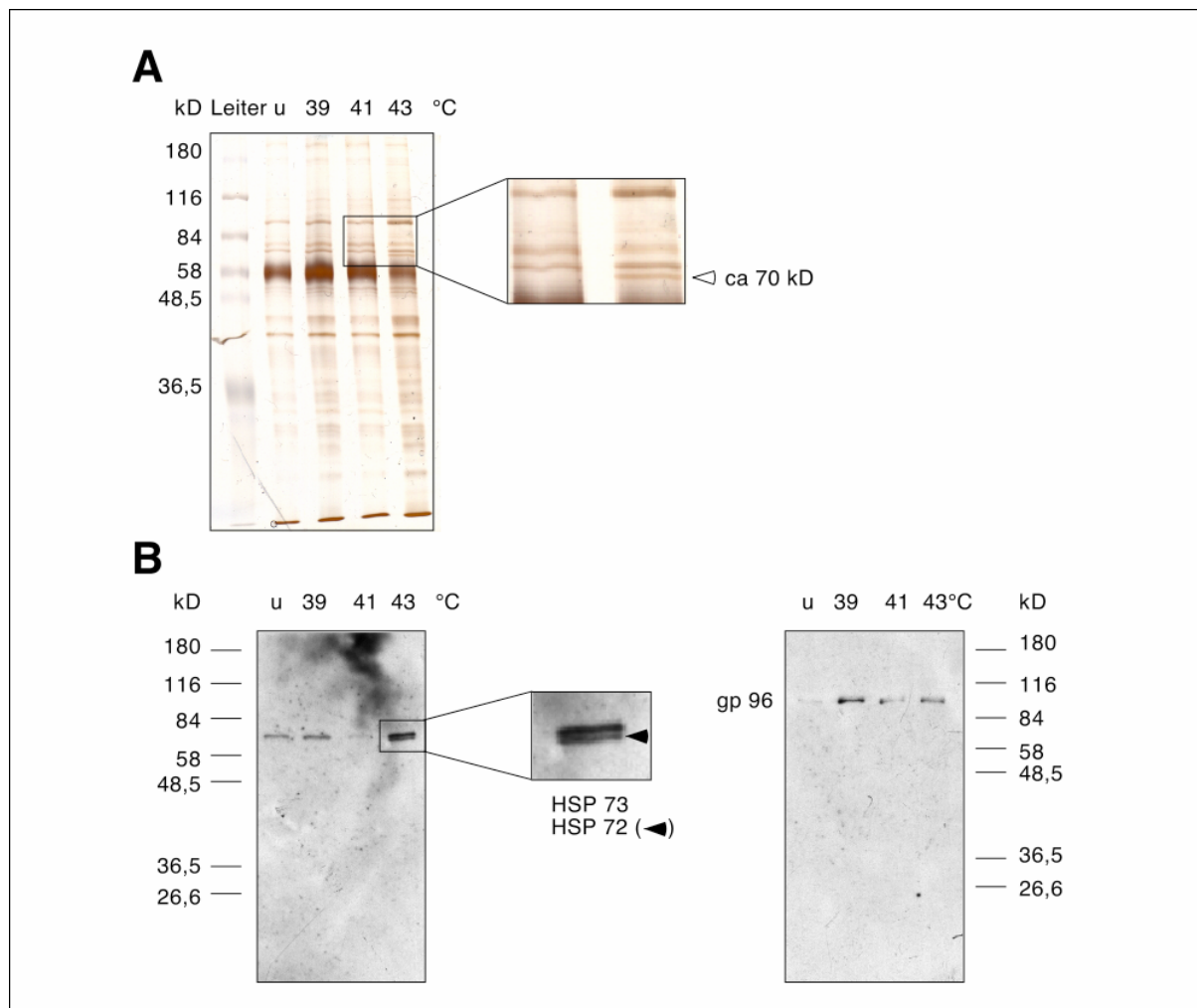


Abbildung 12: Hitzeschockproteine im Kulturüberstand hyperthermierter B16F0-Zellen
 Die Kulturüberstände wurden 24 h nach Hyperthermie abgenommen und mittels Centricon 10 kD-Membranen eingengt. Der Nachweis der Hitzeschockproteine erfolgte mittels Western Blot. A: Polyacrylamidgel Silbernitratfärbung, weißer Pfeil: bei 43°C neu auftauchende Bande bei 70 kD, B: Western Blots, schwarzer Pfeil: bei 43°C neu auftauchendes HSP 72.

3.1.3 Phagozytose von Fragmenten hyperthermierter B16-Zellen durch DC

Die aus Vorläuferzellen des Knochenmarks von C57BL/6-Mäusen in vitro gewonnenen Dendritischen Zellen exprimierten MHC I und MHC II sowie auch die costimulatorischen Moleküle CD 80 und CD 86 (ohne Abbildung). Zur Untersuchung der Phagozytoserate der Dendritischen Zellen wurde diese mit dem fluoreszierenden Membranfarbstoff DiO markiert (Emission bei 530 nm) und mit B16F0-Zellen kokultiviert, die mit dem roten Membranfarbstoff DiI markiert waren (Emission bei 585 nm). Beide Farbstoffe sind bei 488 nm anregbar. Doppelt positive Zellen emittieren Licht beider Wellenlängen und sind am Mikroskop gelb zu sehen. Die Intensität der roten Fluoreszenz ist ein Maß für die

Phagozytoserate der Zellen. Etwa 30 % der Dendritischen Zellen wiesen Phagozytose-Aktivität auf. Die Menge des von diesen Zellen phagozytierten Debris toter B16F0-Zellen stieg deutlich an, wenn die B16F0-Zellen vorher bei 43°C hyperthermiert worden waren (Abbildung 13). Hyperthermie der B16F0-Zellen bei weniger als 43°C führte zu keiner erhöhten Phagozytose durch Dendritische Zellen.

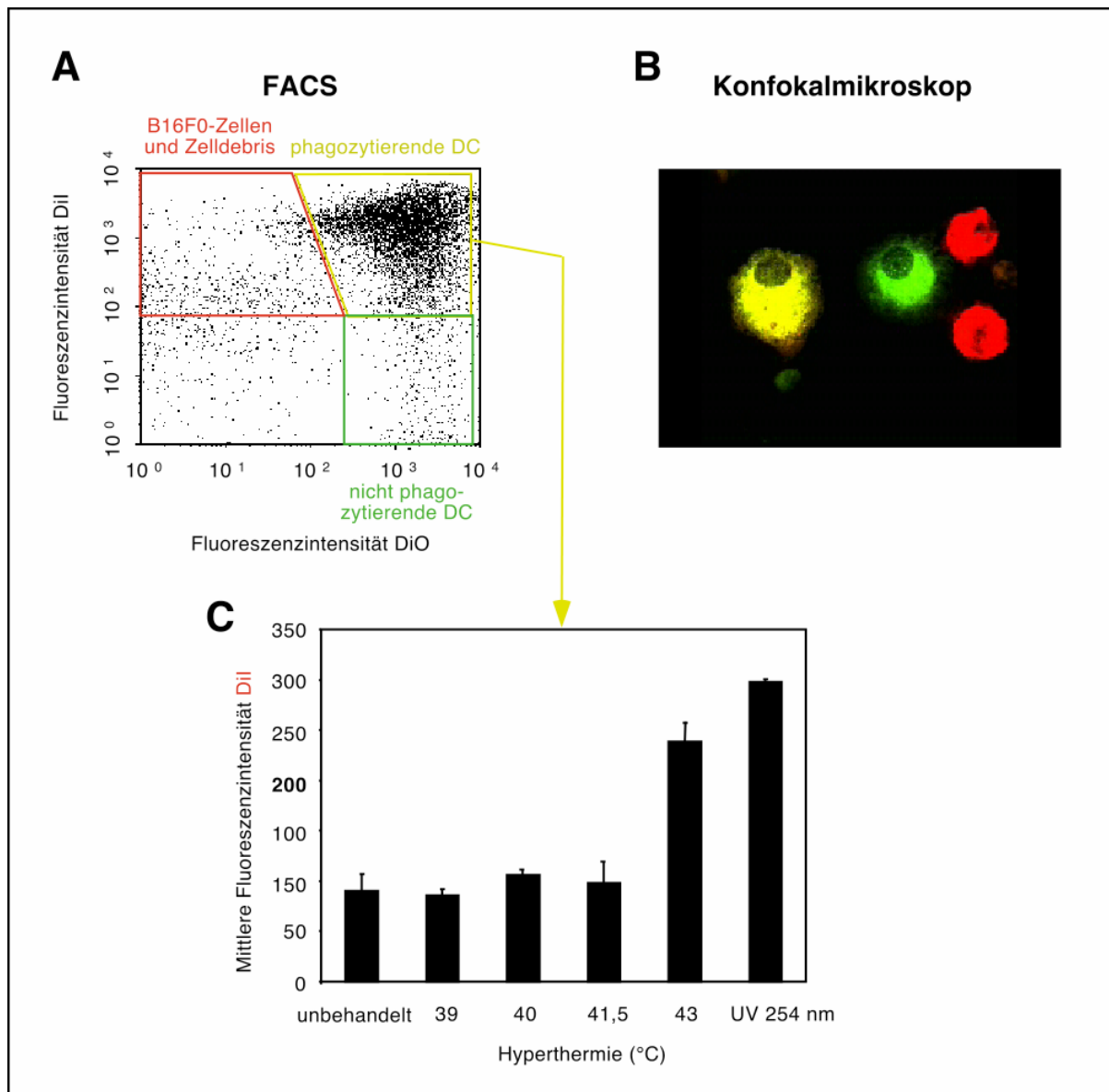


Abbildung 13: Phagozytose hyperthermierter B16F0-Zellen durch Dendritische Zellen
Als Referenz wurden UV-bestrahlte B16F0-Zellen verwendet. A: durchflußzytometrisches Bild, B: konfokalmikroskopisches Bild, C: Quantifizierung der Phagozytose-Rate im FACS. Dargestellt sind Mittelwert und Standardabweichung. n=3 für jeden Meßwert..

3.2 Entwicklung und Charakterisierung eines Mausmodells der regionalen HT

Aufbauend auf den dargestellten Ergebnissen zu Zelltod und Freisetzung von Hitzeschockproteinen wurde ein Mausmodell der regionalen Hyperthermie entwickelt. B16F0-Tumore wurden subkutan in eine hintere Extremität von syngeneten C57BL/6-Mäusen injiziert. Die Hyperthermie-Therapie wurde bei einer durchschnittlichen TumorgroÙe von 10 mm durchgeführt. Alle Hyperthermieversuche wurden mit weiblichen 6-15 Wochen alten Mäusen durchgeführt.

3.2.1 Entwicklung des Mausmodells

Zur Etablierung des Mausmodells wurden zunächst je 8 Tieren eine aufsteigende Zahl von B16F0-Melanomzellen subkutan injiziert. Nach 7-8 Tagen entwickelten die Tiere sichtbare Tumore, die innerhalb von 14-15 Tagen einem Durchmesser von 10 mm erreichten. Nach 17-21 Tagen betrug der Tumordurchmesser im Durchschnitt 15-16 mm und das mittlere Tumorgewicht 1-2 g. Für alle folgenden Versuche wurden 10^5 B16F0-Melanomzellen subkutan injiziert und die Tumore bei einem mittleren Durchmesser von 10 mm therapiert, welcher in der Regel nach 12-14 Tagen erreicht wurde. Zur Behandlung wurden die Tiere wie in Abbildung 14 dargestellt fixiert.

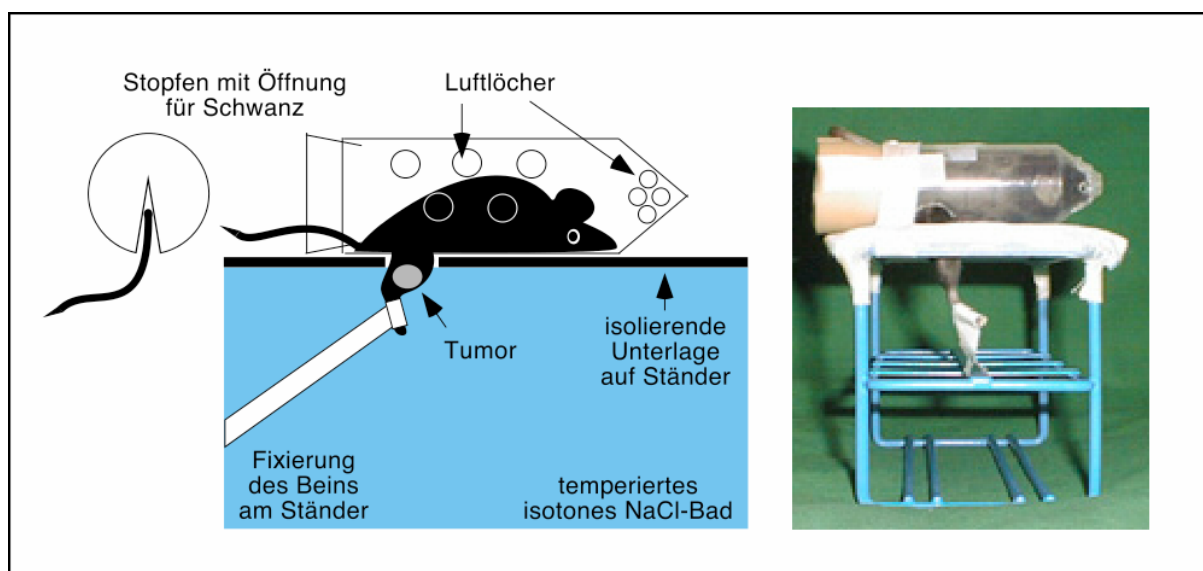


Abbildung 14: Fixierung der Mäuse zur Applikation der regionalen Hyperthermie

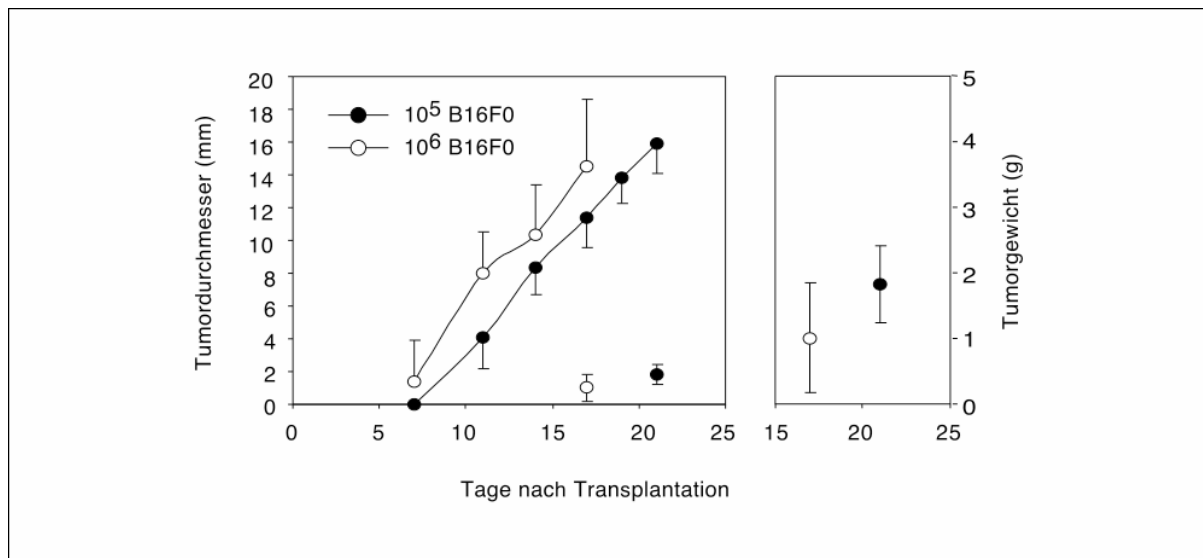


Abbildung 15: Tumordurchmesser und -gewicht

B16F0-Melanomzellen wurden subkutan in eine hintere Extremität von C57BL/6-Mäusen injiziert. Dargestellt sind Mittelwert und Standardabweichung. $n=8$ für jeden Meßwert.

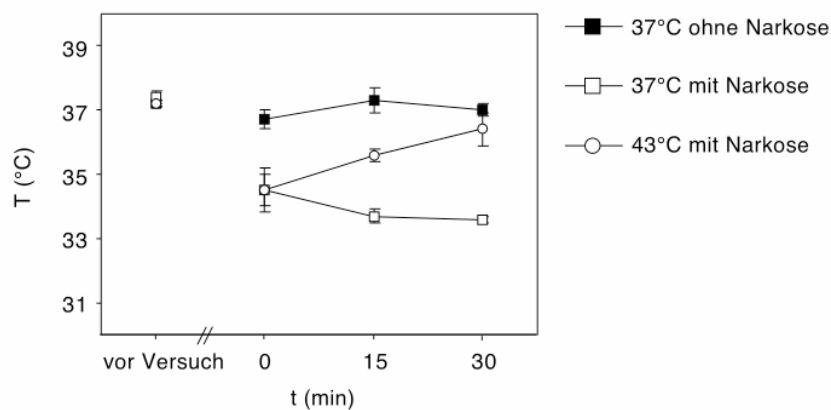


Abbildung 16: Körpertemperatur narkotisierter Mäuse bei Hyperthermie-Behandlung

Den Tieren wurde eine Woche vor Durchführung des Versuches eine Temperatursonde subkutan injiziert. Die Ablesung der Sonde erfolgte im Abstand von 5 cm über ein Lesegerät. Die Tiere wurden 15 min vor Beginn des Versuches narkotisiert. Dargestellt sind Mittelwert und Standardabweichung. $n=4$ für jeden Meßwert.

Bei der Erprobung der Hyperthermie-Behandlung zeigte sich, daß die Tiere unter erheblichem Streß litten, so daß es wiederholt zu Todesfällen kam. Daher wurden zunächst tumortragende Tiere für die Dauer der Behandlung narkotisiert. Aufgrund der bekannten Dysregulation der Körpertemperatur unter Narkose wurde diese über einen subkutan injizierten Transponder gemessen. In Narkose sank die subkutane Temperatur von Tieren, deren Bein in einem 37°C Bad behandelt wurde, auf bis zu 33,5°C ab, während die Temperatur nicht narkotierter Tiere stabil blieb. Die subkutane Temperatur von Tieren, die bei 43°C behandelt wurden, stieg im Verlauf der Behandlung wieder auf 36,5°C an. Aufgrund dieser Temperaturunterschiede wurden die Tiere in allen folgenden Versuchen nicht narkotisiert, sondern mit Midazolam sediert, welches die Kerntemperatur nur leicht absinken läßt (Kurz, Sessler et al. 1995).

3.2.2 Histologie und Leukozyteninfiltration von B16F0-Tumoren

Das Wachstum der B16F0-Tumore wurde durch einmalige Hyperthermie nicht beeinflusst. Die Tumore von unbehandelten und behandelten Tieren erreichten 4 Tage nach Hyperthermie gleichermaßen einen Durchmesser von 12,5 mm. Die Tumore wuchsen ab einer Größe von etwa 5 mm invasiv und muskeldestruierend (Abbildung 17B). Sie sind stark durchblutet und in der immunhistologischen Färbung des Blutgefäßendothels ist eine große Zahl kleiner Blutgefäße zu sehen (Abbildung 17F). Der verwendete Antikörper reagiert unspezifisch mit Zellen der Dermis und des subdermalen Bindegewebes, so daß eine Quantifizierung der Blutgefäße im Subcutanen Tumorareal nicht möglich ist. In zentralen Bereichen sind stellenweise Areale mit fehlender zellulärer Struktur zu sehen, bei denen es sich offensichtlich um Nekrosen handelt (Abbildung 17C). Sie beschränken sich jedoch, auch nach Hyperthermie, auf kleine Bereiche der Tumoren.

Das B16F0-Melanom ist eine schwach metastasierende Sublinie des B16-Melanoms. Bei einigen Tieren waren makroskopisch sichtbare Metastasen in den Lymphknoten vorhanden. Metastasen wurden in den poplitealen, inguinalen und iliacalen Lymphknoten der tumortragenden Seite gefunden. Daher wurden bei der Analyse der regionalen Immunantwort diese Lymphknoten als die efferenten Lymphknoten betrachtet und getrennt von den korrespondierenden Lymphknoten der tumorfreien Seite analysiert.

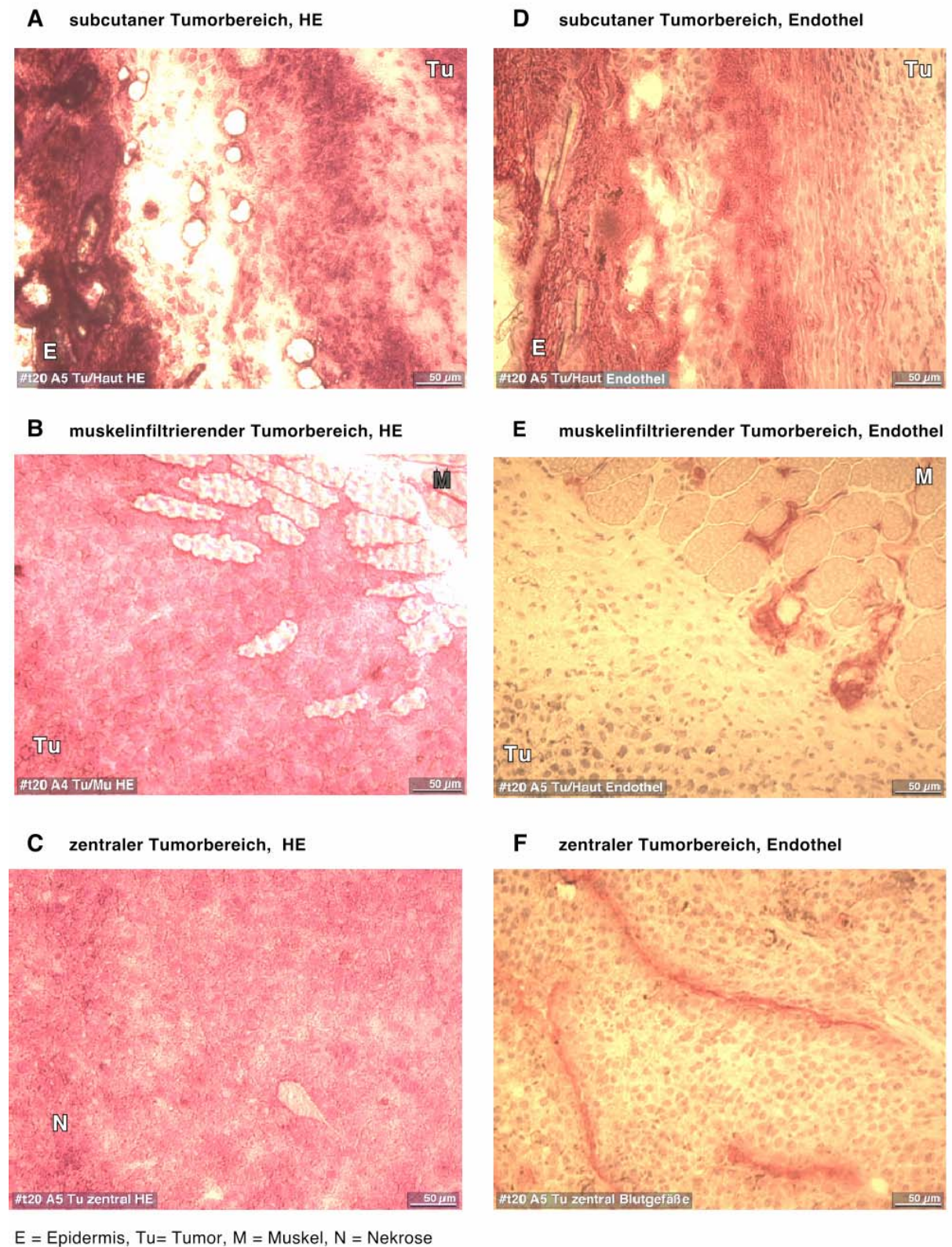


Abbildung 17: Histologie des B16F0-Melanoms
 A-C: HE-Färbungen typischer Tumorareale, D-F: Blutgefäße (Endothel-Färbung). Experimentelle Details sind in Material und Methode angegeben.

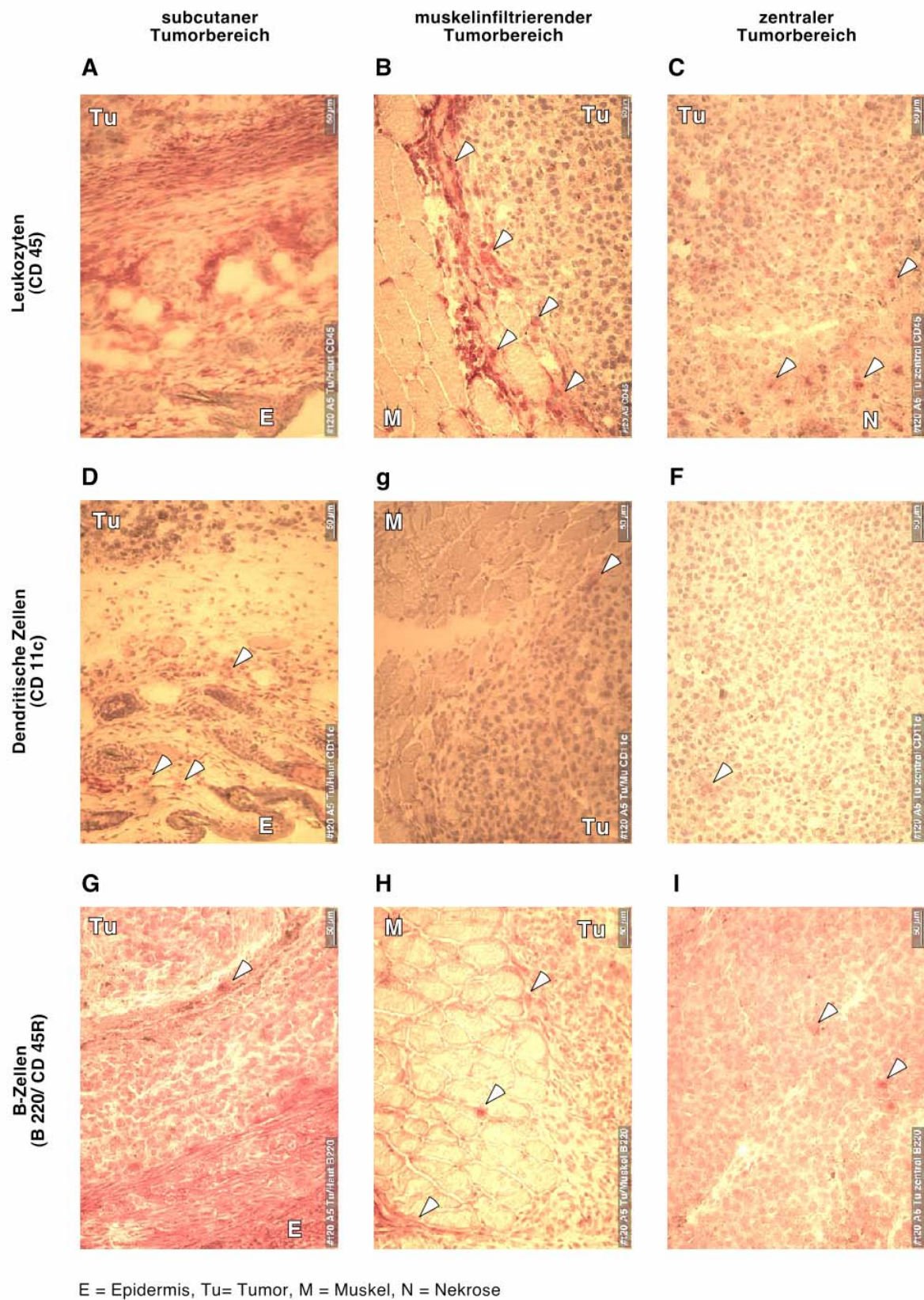


Abbildung 18: Leukozyten-Infiltration des B16-Melanoms
 A-C: CD 45-Färbung aller Leukozyten; D-F: Dendritische Zellen (CD 11c-positiv); G-I: B-Zellen (B 220 positiv). Experimentelle Details sind in Material und Methoden angegeben. Pfeile: positive Zellen.

Bei immunhistologischer Färbung aller Leukozyten mit monoklonalen Antikörpern gegen CD 45 fielen starke Ansammlungen von Leukozyten am Rand der Tumore im subcutanen Bindegewebe und im Bereich der Muskelinfiltration auf (Abbildung 18), während in zentralen Tumorarealen nur vereinzelt Leukozyten nachweisbar waren. Die großen Infiltrate enthielten einige CD 11c-positive Dendritische Zellen (Abbildung 18D und E) und einige B 220 (CD 45R)-positive B-Zellen (Abbildung 18G und H). CD 3-positive Zellen (T-Zellen) und F 4/80 positive Zellen (Makrophagen) waren nur in sehr geringer Zahl vorhanden (ohne Abbildung).

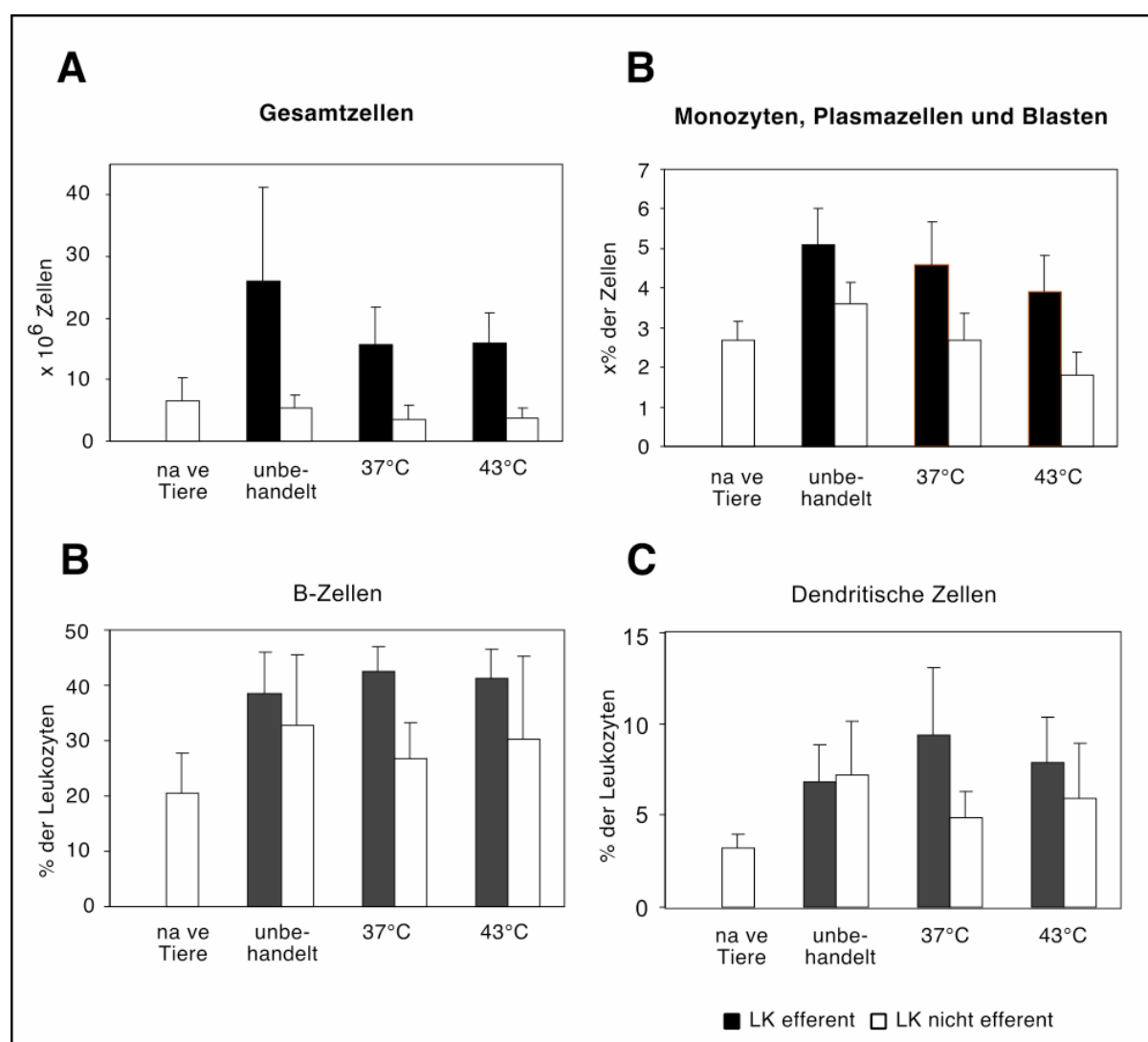


Abbildung 19: Leukozytenzahl und -differenzierung in den Lymphknoten

Die Zahl der Gesamtzellen wurde durchflußzytometrisch durch Zusatz von beads definierter Konzentration bestimmt. Die Differenzierung der Leukozyten erfolgte ebenfalls durchflußzytometrisch mittels markierter Antikörper. Dargestellt sind Mittelwert und Standardabweichung. n=5 für jeden Meßwert.

3.2.3 Leukozytendifferenzierung in den regionalen Lymphknoten nach HT

Die Leukozytendifferenzierung im Blut von C57BL/6-Mäusen mit B16-Melanom unterschied sich nicht von der naiver Mäuse. Auch nach Hyperthermie traten keine Veränderungen auf. In den regionalen Lymphknoten hingegen erhöhte sich die Gesamtleukozytenzahl in den efferenten Lymphknoten gegenüber den Lymphknoten naiver Tiere um das 5-fache, während sie in den nicht-efferenten Lymphknoten unverändert blieb (Abbildung 19). Der Anteil einer Population großer Leukozyten stieg bei tumortragenden Tieren auf 5% an im Vergleich zu 2,5 % bei naiven Tieren. Bei diesen Zellen handelt es sich um Monozyten und aktivierte Lymphozyten (Blasten). Nach Hyperthermie nahm der Anteil dieser Zellen auf 2 % ab. Der starke Anstieg der Leukozytenzahl beruht vor allem auf einer Expansion der B-Zell-Population. Sie steigt in den efferenten Lymphknoten tumortragender Tiere von 20 % auf fast 40 % der Leukozyten an. Ebenso steigt die Zahl der Dendritischen Zellen von 3,5 % auf 7 %.

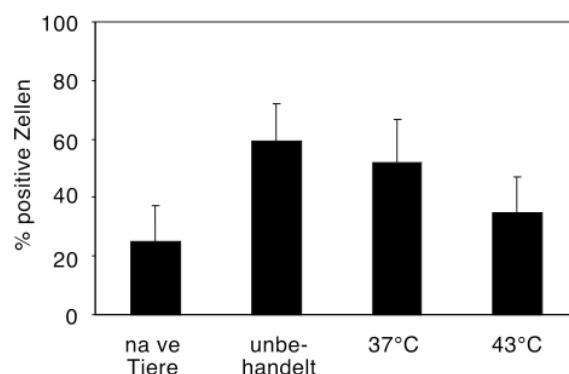


Abbildung 20: Phagozytose-Aktivität der Monozyten des peripheren Blutes
Peripheres Blut wurden bei 37°C 2 h mit fluoreszenzmarkiertem Dextran inkubiert. Ein Kontrollansatz wurde bei 4°C belassen. Die Analyse der Zellen erfolgte durchflußzytometrisch. Dargestellt sind Mittelwert und Standardabweichung. n=5 für jeden Meßwert.

3.2.4 Phagozytoseaktivität der Monozyten im Blut

Bei der Neustimulation einer Immunantwort wandern antigenpräsentierende Zellen aus dem Blut in das Gewebe ein. Dort phagozytieren sie Zelldebris und bauen die Proteine ab. Die entstehenden Peptide präsentieren sie über MHC II an T-Helfer-Zellen, um diese zu stimulieren. Antigenpräsentierende Zellen können zudem Peptide aus phagozytierten Antigenen über MHC I an zytotoxische T-Zellen präsentieren und diese aktivieren. Da

Antigenpräsentation eine wichtige Voraussetzung für die Ausbildung einer Immunantwort ist, wurde die Phagozytoseaktivität der Monozyten des peripheren Blutes untersucht. Tumortragende Tiere wiesen eine erhöhte Zahl Dextran-bindender oder -aufnehmender Zellen auf. Nach Hyperthermie sank diese Zahl wieder auf den Ausgangswert ab.

3.2.5 MHC II-Präsentation und B16F0-spezifische Antikörper nach Hyperthermie

Da vermutet wird, daß die wesentliche Immunantwort gegen das B16F0-Melanom Antikörper-vermittelt ist, habe ich die MHC II-Präsentation in den Lymphknoten untersucht. Antigenpräsentierende Zelle stimulieren über MHC II spezifische naive T-Helfer-Zellen. Diese aktivieren B-Zellen, welche das gleiche Peptid präsentieren, wie die antigenpräsentierende Zelle. Aktivierte B-Zellen beenden die Antigenaufnahmen und die MHC II-Präsentation. Die MHC II-Präsentation der Dendritischen Zellen ändert sich nach Hyperthermie nicht. Hingegen nimmt die Präsentation von B-Zellen deutlich ab. B16F0-spezifische Antikörper konnten in Western Blot und Immunfluoreszenz weder bei hyperthermierten noch bei unbehandelten Tieren gefunden werden.

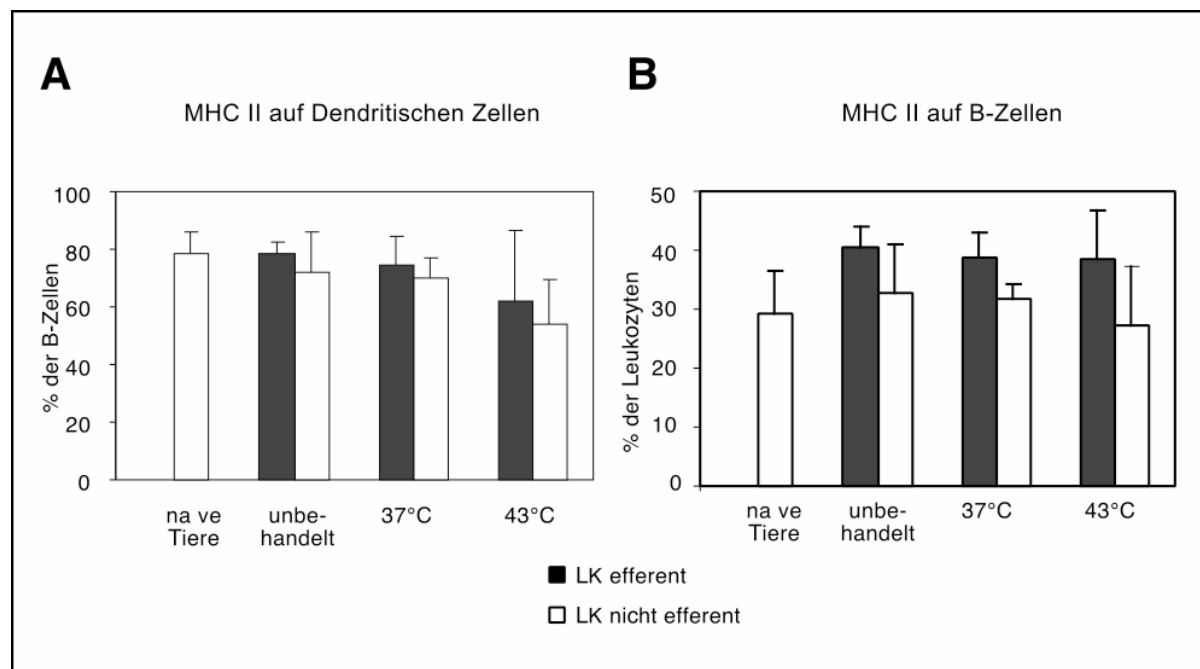


Abbildung 21: MHC II-Präsentation auf Dendritischen Zellen und B-Zellen 24 h nach regionaler Hyperthermie. Dargestellt sind Mittelwert und Standardabweichung. $n=5$ für jeden Meßwert.

3.2.6 Analyse der T-Zell-Proliferation mittels CFSE

Um die Migration und Proliferation gegen den Tumor gerichteter aktivierter Lymphozyten zu verfolgen, wurden CFSE-markierte Zellen intravenös injiziert. Da der Farbstoff CFSE von Proteinen gebunden wird und so bei der Mitose in gleichen Teilen an beide Tochterzellen weitergegeben wird, läßt sich durch die Fluoreszenzintensität der Zellen auf die Zahl der Zellteilungen rückschließen. Exemplarisch ist dies für eine *in vitro* ConA-stimulierte Lymphozyten-Kultur dargestellt (Abbildung 22). Nach etwa 8 Tagen beginnen unstimulierte Zellen ihre CFSE-Fluoreszenz zu verlieren, vermutlich aufgrund des eintretenden Zelltods. *In vitro* ist diese Methode also bis zu 6 Tagen nach Stimulation einsetzbar.

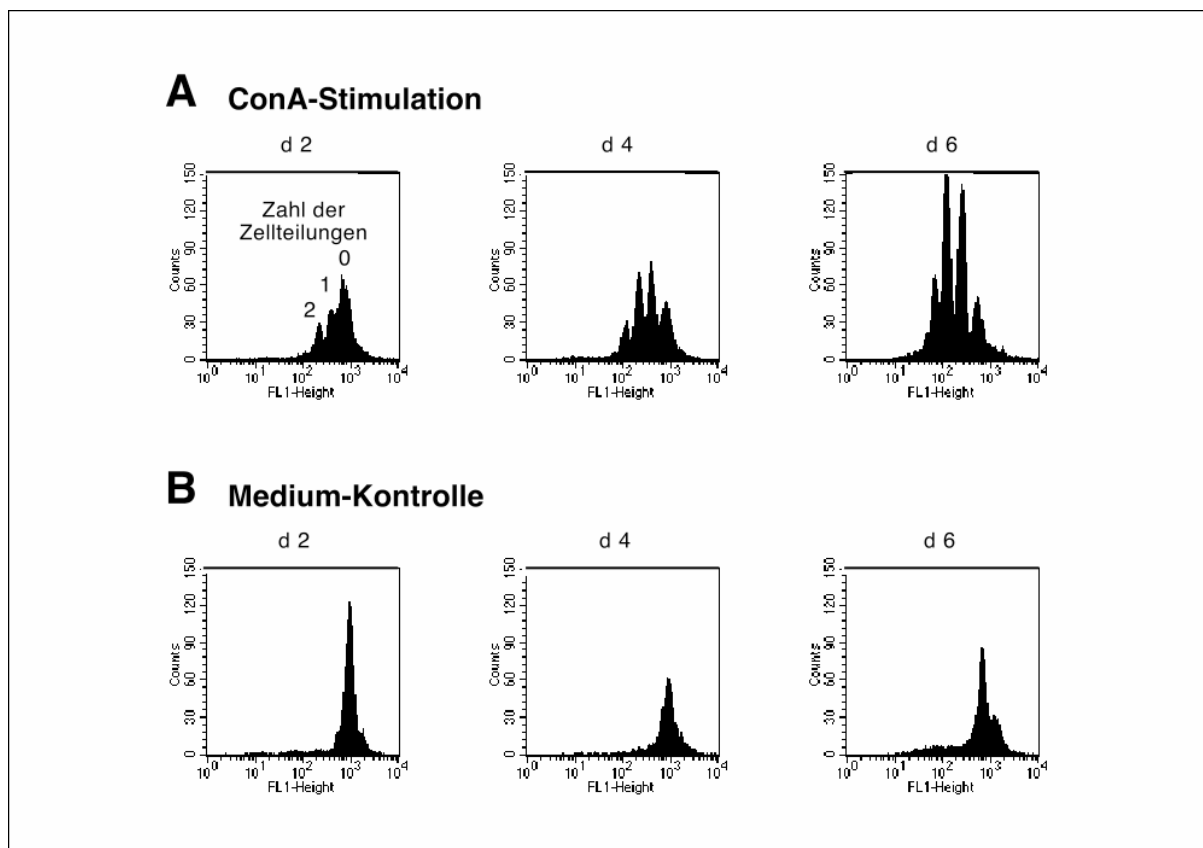


Abbildung 22: Analyse der Proliferation mittels CFSE *in vitro*

Lymphozyten der Milz einer naive Maus wurden mit CFSE markiert und mit 2,5 $\mu\text{g/ml}$ ConA stimuliert. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurde ein Aliquot entnommen und durchflußzytometrisch analysiert.

Zur Validierung dieses Verfahrens *in vivo* wurden C57BL/6-Mäuse intraperitoneal mit KLH ohne Zugabe von Adjuvans immunisiert und 9 Tage später getötet. Die Lymphozyten der Milz wurden mittels eines Dichtegradienten aufgereinigt und mit dem fluorisierenden Farbstoff CFSE markiert. $2,5 \times 10^7$ markierten Lymphozyten wurden intravenös in naive Mäuse injiziert, die zugleich eine intraperitoneale Immunisierung mit KLH erhielten. Nach 4 Tagen wurde diesen Tieren die Milz entnommen und die Lymphozyten durchflußzytometrisch analysiert (Abbildung 23). In diesem Modell ließen sich eindeutig CFSE-markierte Lymphozyten in der Milz, den periaortalen Lymphknoten und den Peyerschen Plaques des Darms nachweisen. Alle CFSE-markierten Zellen sind CD 45 positiv (Abbildung 23A). 20 % der Zellen sind T-Zellen und 80 % B-Zellen (Abbildung 23B). Von den B-Zellen haben sich 14 % mindestens einmal geteilt, von den T-Zellen 26 % (Abbildung 23B).

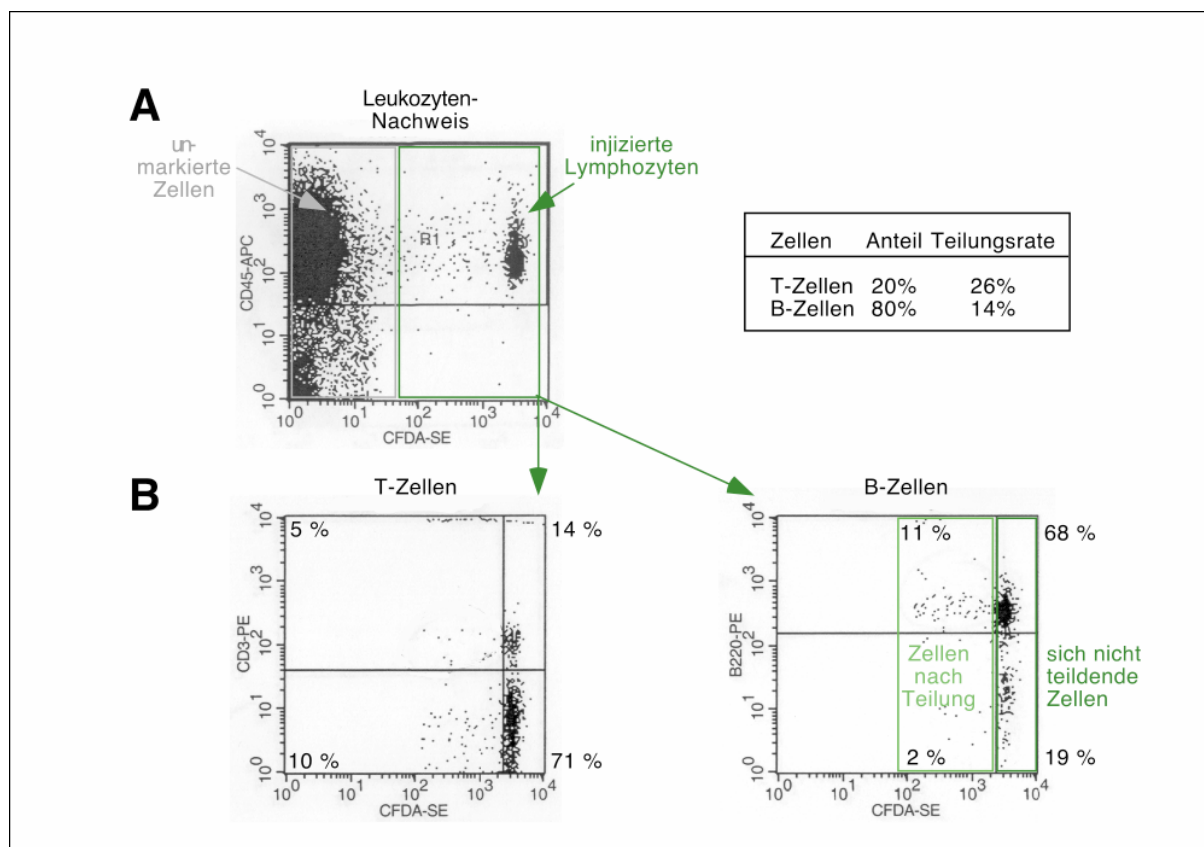


Abbildung 23: Analyse der Proliferation mittels CFSE *in vivo* Lymphozyten der Milz 4 Tage nach Immunisierung und intravenöser Injektion CFSE-markierter Lymphozyte aus immunisierten Mäusen. A: Leukozyten-Färbung der isoiierten Zellen mit α CD 45-Biotin und Streptavidin-Allophycocyanin; B: Nachweis von T- und B-Zellen mit α CD 3 und α B 220. Experimentelle Details sind im Text erläutert.

Um die T-Zell-Proliferation nach Hyperthermie zu analysieren, wurden Mäuse mit B16F0-Lysaten intraperitoneal immunisiert. Nach 9 Tagen wurde ihnen die Milz entnommen und die Lymphozyten isoliert. Die CFSE-markierten Lymphozyten wurden tumortragenden Mäusen intravenös injiziert. Nach 30 Minuten wurden die Tiere hyperthermiert. Die behandelten Tiere wurden 4 Tage später getötet und die mononukleären Zellen der Milz, sowie der Lymphknoten wurden isoliert. In der Milz und in den nicht-effferenten Lymphknoten hatten sich etwa 15-25 % der CFSE-positiven Zellen geteilt (Abbildung 24A und B). In den effferenten Lymphknoten waren es nur etwa 10 % (Abbildung 24C). Nach Hyperthermie änderte sich die Proliferation nicht.

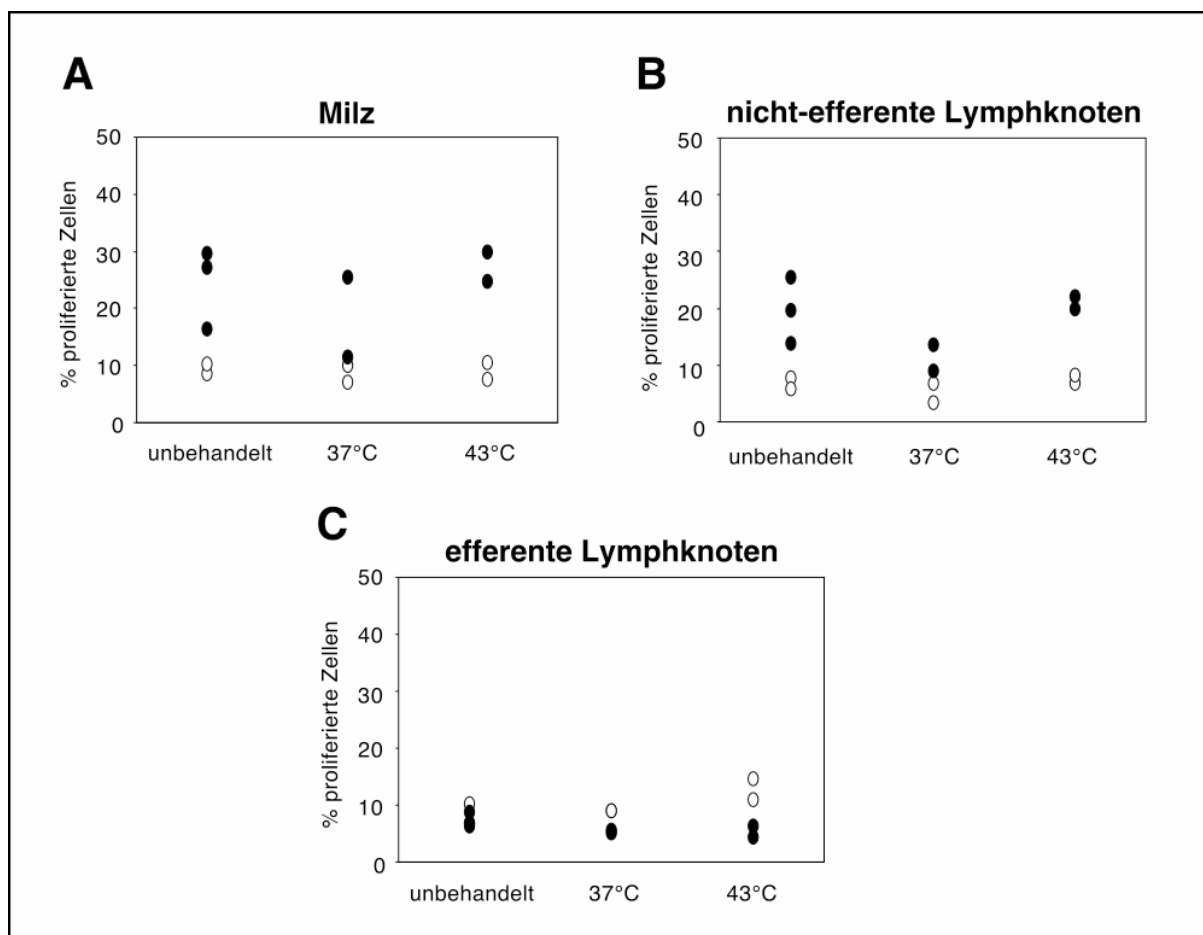


Abbildung 24: Proliferation von CFSE-markierten Zellen immunisierter Tiere nach Hyperthermie. Mäuse wurden mit Zelllysaten aus B16F0-Zellen in komplettem Freundschem Adjuvans immunisiert. Nach 9 Tagen wurden die mononukleären Zellen der Milz mit CFSE markiert und intravenös tumortragenden Tieren injiziert, die anschließend hyperthermiert wurden. 4 Tage später wurden die CFSE-positiven Zellen in Milz und Lymphknoten analysiert. A: Milz, B: nicht-effferente Lymphknoten, C: effferente Lymphknoten. Die Daten aus zwei unabhängigen Versuchen mit $n=2$ sind dargestellt. Weiß: Experiment 1, schwarz: Experiment 2.

3.2.7 *T-Zell-Rezeptor Exzisionszirkel (TREC) als Marker für die T-Zell Proliferation*

Um die Ergebnisse des Abschnitts 3.2.6 abzusichern und um die Proliferation der bei tumortragenden Tieren vorhandenen T-Zellen zu analysieren wurde eine Nachweismethode für T-Zell-Rezeptor-Exzisionszirkel aufgebaut.

Bei der somatischen Rekombination der TCR α -Kette werden die Genabschnitte, welche für die TCR δ -Kette codieren, ausgeschnitten und bleiben als zirkuläre DNA-Abschnitte in der Zelle erhalten Okazaki, Davis et al. 1987. Diese T-Zell-Rezeptor-Exzisionszirkel (TRECs) werden bei der Zellteilung nicht repliziert. Der Anteil an T-Zellen mit TRECs ist daher ein Maß für die Proliferation von T-Zellen. Die Gesamtzahl an T-Zellen mit TRECs in einem Organ gibt Aufschluß über die Immigration von T-Zellen.

Um die TREC-Analyse bei Mäusen zu etablieren, wurden circa 7-9 Wochen alte Mäuse mit Ovalbumin in Komplettem Freundschem Adjuvans immunisiert. Die Injektion erfolgte subkutan in die rechte hintere Extremität. Nach 9 Tagen wurden die efferenten Lymphknoten, sowie die Lymphknoten der nicht immunisierten Seite entnommen. Die Analyse der TRECs erfolgte zudem in Milz, Blut, Thymus und Knochenmark. Als Kontrolle dienten naive Tiere gleichen Alters. Der Versuch wurde mit C57BL/6-Mäusen und 129P2/OlaHsd-Mäusen durchgeführt.

Beide Mausstämme wiesen in den Lymphknoten 70-80 % CD3-positive Zellen auf, in der Milz 20-30 %, im Blut 30-40 %, im Thymus 10-2 % und im Knochenmark <5 %. Nach der Immunisierung nahm der Anteil der CD3-positiven Zellen in den efferenten Lymphknoten der Immunisierungsstelle deutlich ab ($p = 0,0472$ gegen naive Mäuse bei 129P2/OlaHsd-Mäusen), die absolute Zahl der CD3-positiven Zellen nahm jedoch zu ($p = 0,009$ gegen naive Tiere bei 129P2/OlaHsd-Mäusen, Abbildung 25). In den Lymphknoten der nicht immunisierten Seite, in der Milz und im Blut veränderte sich der Anteil der CD3-positiven Zellen ebenfalls leicht. Im Thymus von 129P2/OlaHsd-Mäusen nahm der Anteil der CD3-positiven Zellen zu ($p=0,009$ gegen naive Mäuse), während im Knochenmark unverändert wenig CD 3-positive Zellen nachweisbar waren. Die absolute Zahl der T-Zellen blieb in all diesen Organen konstant.

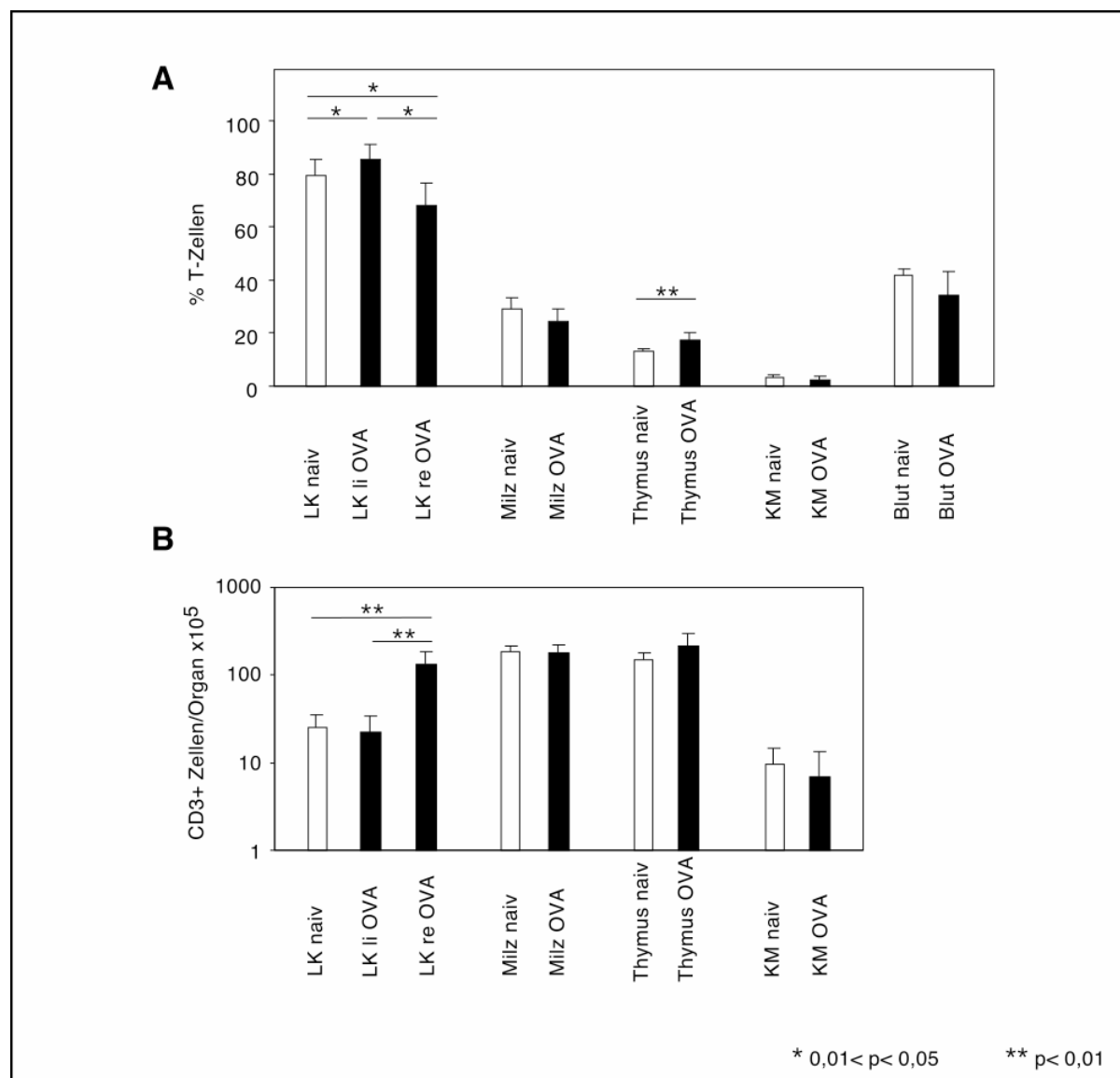


Abbildung 25: Etablierung des TREC-Nachweises (Teil 1)

Prozentualer Anteil (A) und absolute Zahl (B) der CD3-positiven Zellen in den primären und sekundären lymphatischen Organen 9 Tage nach subkutaner Immunisierung von 129P2/OlaHsd-Mäusen mit Ovalbumin in komplettem Freundschem Adjuvans in den rechten Unterschenkel. Weiß: naive Tiere, schwarz: immunisierte Tiere Dargestellt sind Mittelwert und Standardabweichung, n=5 in beiden Gruppen, Statistik: Mann Whitney U-Test.

Die Zahl der TRECs pro 1000 CD3-positive Zellen bewegte sich bei den beiden untersuchten Mausstämmen im Bereich von 20-50 in Blut, Lymphknoten und Milz (Tabelle 9). Im Thymus hatten C57BL/6-Mäuse deutlich weniger TRECs pro 1000 CD3-positive Zellen als 129-Mäuse (132 versus 640 pro 1000 CD3-positive Zellen, Tabelle 9). Im Knochenmark waren aufgrund der wenigen CD3-positiven Zellen nahezu keine TRECs nachweisbar. Nach Immunisierung zeigten die beiden Mausstämmen in der Zahl der TRECs pro 1000 T-Zellen Unterschiede (Abbildung 26 und Tabelle 9). Während bei C57BL/6-Mäusen eine leichte

Zunahme nachweisbar war (Tabelle 9, nicht signifikant), sinkt sie bei 129-Mäusen in Lymphknoten und Milz ab (Tabelle 9). Berechnet man die Zahl der TRECs pro Organ, so ist bei 129-Mäusen nach der Immunisierung eine leichte Abnahme in den nicht efferenten Lymphknoten, sowie eine leichte Zunahme in den efferenten Lymphknoten nachzuweisen (Tabelle 9). Im Knochenmark waren in beiden Mausstämmen weder vor noch nach Immunisierung TRECs nachweisbar.

Tabelle 9: Etablierung des TREC-Nachweises (Teil 2)

TRECs/1000 CD3-positive Zellen bei C57BL/6-Mäusen und 129P2/OlaHsd-Mäusen, sowie TRECs/Organ bei 129P2/OlaHsd-Mäusen 9 Tage nach Immunisierung mit Ovalbumin in komplettem Freundschem Adjuvans.

TRECs pro 1000 CD 3+ Zellen

	Thymus	Blut	Milz	Lymphknoten	
				naiv/ nicht efferent	efferent
129P2/OlaHsd naiv	573 ± 128	69 ± 18	45 ± 14	49 ± 23	—
129P2/OlaHsd immunisiert	349 ± 180	81 ± 83	33 ± 21	16 ± 7 p = 0,0283 gegen naive Tiere	24 ± 14 p = 0,0472 gegen naive Tiere
C57BL/6 naiv	153 ± 86	34 ± 16	46 ± 13	27 ± 8	—
C57BL/6 immunisiert	375 ± 232	33 ± 19	42 ± 8	30 ± 12	37 ± 12

TRECs pro Organ

	Thymus	Blut	Milz	Lymphknoten	
				naiv/ nicht efferent	efferent
129P2/OlaHsd naiv	$6,9 \times 10^7$ ± $2,2 \times 10^7$	—	$3,1 \times 10^6$ ± $1,7 \times 10^6$	$16,1 \times 10^4$ ± $8,9 \times 10^4$	—
129P2/OlaHsd immunisiert	$3,5 \times 10^7$ ± $1,7 \times 10^7$ p = 0,0275 gegen naive Tiere	—	$2,4 \times 10^6$ ± $1,4 \times 10^6$	$4,5 \times 10^4$ ± $3,9 \times 10^4$ p = 0,0472 gegen naive Tiere	$53,2 \times 10^4$ ± $41,5 \times 10^4$ p = 0,0163 gegen nicht-efferente LK

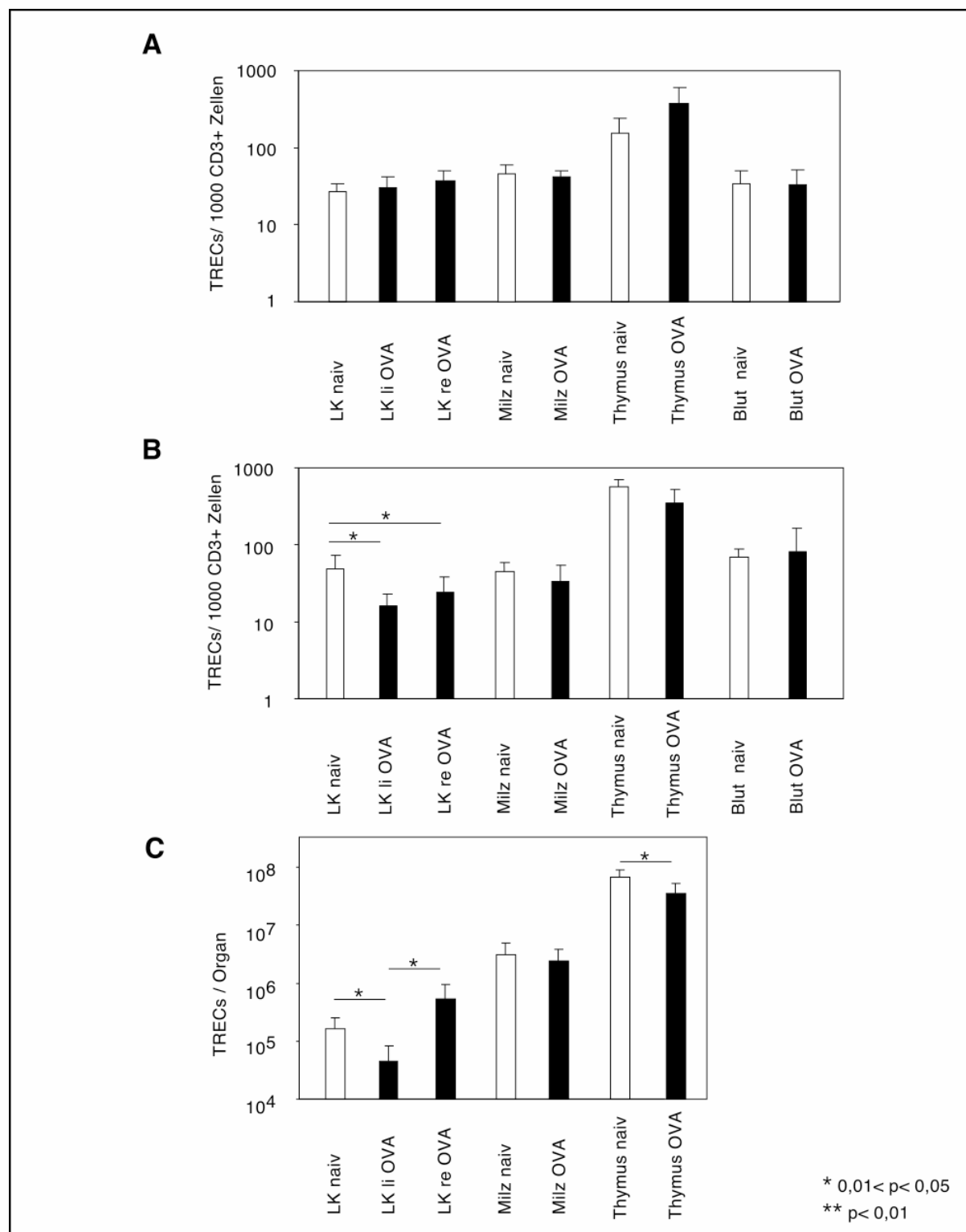


Abbildung 26: Etablierung des TREC-Nachweises (Teil 3)

TRECs/1000 CD3-positive Zellen bei C57BL/6-Mäusen (A) und 129P2/OlaHsd-Mäusen (B), Sowie TRECs/Organ bei 129P2/OlaHsd-Mäusen (C) 9 Tage nach Immunisierung mit Ovalbumin in komplettem Freundschem Adjuvans. Die Quantifizierung der TRECs erfolgte mittels quantitativer PCR. Weiß: naive Tiere, schwarz: immunisierte Tiere Dargestellt sind Mittelwert und Standardabweichung, n=5 in beiden Gruppen, Statistik: Mann Whitney U-Test.

In einem weiteren Versuch mit C57BL/6-Mäusen lag bei naiven Mäusen die Zahl der TRECs/ 1000 CD3+ Zellen in Lymphknoten und Milz höher (Lymphknoten: 150 TRECs/ 100 CD3+ Zellen, Milz: 210 TRECs/ 100 CD3+ Zellen). Bei tumortragenden Tieren änderte sich diese Zahl nicht. Auch bei Hyperthermie-Behandlung war keine Änderung zu sehen. Auffällig sind einige sehr hohe Werte und die starke Streuung (Abbildung 27).

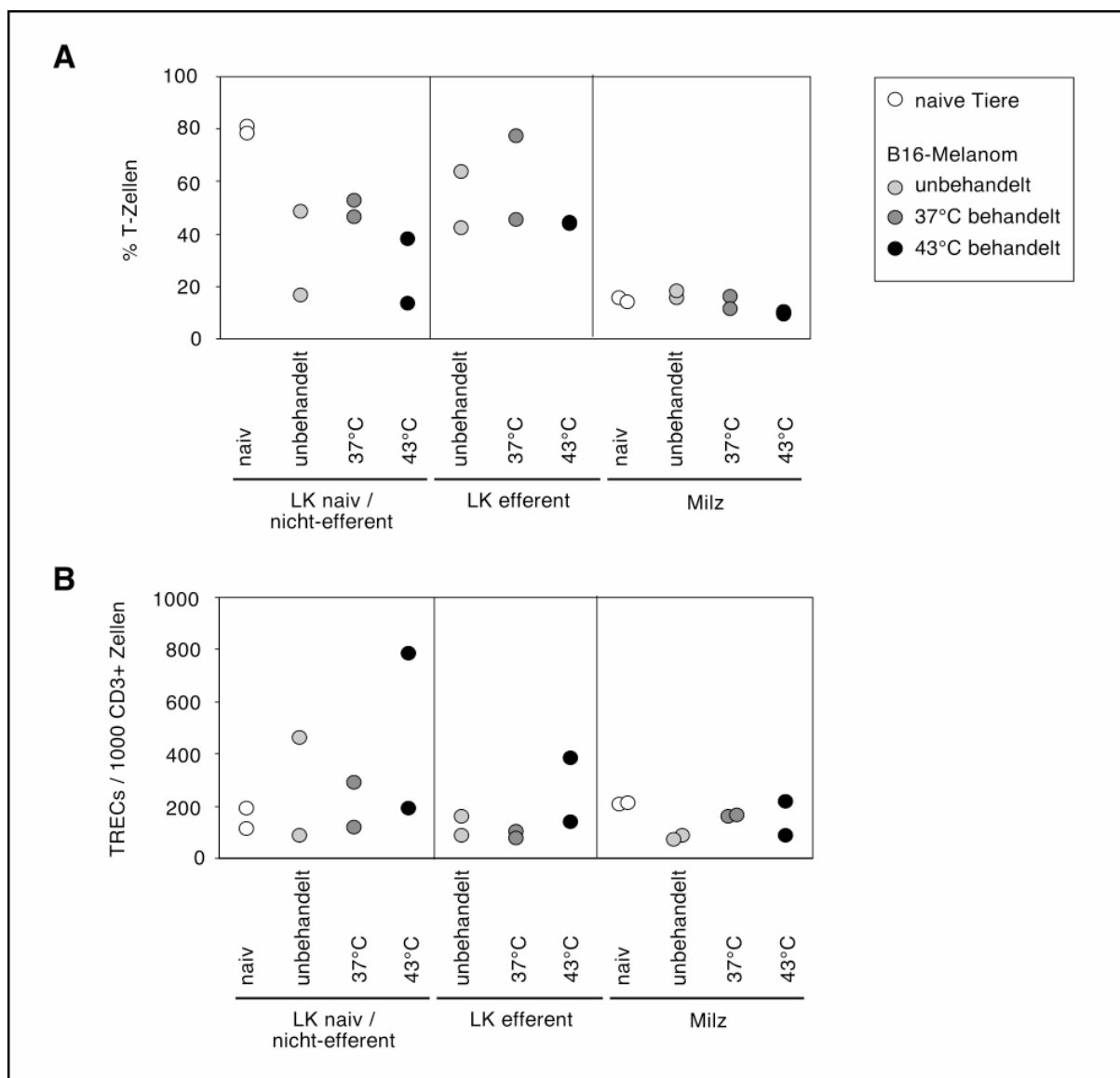


Abbildung 27: TREC nach Hyperthermie

Anteil der T-Zellen in den sekundären lymphatischen Organen und TREC/1000 CD3-positive Zellen bei C57BL/6-Mäuse mit B16-Melanom nach Hyperthermie

3.3 Antigenpräsentation nach Hyperthermie

Ausgehend von den dargestellten Daten stellte sich die Frage, ob nach Hyperthermie die Stimulation Tumor-spezifischer T-Zellen möglich ist. Daher wurde in einer weiteren Versuchsreihe die Expression eines melanosomalen T-Zell-Antigens nach Hyperthermie und der Einfluß der Therapie auf die Antigenprozessierung und -präsentation untersucht.

3.3.1 Expression Melanom-assoziiierter T-Zell-Antigene bei B16F0 nach Hyperthermie

Die Expression von Tyrosinase, eines für Melanome beschriebenen T-Zell-Antigens (Brichard, Van Pel et al. 1993), nach Hyperthermie wurde mittels Western Blot und RT-PCR überprüft. Die Kultur von B16F0-Zellen in Tyrosin-reichem DMEM oder in Tyrosin-substituiertem RPMI für 30-35 Stunden erhöhte die Tyrosinase-Expression deutlich (Abbildung 28A). Mindestens drei verschiedene Isoformen der Tyrosinase mit einem Molekulargewicht von 70-80 kD konnten nachgewiesen werden (Abbildung 28A und B). Mittels des Programms NIH Image wurde die Expression des Antigens im Western Blot quantifiziert. Das Auswertprinzip ist in Abbildung 28 dargestellt. In den folgenden Versuchen wurde, wenn nicht anders angegeben, Tyrosin-substituiertes RPMI verwendet.

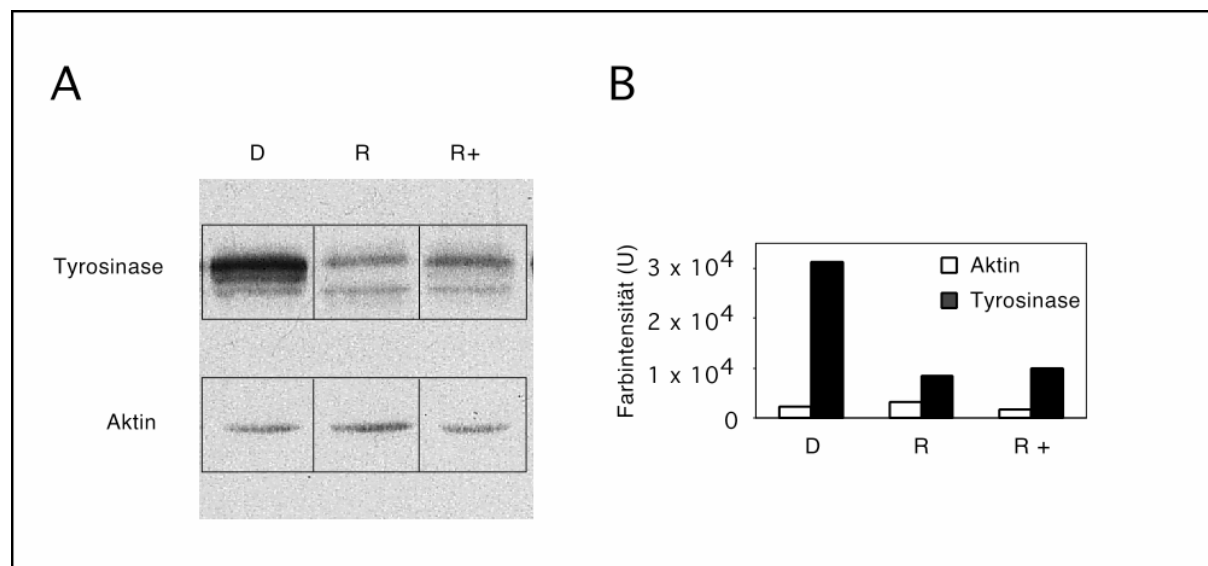


Abbildung 28: Tyrosinase-Expression von B16F0

B16F0-Zellen wurden 2 Tage in RPMI (20 mg/l Tyrosin, R) unter Zugabe von 50 mg/l L-Tyrosin (R+) oder in DMEM (72 mg/l Tyrosin, D) kultiviert. Je 25 µg Protein wurde mittels Western Blot analysiert. A: Ausschnittsvergrößerung aus dem Western Blot, B: Die Intensität der Färbung eines Kästchens wird über Flächenintegration bestimmt. Die Vermessung der Aktin-Bande ermöglicht die Normierung der Daten auf die Aktinmenge der Probe.

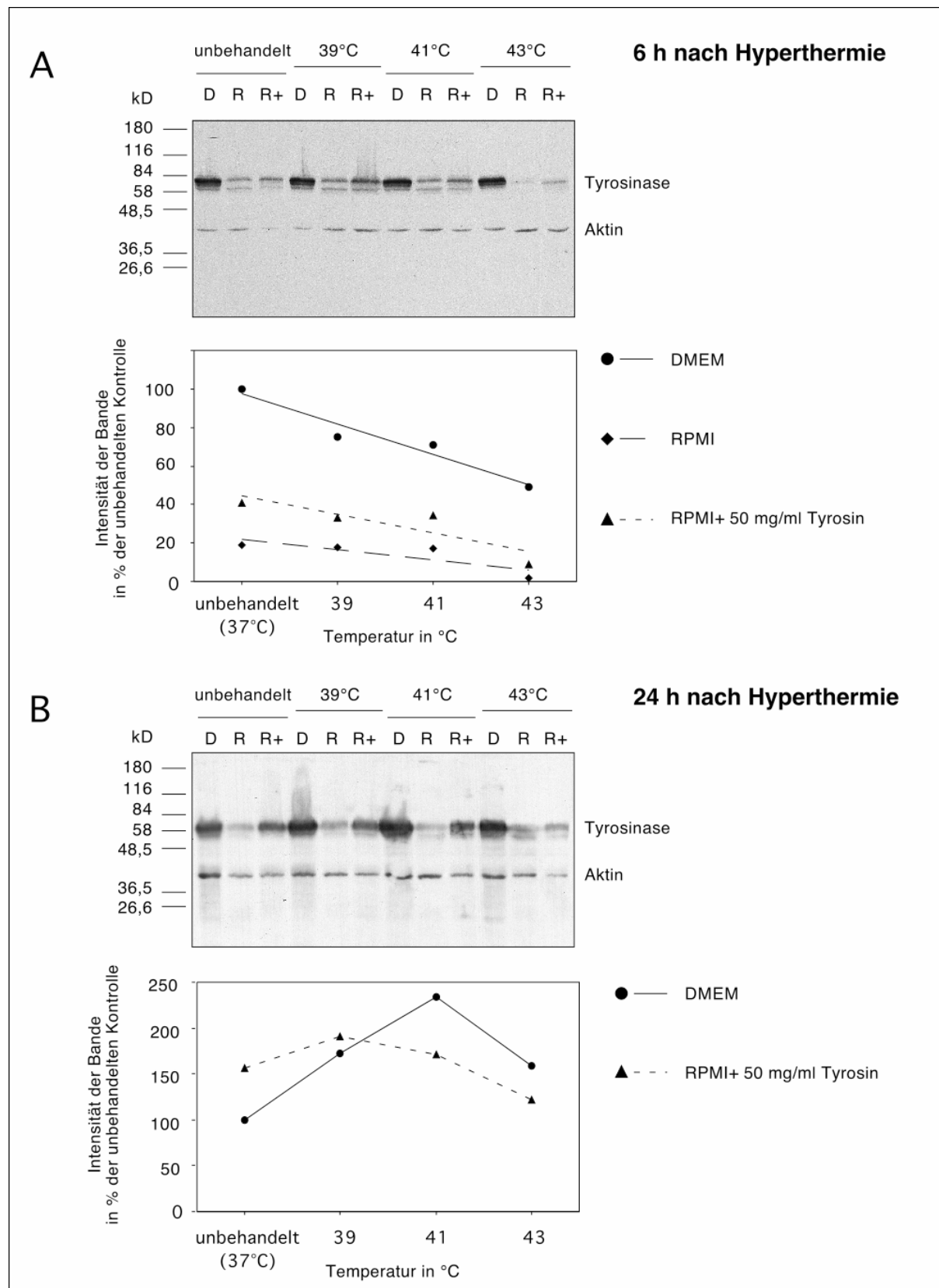


Abbildung 29 (vorhergehende Seite): Tyrosinase-Expression von nach Hyperthermie

A: Western Blot nach 6 h; B: Quantifizierung der Tyrosinase-Expression nach 6 h. Die Farbintensität der Aktin-Banden wurde ebenfalls gemessen und für jede Probe ein Korrekturfaktor ermittelt, um die Tyrosinase-Expression zu bestimmen; C: Western Blot nach 24 h.

In B16-Zellen, welche 30 Minuten hyperthermiert und anschließend für 6 Stunden bei 37°C inkubiert wurden, sank die Expression aller Tyrosinase-Isoformen auf etwa 1/3 bis 1/2 des Ausgangswertes (Abbildung 29A). 24 Stunden nach Hyperthermie war die Expression von Tyrosinase um den Faktor 1,5 bis 2,5 erhöht (Abbildung 29B). Um zu überprüfen, ob der Abnahme in den ersten Stunden nach Hyperthermie ein verstärkter Abbau oder eine verminderte Synthese von Tyrosinase zugrunde liegt, wurde die Halbwertszeit von Tyrosinase in B16F0-Zellen mit Cycloheximid bestimmt (Abbildung 30). Cycloheximid inhibiert die eukaryonten Ribosomen, so daß keine Neusynthese von Proteinen stattfindet (Obrig, Culp et al. 1971). Bei Inkubation der Zellen mit 1 µg/ml Cycloheximid nahm der Tyrosinase-Gehalt der Zellen schnell ab (Abbildung 30). Die Halbwertszeit des Proteins in B16F0-Zellen betrug etwa 2,5 Stunden, das heißt nach 6 Stunden sind noch 1/5-1/6 des zu einem Zeitpunkt gebildeten Proteins vorhanden.

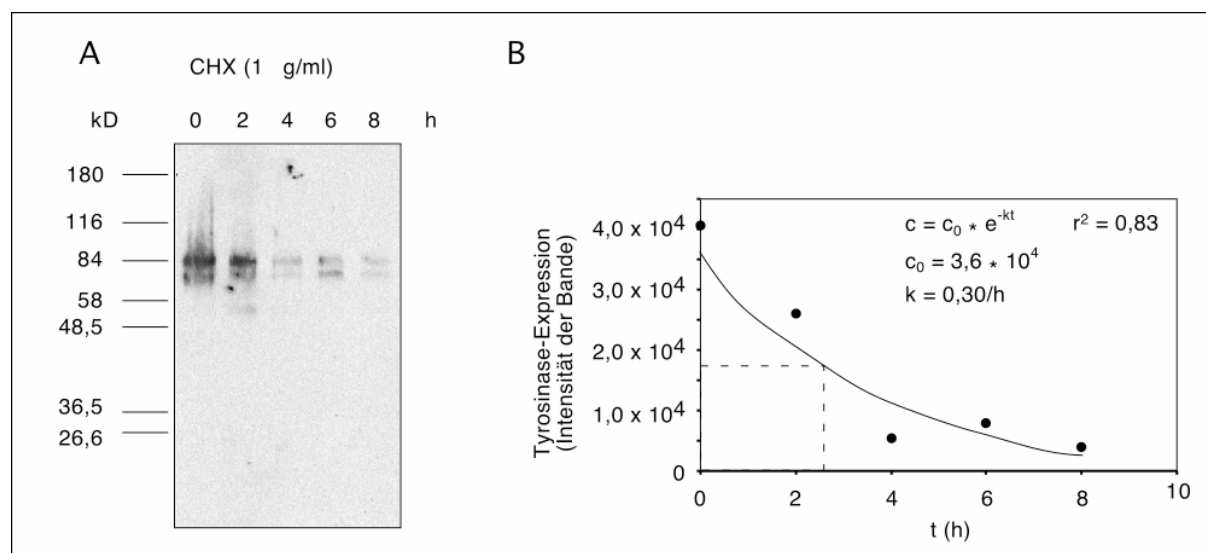


Abbildung 30: Halbwertszeit von Tyrosinase in B16F0-Zellen

B16F0-Zellen wurden vor Hyperthermie 1,5 Tage in RPMI unter Zugabe von 50 µg/ml L-Tyrosin kultiviert. Zum Zeitpunkt 00 wurde 1 µg/ml Cycloheximid zugegeben. A: Western Blot mit dem Gesamtprotein aus 10⁵ Zellen, B: Densitometrische Bestimmung der Tyrosinase-Expression und Bestimmung der Halbwertszeit. Experimentelle Details sind in den Beschreibungen von Abbildung 28 und Abbildung 29 angegeben.

Tabelle 10: Tyrosinase-mRNA in hyperthermierten B16F0-Zellen nach Hyperthermie
B16F0-Zellen wurden vor Hyperthermie 1,5 Tage in RPMI unter Zugabe von 50 µg/ml L-Tyrosin kultiviert. Dargestellt ist die Zahl der Zyklen bis zum Erreichen des Wendepunktes in der quantitativen RT-PCR am Lightcycler, sowie die Differenz zur unbehandelten Kontrolle. n.d.: nicht durchgeführt.

	Hyperthermie-temperatur	keine HT (37°C)	39°C		41°C		43°C	
		Zyklen	Zyklen	Δ	Zyklen	Δ	Zyklen	Δ
Experiment 1	1 h nach HT	15,89	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	17,38	1,49
	3 h nach HT	15,72	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	> 21	> 5,28
Experiment 2	3 h nach HT	15,99	16,48	0,49	15,9	-0,09	19,5	3,51
	6 h nach HT	10,46	16,15	5,69	16,0	5,54	17,64	7,18

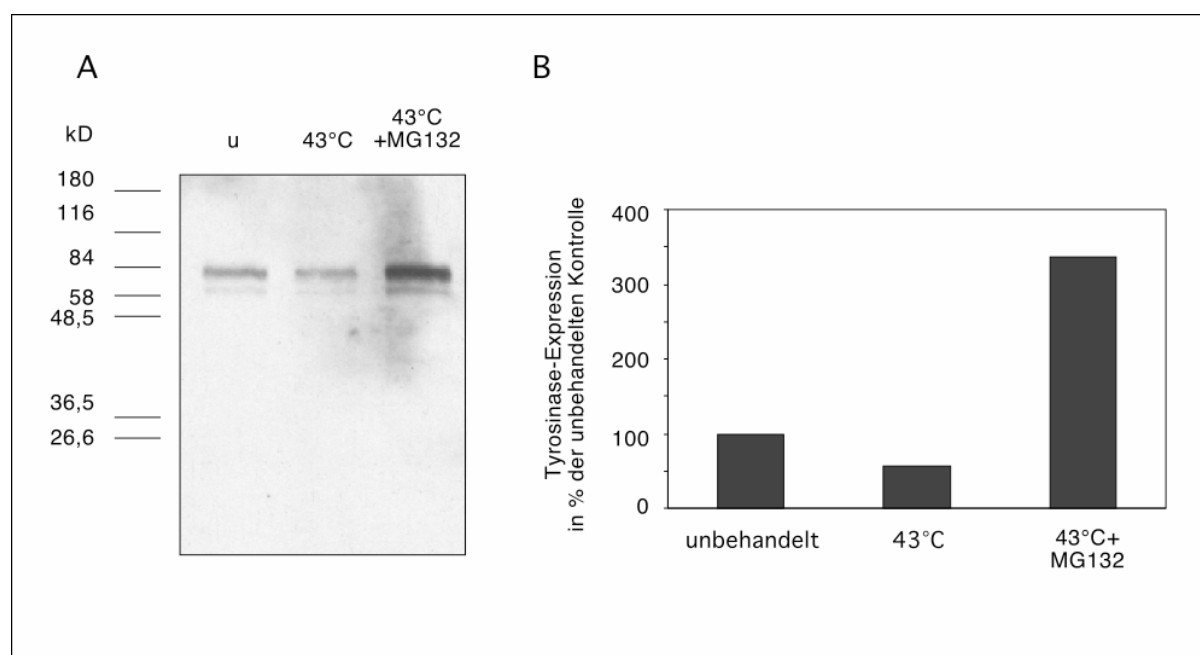


Abbildung 31: Proteasomaler Abbau von Tyrosinase nach Hyperthermie

B16F0-Zellen wurden 1,5 Tage in RPMI unter Zugabe von 50 µg/ml L-Tyrosin kultiviert. 10 min vor Hyperthermie wurde MG 132 (Endkonzentration 5 µM) zugegeben. A: Western Blot, B: Densitometrische Bestimmung der Tyrosinase-Expression. Experimentelle Details sind in den Beschreibungen von Abbildung 28 und Abbildung 29 angegeben.

Die Menge an nachweisbarer Tyrosinase mRNA sank 1 Stunde nach Hyperthermie, um 3-6 h nach Hyperthermie deutlich erniedrigt zu sein (Tabelle 10). In der quantitativen PCR von Gesamt cDNA aus hyperthermierten B16-Zellen wurde 1,5 Zyklen (1 h nach Hyperthermie) bis 7,2 Zyklen (6 h nach Hyperthermie) später als bei den unbehandelten Zellen der Wendepunkt der PCR erreicht. Wurde unmittelbar nach Hyperthermie der Proteasomen-Inhibitor MG 132 zugegeben, war 4 Stunden später der Tyrosinase-Gehalt der Zellen deutlich höher, als in den hyperthermierten Kontrollzellen ohne MG 132 (Abbildung 31).

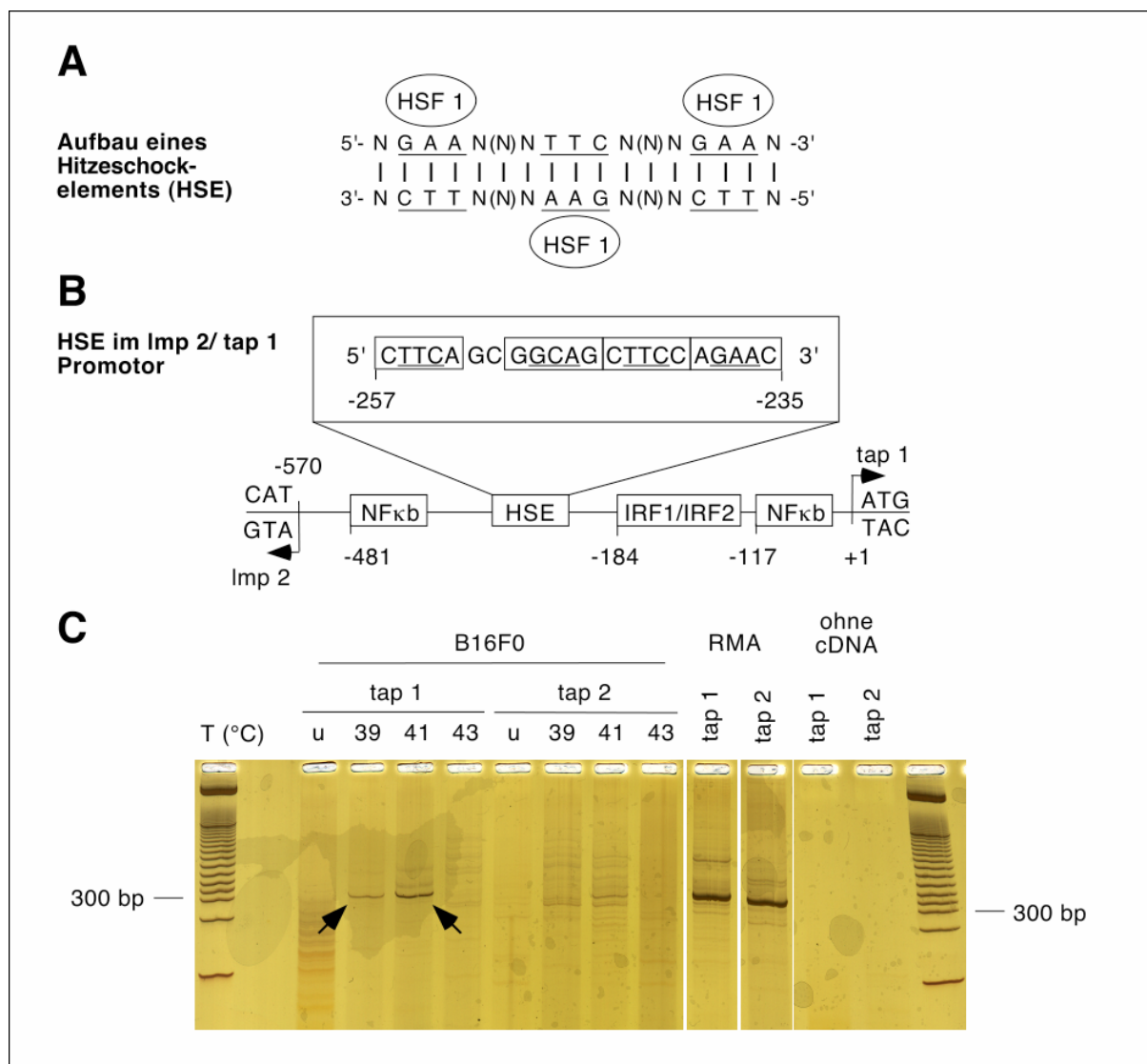


Abbildung 32: TAP 1-Transkription bei B16F0-Zellen nach Hyperthermie

A: Struktur eines Hitzeschockelements und Bindung eines HSF 1-Trimers, B: Hitzeschockelement mit 4 HSF 1-Bindungsstellen im Promotor von TAP 1, C: Expression von TAP 1 3 h nach Hyperthermie.

3.3.2 *TAP-Expression nach Hyperthermie*

In den folgenden Experimenten wurde untersucht, ob die beim proteasomalen Abbau von Tyrosinase gebildeten Peptide in das endoplasmatische Retikulum gelangen können, um dort an Hitzeschockproteine oder an MHC I-Komplexe gebunden zu werden. Der Peptidtransport geschieht über den TAP-Transporter. B16F0-Zellen exprimieren keine der beiden Untereinheiten des Transporters assoziiert mit Antigenprozessierung (TAP, Abbildung 32B). Eine Analyse der publizierten Promotorsequenzen (Genbank AF027865) ergab, daß im bidirektionalen Promotor der Gene *tap 1* und *Imp 2* ein Hitzeschockelement 257 bp vor dem Translationsstart von *tap 1* liegt (Abbildung 32A). Bei einer PCR mit cDNA aus B16F0-Zellen 3 Stunden nach Hyperthermie zeigte sich, daß die Transkription von *tap 1*, nicht aber von *tap 2* durch Hyperthermie induziert wird (Abbildung 32B).

3.3.3 *MHC I-Expression nach Hyperthermie*

Damit aktivierte zytotoxische T-Zellen tumorzellen erkennen und lysieren können, müssen diese antigene Peptide über MHC I präsentieren. Daher wurde im Folgenden untersucht, ob B16F0-Zellen nach Hyperthermie über MHC I präsentieren. Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten B16F0-Zellen exprimieren auf ihrer Zellmembran weder MHC I- und MHC II-Komplexe, noch die costimulatorischen Proteine CD 80 und CD 86 oder das in der immunologischen Synapse lokalisierte CD 54 (ICAM 1), wie in den Histogrammen in Abbildung 33A zu sehen ist. Aufgetragen ist die Zahl der Zellen gegen die Fluoreszenzintensität bei Färbung mit einem Fluorochrom-gekoppelten monoklonalen Antikörper gegen des jeweilige Antigen. Durch IFN γ läßt sich die Expression des MHC I-Allels H-2K^b induzieren, nicht jedoch die Expression von H-2D^b, CD 80, CD 86 oder ICAM 1 oder des MHC II-Allels H-2A^b (Abbildung 33B). Bei Kultur bei 26 °C Über Nacht findet keine Induktion der MHC I-Expression statt (ohne Abbildung). Auch nach der Zugabe MHC I-bindender Peptide über Nacht sind keine MHC I-Komplexe auf der Membran nachweisbar (ohne Abbildung).

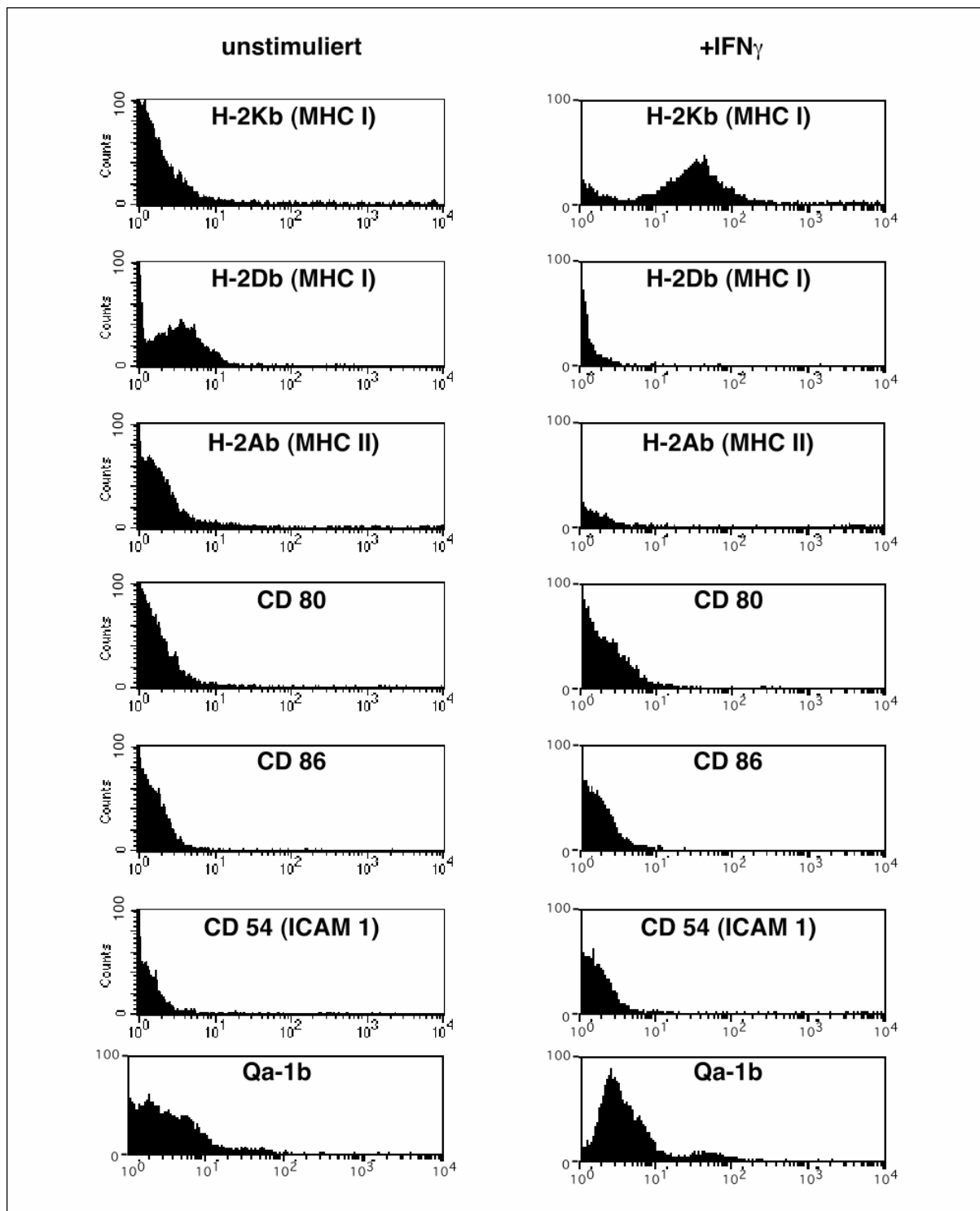


Abbildung 33: Immunstatus von B16F0-Zellen
B16F0-Zellen wurden über Nacht mit 1 ng/ml IFN γ stimuliert. Als Kontrolle dienen unstimulierte Zellen. Die Expression der dargestellten Oberflächenmarker wurde mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern durchfluß-zytometrisch bestimmt.

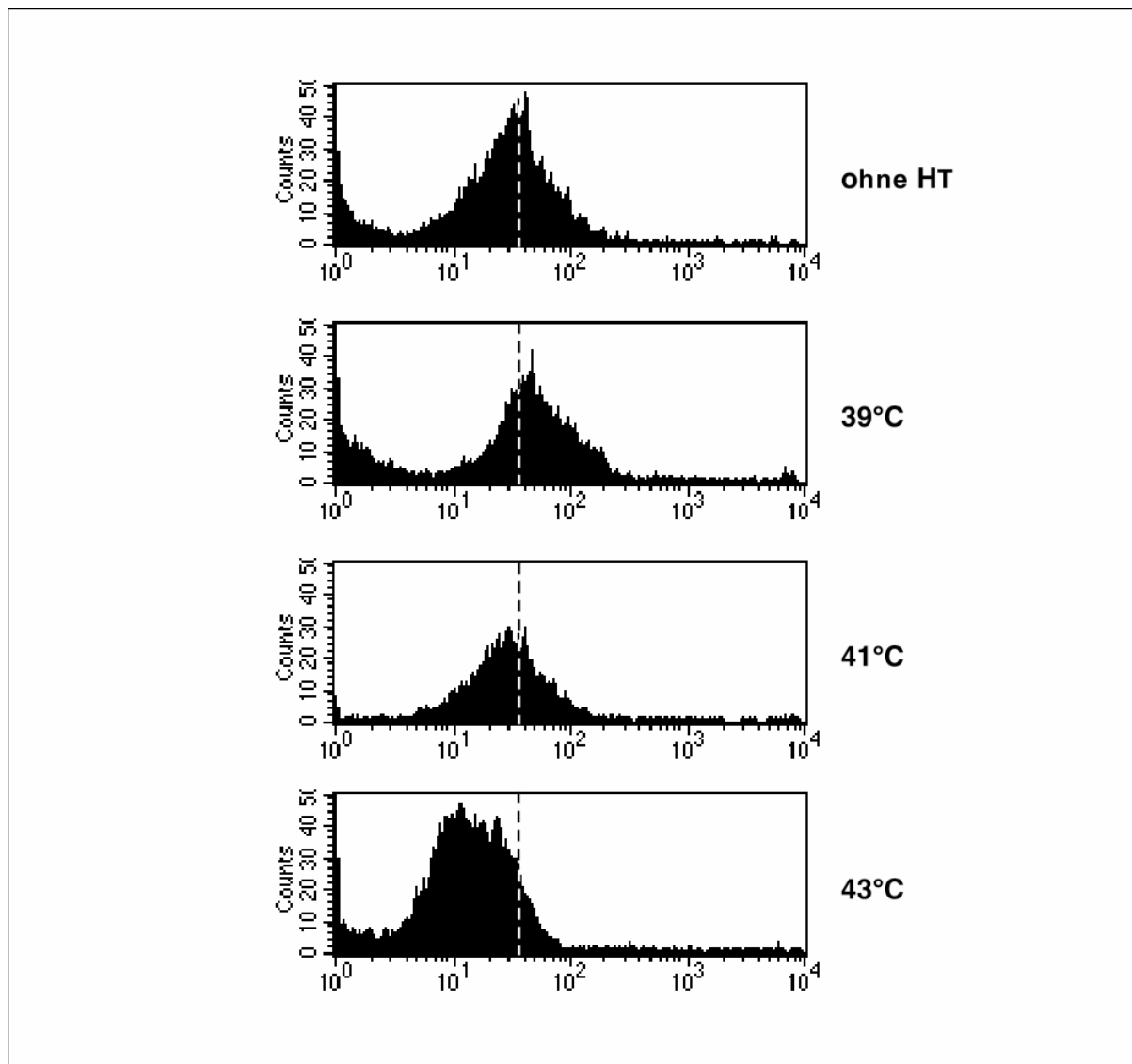


Abbildung 34: MHC I-Expression bei $IFN\gamma$ -vorstimulierten B16-Zellen nach Hyperthermie
B16F0-Zellen wurden über Nacht mit 5 ng/ml $IFN\gamma$ stimuliert. Anschließend wurden die Zellen hyperthermiert. Die Messung der H-2K^b-Expression erfolgte 3 Stunden nach Hyperthermie. Die gestrichelte Linie markiert die mittlere Fluoreszenzintensität der unbehandelten Kontrolle (erstes Histogramm).

B16F0-Zellen wurden zur Induktion der MHC I-Expression über Nacht mit 5 ng/ml $IFN\gamma$ inkubiert. Die Induktion wurde durch Waschen der Zellen in Medium gestoppt und sofort anschließend wurden die Zellen hyperthermiert. Bei 43°C war 3 Stunden nach Hyperthermie eine deutliche Abnahme der mittleren Fluoreszenzintensität bei der Färbung von MHC I (H-2K^b) auf der Zelloberfläche nachzuweisen (Abbildung 34, die gestrichelte Linie markiert die mittlere Fluoreszenzintensität der unbehandelten Kontrolle). Wurde $IFN\gamma$ unmittelbar vor

oder nach Hyperthermie zugegeben, verminderte sich die Neuinduktion der MHC I-Expression der Zellen, war jedoch nicht vollständig inhibiert (ohne Abbildung).

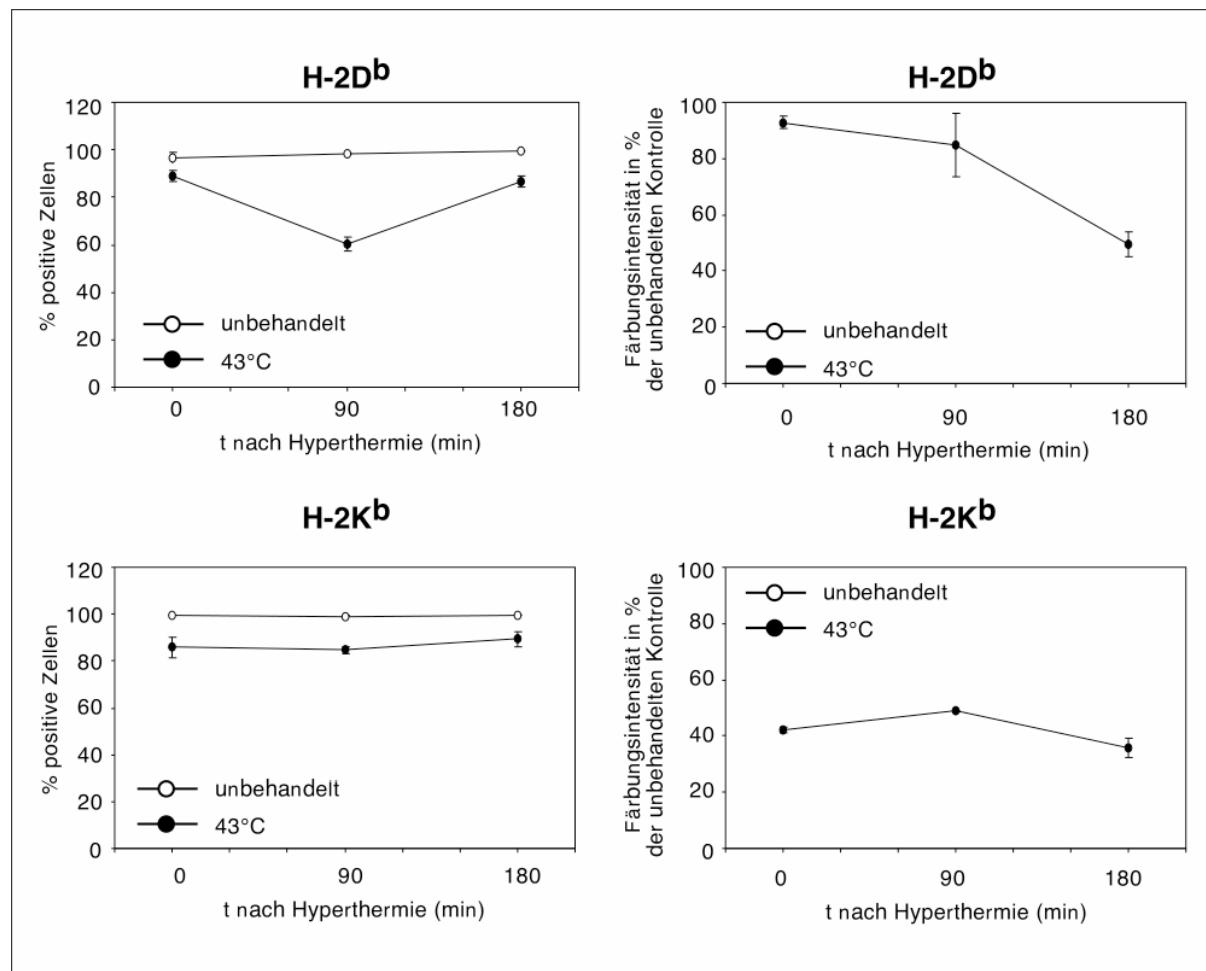


Abbildung 35: MHC-I-Expression bei RMA-Zellen nach Hyperthermie

RMA-Zellen wurden 30 min hyperthermiert und 0-180 min später geerntet. Die MHC-I Allele H-2D^b und H-2K^b wurden mittels fluoreszenzmakierter Antikörper nachgewiesen. Die Analyse erfolgte durchflußzytometrisch. Dargestellt sind der Anteil positiver Zellen, sowie die Expressionsstärke der positiven Zellen im Vergleich zu unbehandelten Zellen am Zeitpunkt $t=0$. Aufgetragen sind Einzelwerte, die durchgezogenen Line verbindet die Mittelwerte.

Zur Analyse der MHC I-Expression nach Hyperthermie wurde neben B16F0 als Modell eines MHC I-exprimierenden Tumors das RMA-Lymphom verwendet. RMA-Zellen wurden 30 Minuten im Wasserbad hyperthermiert. RMA-Zellen exprimieren konstitutiv die MHC-I-Allele H-2K^b und H-2D^b, nicht aber MHC-II (H-2A^b). Die Zahl der H-2D^b-exprimierenden Zellen sank 90 Minuten nach Hyperthermie auf 60 % ab und erreichte nach 180 Minuten wieder 90 % (Abbildung 35). Die H-2D^b-positiven RMA-Zellen wiesen 90-180 Minuten nach

Hyperthermie im Vergleich zu unbehandelten Kontrollzellen eine deutlich schwächere Fluoreszenzfärbung, das heißt eine niedrigere Zahl von H-2D^b-Komplexen auf der Membran auf. 180 Minuten nach Hyperthermie war die H-2D^b-Präsentation auf 50 % der unbehandelten Kontrollzellen gesunken. Auch das zweite MHC I-Allel H-2K^b wurde nach Hyperthermie schlechter exprimiert. Schon unmittelbar nach Hyperthermie betrug die H-2K^b-Präsentation nur 50 % der Kontrollzellen. Jedoch traten nach Hyperthermie keine H-2K^b-negativen Zellen auf. Die MHC I-Präsentation von RMA-Zellen war 24 Stunden nach Hyperthermie wieder vergleichbar mit der unbehandelten Zellen (ohne Abbildung).

3.4 Expression von Markern für NK-Zellen und $\gamma\delta$ T-Zellen nach Hyperthermie

Die Hitzeschockproteine HSP 72 und GP 96 werden bei manchen Tumorzellen auf der Zellmembran exprimiert. Beide können Peptide an $\gamma\delta$ T-Zellen präsentieren und so eine zytotoxische Reaktion gegen die Tumorzellen stimulieren. HSP 72 ist zudem ein aktivierendes Signal für NK-Zellen. Sowohl HSP 72/73, als auch GP 96 sind weder vor noch nach Hyperthermie auf der Membran von B16F0-Zellen exprimiert (Abbildung 36). HSP 73 ist bei unbehandelten B16F0-Zellen vermutlich im Kern, im endoplasmatischen Retikulum und in Vesikeln lokalisiert (A, A'), während GP96 im Zytoplasma nachweisbar ist (C, C'). Nach Hyperthermie bei 43°C verstärkt sich die ER-Lokalisation von HSP 72/73 und es sind nahezu keine HSP 72/73-enthaltenden Granula mehr zu sehen (B, B'). GP 96 befindet sich 3 h nach Hyperthermie bei 43°C gleichermaßen in endoplasmatischem Retikulum, Kern und Zytoplasma der Zellen (D, D').

Als weiteres Signal für NK-Zellen und $\gamma\delta$ T-Zellen kann das nicht-Klassische MHC I-Molekül Qa-1^b dienen. Als Modell einer Qa-1^b exprimierenden Zelllinie wurde ebenfalls das RMA-T-Zell-Lymphom des Thymus verwendet. Etwa 2-5 % der B16F0-Zellen exprimieren Qa-1^b. Damit ist ihre Expressionstärke vergleichbar mit RMA-Zellen. Die Zahl der Qa-1^b-präsentierenden Zellen steigt nach Hyperthermie von 2,5 % auf fast 10 % an, während die Stärke der Präsentation bei den positiven Zellen um 50 % sinkt. (Abbildung 37).

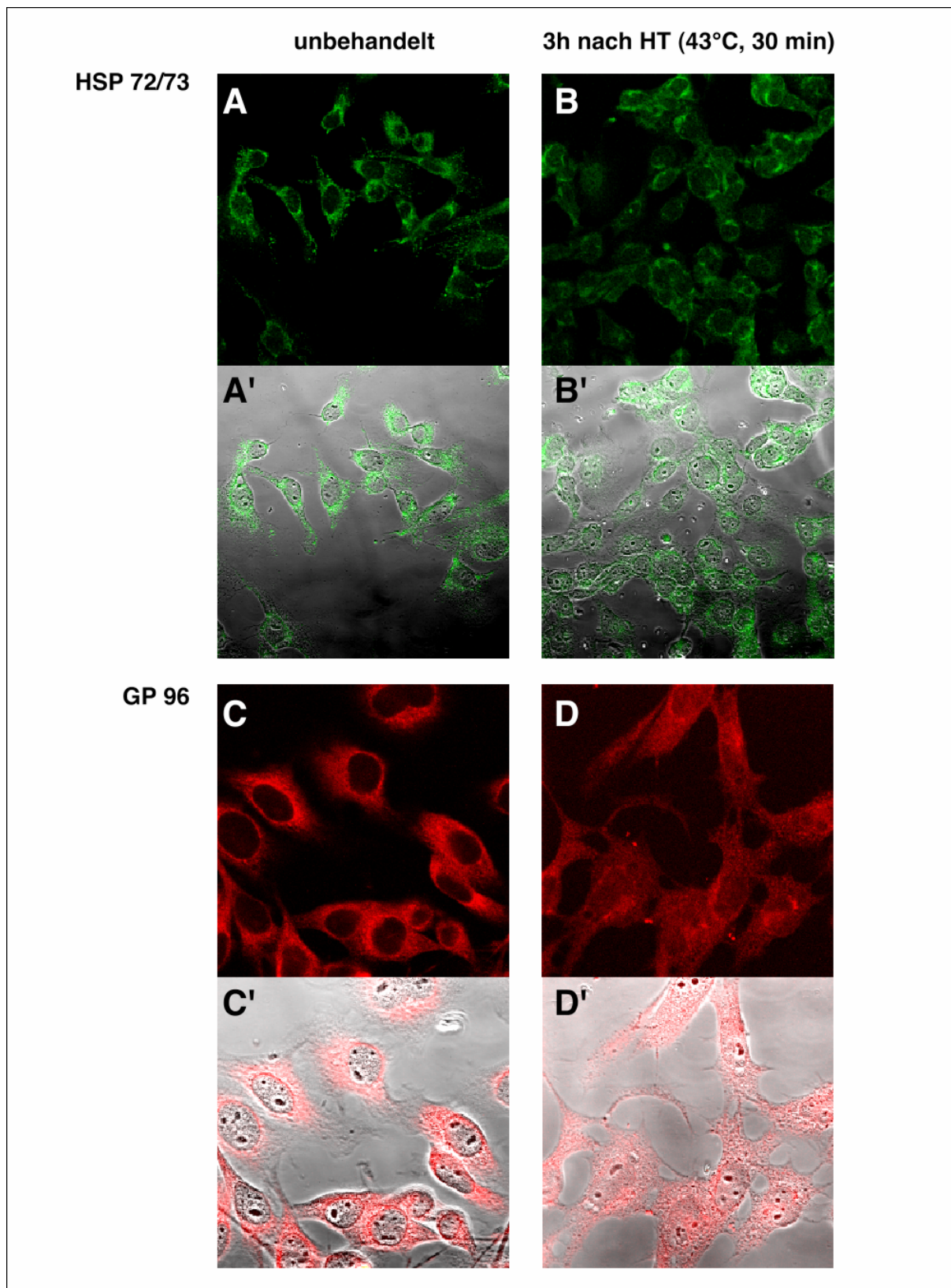


Abbildung 36: Zelluläre Lokalisation von HSP 72/73 und GP 96 nach Hyperthermie. Die Zellen wurden 3 h nach Hyperthermie mit 100 % Ethanol fixiert. Die Analyse erfolgte am Konfokalmikroskop. A-D: Fluoreszenzaufnahmen, A'-D': Überlagerung Durchlicht und Fluoreszenz.

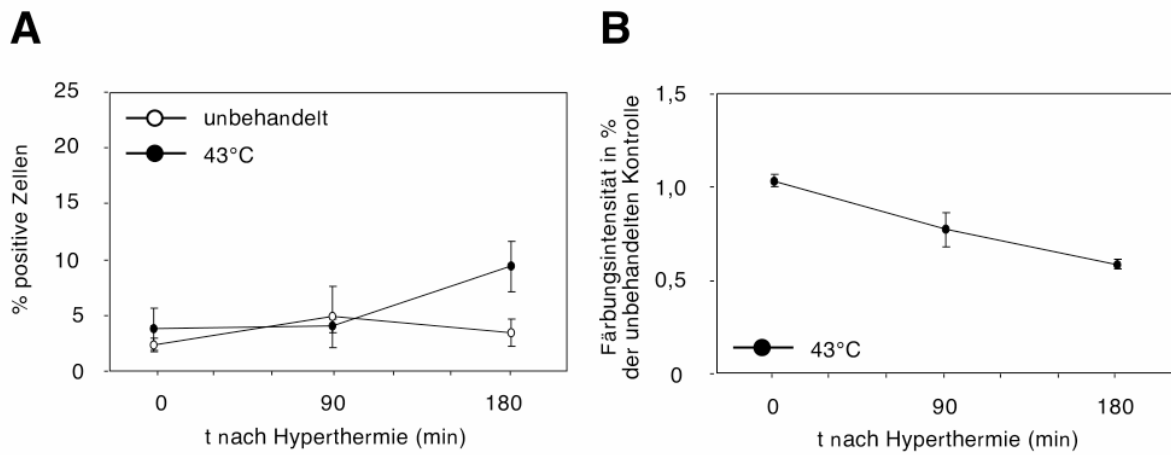


Abbildung 37: *Qa-1b-Expression bei RMA-Zellen nach Hyperthermie*
RMA-Zellen wurden 30 min hyperthermiert und 0-180 min später geerntet. Das nicht-klassische MHC-I Allel *Qa-1^b* wurde mittels fluoreszenzmakierter Antikörper nachgewiesen. Die Analyse erfolgte durchflußzytometrisch. Dargestellt sind Einzelwerte, die durchgezogenen Linie verbindet die Mittelwerte.