

## 4 Diskussion

Ziel der vorliegenden Arbeit war zu prüfen, ob die regionale Hyperthermie von Tumoren eine spezifische Immunantwort auf diesen Tumor induzieren oder verstärken kann, um Ansatzpunkte für eine Kombination aus Hyperthermie und Immuntherapie zu entwickeln. Als Modell wurde das murine B16F0-Melanom gewählt, da es in syngene Mäuse transplantierbar ist und einige Melanozyten-Differenzierungs-Antigene exprimiert, die auch bei Menschen in der Immunantwort auf Melanome eine wesentliche Rolle spielen. Zudem ist es durch eine Fülle von Publikationen gut definiert.

### 4.1 Freisetzung von Hitzeschockproteinen nach Hyperthermie

Wird eine Zelle hyperthermiert oder gerät sie auf andere Art unter Streß, so kann sie über die Expression von Hitzeschockproteinen die zellulären Funktionen aufrechterhalten und sich so vor dem Zelltod schützen. Stirbt sie dennoch, so werden durch den Tod der Zellen intrazelluläre Proteine freigesetzt. Die darunter befindlichen Hitzeschockproteine können eine Immunantwort gegen Proteine der toten Zelle induzieren, indem sie als Zytokine auf antigenpräsentierende Zellen wirken. Des weiteren können Proteine der HSP 70- und der HSP 90-Familie antigene Peptide aus Tumorzellen in den MHC I-Präsentationsweg von antigenpräsentierenden Zellen schleusen, so daß diese tumorspezifische zytotoxische T-Zellen aktivieren können. Hitzeschockproteine haben demzufolge neben ihrer Aufgabe, die Zelle vor dem Tod zu bewahren, die Funktion, im Falle des pathologischen Zelltods das angeborene Immunsystem zu aktivieren. In einer ersten Versuchsreihe wurde daher die Expression und Freisetzung von Hitzeschockproteinen, sowie das Ausmaß des Hyperthermie-induzierten Zelltods untersucht.

#### 4.1.1 *Hyperthermie-induzierter Zelltod von B16F0-Zellen und -Tumoren*

B16F0-Zellen zeigten bei einer Hyperthermie-Temperatur von 43°C einen erhöhten Anteil nekrotischer Zellen mit Membranschädigungen und spätapoptotischer Zellen mit einem erniedrigten DNA-Gehalt, nicht jedoch bei 41°C oder weniger. Die erhöhte Rate des Zelltods spiegelt sich wieder in der erniedrigten Koloniebildungsrate und einer kleineren Koloniegröße, die auf langsames Wachstum der Kolonien schließen läßt. Auch andere Autoren zeigten für B16-Zellen nach Hyperthermie verstärkten Zelltod und langsames

Wachstum. (Leibovici, Klorin et al. 1991; Oliveira Filho, Bevilacqua et al. 1997). Einhergehend damit erniedrigte sich in jenen Experimenten die Geschwindigkeit, mit der sich hyperthermierte B16-Zellen nach Injektion in Mäuse zu soliden Tumoren entwickeln (Leibovici, Klorin et al. 1991). Dabei nahm jedoch die Tumorigenität der Zellen, also die Fähigkeit, sich zu einem soliden Tumor zu entwickeln, erst nach 30-minütiger Hyperthermie bei 46°C vor Tumortransplantation ab — einer Temperatur, die in der klinischen Therapie nicht realisierbar ist (Leibovici, Klorin et al. 1991). Andere Autoren konnten bei der Hyperthermie von B16-Tumoren in vivo bei 43,5°C und 1 Stunde Hyperthermiedauer ein langsames Tumorwachstum erzielen (Stojkovic and Radacic 2002). In der vorliegenden Arbeit konnte bei einer etwas niedrigeren Temperatur und kürzerer Therapiedauer keine Reduktion des Tumorwachstums nachgewiesen werden.

#### ***4.1.2 Expression der Hitzeschockproteine HSP 72 und GP 96 nach Hyperthermie***

B16F0-Melanomzellen exprimieren konstitutiv das zur HSP 90-Familie gehörende GP 96, sowie HSP 73. Nach Hyperthermie bei 43°C war im Western Blot für HSP 72 und HSP 73 eine Doppelbande zu sehen. Das leichtere der beiden Proteine, welches vermutlich HSP 72 entspricht, wird nur nach einer Behandlung bei 43°C exprimiert. Während Primaten HSP 72 konstitutiv exprimieren, wird es bei Nagern nur nach Streß gebildet (Welch and Mizzen 1988). GP 96 wird in B16F0-Zellen konstitutiv stark exprimiert. Eine hitzeinduzierte Verstärkung der Expression war nicht nachzuweisen. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, daß 24 Stunden nach Hyperthermie sowohl das hitzeinduzierbare HSP 72, als auch sein konstitutiv exprimiertes Analogon HSP 73 im zellfreien Überstand von B16-Melanomzellen zu finden sind. Auch das konstitutiv stark exprimierte GP 96 ist nach Hyperthermie der Zellen nachweisbar. Alle drei Hitzeschockproteine sind wahrscheinlich durch den nekrotischen Zelltod der B16F0-Zellen in das Medium gelangt, da eine Sekretion von Hitzeschockproteinen nicht bekannt ist. Bei Analyse der subzellulären Verteilung der Hitzeschockproteine HSP 72 und HSP 73, sowie GP 96 am Konfokalmikroskop fiel auf, daß die Lokalisation der drei Proteine nicht der in der Literatur beschriebenen entspricht. HSP 72 und HSP 73 waren vornehmlich im endoplasmatischen Retikulum, aber auch in Vesikeln und im Kern nachweisbar. GP 96 hingegen zeigte eine klare zytoplasmatische Fluoreszenz. Wurden die Zellen bei 43°C hyperthermiert, war nach 3 Stunden HSP 72/73 nur noch im endoplasmatischen Retikulum und im Kern nachweisbar, während GP 96 nach Hyperthermie nicht nur im Zytoplasma, sondern auch im Kern lokalisiert ist.

In Abbildung 38 ist zusammenfassend dargestellt, wie Hyperthermie zur Freisetzung von Hitzeschockproteinen führt, die antigene Peptide gebunden haben können.

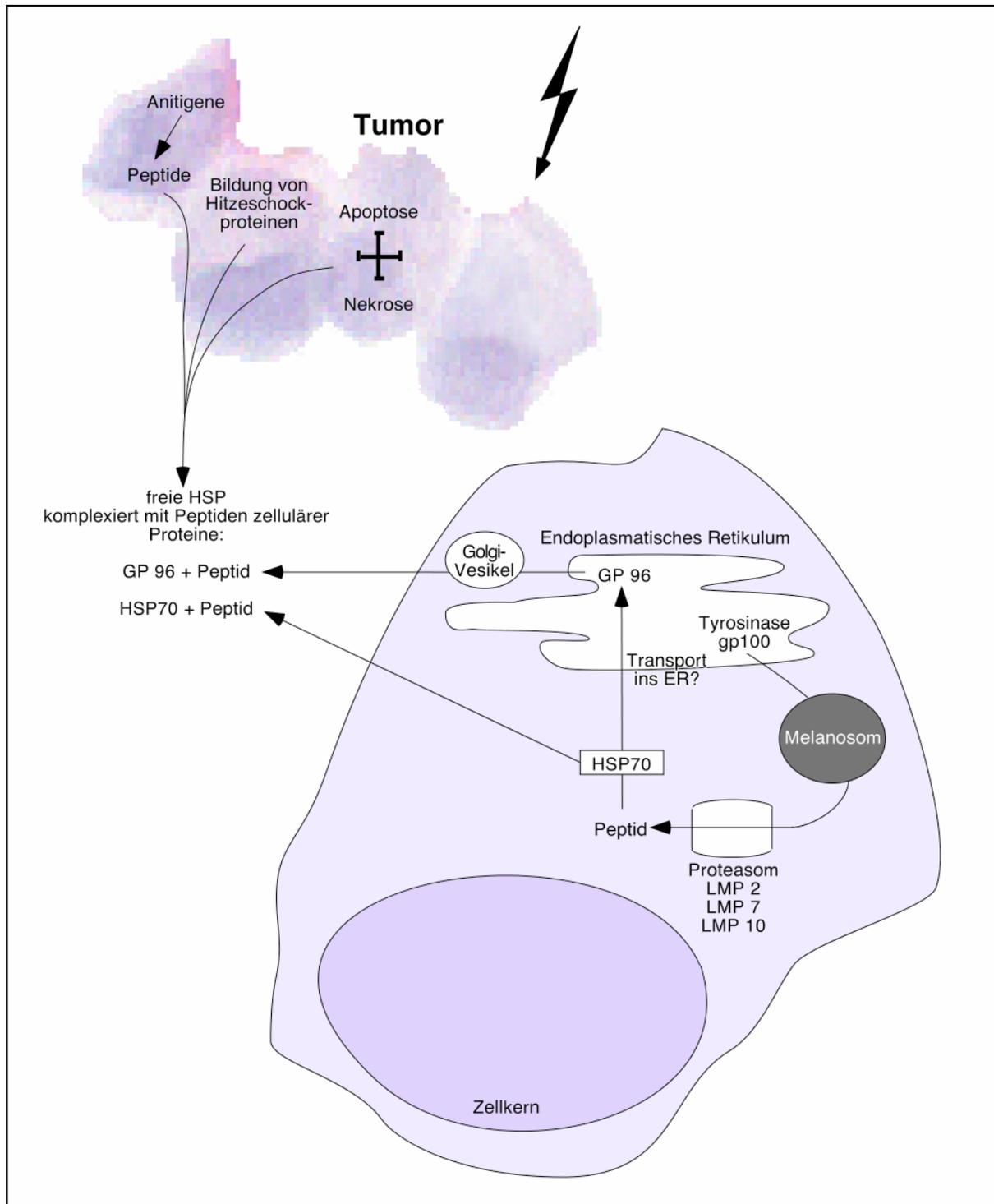


Abbildung 38: Freisetzung von Hitzeschockproteinen nach Hyperthermie

### **4.1.3 Phagozytose von hyperthermierten B16F0-Zellen durch Dendritische Zellen**

In den letzten Jahren wurde vielfach gezeigt, daß Dendritische Zellen lösliche Hitzeschockproteine Rezeptor-vermittelt oder durch Pinozytose aufnehmen und die an diese Hitzeschockproteine gebundenen Peptide in den MHC I-Präsentationsweg einschleusen können. Mit Hilfe von T-Zell-Klonen bzw. TCR-transgenen Mäusen wurde nachgewiesen, daß antigenpräsentierende Zellen, die mit Hitzeschockproteinen aus Tumorzellen inkubiert wurden, tumorspezifische T-Zellen aktivieren können (Udono and Srivastava 1993; Arnold, Faath et al. 1995; Blachere, Li et al. 1997). Es wurde vermutet, daß dieses Crosspriming eine Rolle in der spezifischen Anti-Tumor-Immunantwort spielen könnte. Vermutlich können auch Peptide von Hitzeschockproteinen aus Fragmenten toter Tumorzellen in den MHC I-Weg eingeschleust werden (Suto and Srivastava 1995). Daher wurden in der vorliegenden Arbeit untersucht, ob Dendritische Zellen, die mit hyperthermierten B16F0-Zellen kokultiviert wurden, Material der B16F0-Zellen phagozytieren. Es konnte gezeigt werden, daß die nach Hyperthermie von sterbenden B16F0-Zellen freiwerdenden Zellfragmente von Dendritischen Zellen aufgenommen werden. Die erhöhte Phagozytose des B16F0-Debris nach Hyperthermie kann zum einen auf der größeren Menge des Debris und zum anderen auf der Aktivierung der Dendritischen Zellen durch darin enthaltenen Hitzeschockproteine sein. Da die Zellen vor Hyperthermie mit dem Membranfarbstoff DiI gefärbt wurden, ist davon auszugehen, daß membranumgebene zelluläre Vesikel oder apoptotische Körperchen aufgenommen wurden. Die Aufnahme von im Medium gelösten Proteinen, die durch nekrotischen Zelltod freigesetzt sind, wurde nicht untersucht. Es ist jedoch bekannt, daß Dendritische Zellen Hitzeschockproteine Rezeptor-vermittelt aufnehmen, so daß davon ausgegangen werden kann, daß sie auch die nach Hyperthermie im Medium gelösten HSP 72/73 und GP 96 aufgenommen haben.

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß 30 Minuten Hyperthermie beim B16F0-Melanom bis 41°C keinen Einfluß auf den Zelltod und auf die Synthese von Hitzeschockproteinen hat. Nach einer Hyperthermie bei 43°C hingegen zeigte sich eine Zunahme des apoptotischen ebenso wie des nekrotischen Zelltods, die zur Freisetzung von Hitzeschockproteinen führte. Dendritische Zellen phagozytierten Debris von B16F0-Zellen, die zuvor bei 43°C hyperthermiert worden waren, weitaus stärker, als jenen von unbehandelten Zellen. Ursache kann sowohl eine größere Menge an vorhandenem Debris wie auch die Aktivierung der Dendritischen Zellen durch darin enthaltenen Hitzeschockproteine sein. Auf dem Weg über

Dendritische Zellen, die Material aus hyperthermierten B16F0-Zellen einschließlich der darin enthaltenen Hitzeschockproteine aufnehmen, ist es daher möglich, durch Hyperthermie-induzierten Zelltod eine spezifische Immunantwort gegen das B16F0-Melanom auszulösen.

## **4.2 Charakterisierung eines Mausmodells der regionalen Hyperthermie**

Die im letzten Abschnitt diskutierten Ergebnisse zum Tod von B16F0-Zellen und zur Freisetzung von Hitzeschockproteinen nach Hyperthermie zeigten, daß es ein geeignetes Modell zur Untersuchung der Immunstimulation nach regionaler Hyperthermie ist. Daher wurde mit dem B16F0-Melanom ein Mausmodell der regionalen Hyperthermie aufgebaut. Bei Arrhenius-Analysen der Wirkung eines Hitzeschocks auf Zellen hatte man festgestellt, daß bei 42,5°C eine Veränderung eintrat, und vermutete daher, daß für eine effektive Behandlung von Tumoren das Überschreiten dieser Temperatur nötig sei (Field 1988). In Übereinstimmung damit setze in der vorliegenden Arbeit bei 43°C die Expression von HSP 72 ein und trat zugleich vermehrt der Tod von Tumorzellen ein. Daher wurde für die Behandlung der Mäuse als Hyperthermie-Temperatur 43°C gewählt. Die Hyperthermie-Dauer betrug wie in den zuvor dargestellten Zellkulturversuchen 30 Minuten.

### **4.2.1 Entwicklung des Mausmodells**

Da die Tumore für die regionale Hyperthermie zugänglich sein mußte, wurden sie subkutan in eine hintere Extremität transplantiert. Eine Transplantation in den Schwanz wurde als ungeeignet erachtet, da die assymetrische Tumortransplantation in eine Extremität den Vergleich der efferenten Lymphknoten mit den korrespondierenden Lymphknoten der anderen hinteren Extremität derselben Tiere ermöglichte. Es zeigte sich, daß das B16-Melanom bei subkutaner Transplantation lymphogen metastasiert. Da es Hinweise auf eine Verstärkung der Metastasierung nach Hyperthermie gibt (Nathanson, Haas et al. 1987; Nathanson, Nelson et al. 1991; Oliveira Filho, Bevilacqua et al. 1997), wird derzeit in einem unabhängigen Projekt innerhalb der Arbeitsgruppe die Metastasierung des B16F0-Melanoms nach regionaler Hyperthermie untersucht. Um die hämatogene Metastasierung, die für Melanome untypisch ist, zu vermeiden, wurden die Tumore nicht subkutan in den Schwanz transplantiert, wo sie leicht in die Blutgefäße durchbrechen.

Die Therapie wurde durchgeführt, wenn die Tumore einen durchschnittlichen Durchmesser von 10 mm erreicht hatte. In diesem Stadium weisen sie Merkmale vollständig ausgebildeter

Tumore auf, wie Invasivität und Vaskularisierung. Da die Tumore bis zum Erreichen dieser Größe etwa 10-14 Tage wuchsen, konnte zudem eine Immunantwort gegen den Tumor stattfinden. Zu diesem Zeitpunkt ist wegen der hohen Wachstumsgeschwindigkeit bei B16-Tumoren jedoch kaum noch möglich, therapeutisch eine Verlangsamung oder einen Rückgang des Tumorwachstums zu erzielen. Daher wurden bei der Analyse des Mausmodells die Immunantwort gegen den Tumor betrachtet, obwohl keine klinische Verbesserung eintrat.

Bei den ersten Hyperthermie-Behandlungen zeigte sich, daß die Tiere unter erheblichem Streß litten. Wegen des bekannten Einflusses von akutem Streß auf das Immunsystem war es wichtig, die Belastung der Tiere zu mindern. Narkose stellte sich als ungeeignet heraus, da unter Narkose die Körpertemperatur der Tiere stark absank. Wurde ein Bein der narkotisierten Tiere in einem 43°C warmen Bad behandelt, schwankte die Körpertemperatur zwischen 37°C und 35°C. Wegen der großen Unterschiede in der Kerntemperatur der behandelten Tiere war es nicht möglich, unter Narkose temperaturabhängige Effekte zu untersuchen. Statt dessen wurden die Tiere für alle folgenden Versuche durch die Gabe des Benzodiazepams Midazolam sediert. Von diesem Medikament ist bekannt, daß es die Körpertemperatur nur leicht senkt (Kurz, Sessler et al. 1995). Für Midazolam sind bis auf die Inhibition der Freisetzung proinflammatorischer Mediatoren bei Mastzellen (Bidri, Royer et al. 1999) keine immunologischen Wirkungen beschrieben.

Aufgrund der in diesem Projekt gewonnenen Daten zum Zelltod und zur Synthese und Freisetzung von Hitzeschockproteinen wurde zur Therapie der B16-F0Tumore in vivo eine Temperatur von 43°C gewählt. Eine Temperaturkontrolle im Tumor wurde nicht durchgeführt, da nur invasiv zu verwendende Sonden zur Verfügung standen, die die Narkotisierung der Tiere während der Behandlung erfordert hätten. Es ist bekannt, daß sich subkutane Tumore bei Wasserbad-Hyperthermie innerhalb von 1,5 Minuten auf 43°C erwärmen (Imamura, Seki et al. 1998), so daß von einer schnellen Aufheizung des Tumors ausgegangen werden konnte.

#### ***4.2.2 Histologie und Leukozyteninfiltration des Tumors nach Hyperthermie***

Nach Hyperthermie der Tumore in vivo waren in Kryoschnitten Bereiche mit zerstörter Zellstruktur zu erkennen, welche auf nekrotisch gestorbene Zellen hinweisen. Jedoch war keine Verlangsamung des Tumorwachstums zu sehen. Es ist bekannt, daß Hyperthermie bis 43°C das Wachstum von B16-Tumoren nicht beeinflusst (Wahl, Brustad et al. 1979;

Leibovici, Klorin et al. 1991). Hyperthermie bei 43,5°C für 60 Minuten hingegen kann das Wachstum der B16-Tumore deutlich verlangsamen, aber ebenfalls nicht verhindern (Stojkovic and Radacic 2002). B16F1-Zellen, die vor Tumoringjektion hyperthermiert wurden, wachsen zwar etwas langsamer zu einem soliden Tumor an, doch die Tumoren erreichen die gleiche Größe wie bei unbehandelten Zellen und führen ebenso zum Tod der Tiere (Leibovici, Klorin et al. 1991). In den hier vorgestellten Versuchen war die Versorgung des Tumors mit Blutgefäßen nach Hyperthermie ebenso wie die mikroskopisch sichtbare Struktur der Blutgefäße nicht verändert. Hyperthermie hat demzufolge wahrscheinlich keinen langfristigen Einfluß auf die Versorgung des Tumors mit Nährstoffen. Es ist bekannt, daß die Durchblutung von Tumoren während der Applikation einer Wasserbad-Hyperthermie deutlich erhöht ist (Peck and Gibbs 1983). Da sich auch die Permeabilität des Endothels erhöht, können Leukozyten ebenso wie im Serum gelöste Stoffe leichter in den Tumor gelangen (Avery, Nathanson et al. 1992).

Die Infiltration der zentralen Bereiche der Tumore durch Leukozyten war schwach. Nur im Randbereich waren Regionen mit starker Infiltration zu sehen. Die infiltrierenden Zellen waren weder Dendritische Zellen, noch T-Zellen. Auch Makrophagen waren nur vereinzelt im Tumor nachweisbar. Andere Autoren haben für das B16-Melanom das gleiche histologische Bild beschrieben (Todryk, Melcher et al. 1999). In Tumoren HSP 72-transfizierter B16-Melanome fanden sie zudem einige T-Zellen, Dendritische Zellen und Neutrophile Granulozyten. In der vorliegenden Arbeit nahm die Infiltration in den zentralen Bereichen der Tumore nach regionaler Hyperthermie jedoch nicht zu. Ursache für die fehlende Infiltration der Tumore könnte sein, daß B16-Zellen T-Zellen in die Apoptose treiben können (Fishman, Irena et al. 2001).

#### ***4.2.3 Leukozytendifferenzierung in den regionalen Lymphknoten nach Hyperthermie***

Tiere mit B16F0-Tumoren weisen in den efferenten Lymphknoten eine deutlich erhöhte Zahl von Leukozyten auf. Ein großer Teil dieser Zellen sind B-Zellen. Aber auch die Zahl der Dendritischen Zellen und der Makrophagen steigt während der immunologischen Auseinandersetzung mit dem Tumor an. Die lymphatische Drainage von Tumoren ist während der Applikation einer Wasserbad-Hyperthermie verstärkt, so daß man eine vermehrte Migration der Leukozyten aus dem Randbereich der Tumore in die Lymphknoten erwarten kann (Avery, Nathanson et al. 1992). Unter diesen könnten sich

antigenpräsentierende Zellen befinden. Jedoch konnte 24 Stunden nach Hyperthermie kein erhöhter Anteil antigenpräsentierender Zellen in den drainierenden Lymphknoten nachgewiesen werden.

#### ***4.2.4 Phagozytoseaktivität der Monozyten im peripheren Blut***

Antigenpräsentierende Zellen können Peptide aus phagozytierten Antigenen in das Zytoplasma schleusen, proteasomal abbauen und über MHC I an zytotoxische T-Zellen präsentieren. Aufgrund ihrer costimulatorischen Fähigkeiten können sie auf diesem Weg zytotoxische T-Zellen aktivieren. Hierzu sind andere Zellen, einschließlich Tumorzellen, meist nicht in der Lage. Die Aktivierung der zytotoxischen T-Zellen wird so durch antigenpräsentierende Zellen kontrolliert. Da Antigenpräsentation eine wichtige Voraussetzung für die Ausbildung einer Immunantwort ist, wurde die Phagozytoseaktivität der Monozyten des peripheren Blutes untersucht. Die Monozyten des peripheren Blutes zeigten bei tumortragenden Tieren eine erhöhte Phagozytoseaktivität gegenüber naiven Tieren. Dies ist ein Zeichen für eine systemische, nicht nur lokale, Stimulation der Immunabwehr. Die Abnahme der Phagozytoseaktivität 24 Stunden nach Hyperthermie könnte auf einer Migration phagozytierender antigenpräsentierender Zellen in den Tumor beruhen. Da jedoch dort histologisch keine Infiltration nachweisbar war, muß eher von einer suppressiven Wirkung der Therapie auf antigenpräsentierende Zellen ausgegangen werden.

#### ***4.2.5 MHC II Präsentation und B16-spezifische Antikörper nach Hyperthermie***

Bei der Neustimulation einer Immunantwort wandern antigenpräsentierende Zellen aus dem Blut in das Gewebe ein und phagozytieren Zelldebris. Die darin enthaltenen Proteine werden in den Lysosomen abgebaut und über über MHC II an T-Helfer-Zellen präsentiert, um diese zu stimulieren. Die MHC II-Expression der Dendritischen Zellen änderte sich nach Hyperthermie nicht. Somit ist nicht von einer stärkeren Stimulation der antigenspezifischen T-Helfer-Zellen durch Dendritische Zellen auszugehen. Die in den Lymphknoten tumortragender Mäuse stark expandierten B-Zellen sind zu 80 % MHC II positiv und damit naiv. Die Anteil der MHC II positiven B-Zellen sinkt nach Hyperthermie leicht ab (nicht signifikant). B-Zellen exprimieren kein MHC II mehr, wenn sie aktiviert werden und mit der Sekretion von Antikörpern beginnen. Demzufolge scheint als Folge der Hyperthermie eine B-Zell Aktivierung stattzufinden. Es dauert mehrere Tage, bis nach der Aktivierung von B-Zellen spezifische Antikörper nachweisbar sind. Da die B16F0-Tumore, die bei Therapie

bereits eine Größe von 10 mm hatten, sehr schnell wachsen, war es aus tierschutzrechtlichen Gründen nicht möglich, die Mäuse bis zu diesem Zeitpunkt am Leben zu lassen. Bei nicht therapierten, tumortragenden Mäusen gelang es in der vorliegenden Arbeit in Immunfluoreszenz und Western Blot nicht, B16-spezifische Antikörper nachzuweisen. Das steht in Widerspruch dazu, daß lange Zeit postuliert wurde, das B16-Melanom induziere eine ADCC-Antwort (Eisenthal and McIntosh 1990). Nach Injektion monoklonaler Antikörper, die sich gegen Membranproteine von B16F0-Zellen richten, bilden C57BL/6-Mäuse gegen B16-Tumore eine Antikörper-vermittelte zytotoxische Reaktion (Shrayer, Kouttab et al. 1993, Eisenthal, Lafreniere et al. 1987). Andere Autoren beschrieben nach Injektion von B16-Tumoren auftretende erhöhte Antikörper-Spiegel im Blut von C57BL/6-Mäusen (Ehrlich, Smorodinsky et al. 1984). Doch es gibt keinen Nachweis von B16-spezifischen Antikörpern und einer Antikörper-vermittelten Immunantwort bei Mäusen mit etablierten B16-Tumoren.

#### **4.2.6 Analyse der T-Zell-Proliferation mittels CFSE**

Die Analyse der Proliferation und Migration von T- und B-Zellen in vivo ist mit Hilfe der Injektion von CFSE-markierten vorstimulierten Zellen möglich. Diese Methode wird zumeist bei der Analyse von T-Zell-Klonen oder TCR-transgenen Mäusen verwendet. In beiden Modellen proliferiert ein großer Teil der injizierten Zellen. Da bei der Immunantwort auf das B16-Melanom in vivo von einer deutlich niedrigeren Zahl spezifischer T-Zellen als bei TCR-transgenen Tieren ausgegangen werden mußte, wurde die Methode zunächst mit Tieren etabliert, die ohne Verwendung von Adjuvans gegen ein T-Helfer-Antigen (KLH) immunisiert wurden. Auch bei der nach dieser schwachen Immunisierung auftretenden geringen Zahl antigenspezifischer Zellen war es möglich, die Migration und Proliferation der injizierten CFSE-markierten Zellen zu analysieren und die Zellen zu typisieren. Es war jedoch aufgrund der geringen Zahl proliferierender Zellen nicht möglich, die Zahl der Teilungen, die eine einzelne Zelle durchlaufen hatte zu bestimmen.

Wurden Tieren mit einem B16F0-Melanom CFSE-markierte Lymphozyten und Makrophagen aus Tieren injiziert, die gegen B16F0-Zellen immunisiert waren, so war in den efferenten Lymphknoten eine Hemmung der Proliferation nachzuweisen. Das deutet auf eine Suppression der Proliferation durch den Tumor hin. Nach Hyperthermie war keine Änderung

zu sehen. Hyperthermie ist demzufolge nicht in der Lage, die antiproliferative Wirkung des B16F0-Melanoms auf aktivierte Lymphozyten in den efferenten Lymphknoten zu inhibieren.

#### **4.2.7 T-Zell-Rezeptor Excisionszirkel (TREC) als Marker für die T-Zell Proliferation**

Um das Ergebnis des vorigen Versuches abzusichern, wurde eine zweite Methode zur Analyse der T-Zell-Proliferation und -Migration in vivo etabliert. Zwar ist es möglich, durch einmalige Injektion von BrdU die Proliferation aller Zellen zu erfassen und die proliferierenden Zellen durchflußzytometrisch zu typisieren, doch ist diese Methode nicht geeignet, zugleich die Migration der Zellen zu erfassen. Als Marker für T-Zellen, der Aufschluß über die Proliferation einer Population von T-Zellen gibt, wurden T-Zell-Rezeptor-Exzisionszirkel gewählt. 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. 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). Daher läßt sich die Verdünnung der TRECs in einem T-Zell-Pool als Maß für die Proliferation der T-Zellen nehmen. Betrachtet man die Gesamtzahl der TRECs pro Organ gewinnt man zudem Aufschluß über die Migration von T-Zellen. Voraussetzung ist, daß T-Zellen in ihrer Migration und Proliferation nicht davon beeinflusst werden, ob sie TRECs enthalten. Hierzu gibt es bisher keine Untersuchungen. Bei Mäusen ist liegt die Halbwertszeit von TRECs in den T-Zellen zwischen 2 und 11 Wochen (Sempowski, Gooding et al. 2002). Es ist daher innerhalb von zwei Wochen nach einer Therapie die Analyse der Proliferation und Migration einer Population von T-Zellen über eine Bestimmung der TRECs möglich.

In Kooperation mit Dr. C.A.Schmidt wurde die TREC-Analyse etabliert. Da zu Beginn der Versuche keine Daten über TRECs in Mäusen bekannt waren, wurde zunächst der Anteil TREC-positiver T-Zellen in primären und sekundären lymphatischen Organen bestimmt. Die in der vorliegenden Arbeit gewonnenen Daten zeigen, daß hinsichtlich des TREC-Gehaltes der T-Zellen deutliche Unterschiede zwischen den primären lymphatischen Organen (Knochenmark: keine TRECs, Thymus: mehr als 50 % der CD3-positiven T-Zellen enthalten einen TREC) und den sekundären lymphatischen Organen (Milz und Lymphknoten: ca. 5 %

der T-Zellen enthalten einen TREC) nachweisbar sind. Diese Daten stimmen gut mit den kürzlich für Mäuse publizierten Daten überein (Sempowski, Gooding et al. 2002).

Um zu untersuchen, ob die Bestimmung der TRECs die Analyse einer T-Zell-vermittelten Immunantwort ermöglicht, wurden Mäuse beider Stämme mit einem T-Helfer-Antigen (KLH) in komplettem Freund'schem Adjuvans immunisiert. Die Immunisierung erfolgte assymetrisch in eine hintere Extremität, so daß der Vergleich der Lymphknoten, die die Immunisierungsstelle drainierten, mit Lymphknoten der nicht immunisierten Extremität desselben Tieres möglich war. In beiden untersuchten Mausstämmen sind 9 Tage nach Immunisierung Veränderungen in der Zahl der TRECs pro 1000 CD3-positive Zellen und in der Zahl der TRECs pro Organ nachweisbar, wobei sich die beiden Stämme verschieden verhalten. Aufgrund der TREC-Analyse ist es möglich, Aufschluß über T-Zell-Proliferation und Immigration zu erhalten, wie in Abbildung 39 dargestellt. Die Abnahme der Gesamtzahl der TRECs in den nicht efferenten Lymphknoten und der Milz beruht auf einer Emigration von T-Zellen, während in die efferenten Lymphknoten T-Zellen einwandern und die Gesamtzahl der TRECs steigt. Zugleich proliferieren die T-Zellen sowohl in efferenten als auch in nicht-efferenten Lymphknoten, so daß die Zahl der TRECs pro 1000 T-Zellen abnimmt. Die Abnahme der TRECs pro 1000 T-Zellen in den nicht-efferenten Lymphknoten könnte auch durch eine alleinige Emigration TREC-haltiger T-Zellen bei Verbleib der TREC-negativen Zellen in den Lymphknoten verursacht sein, doch gibt es keinen Grund zu der Annahme, daß sich T-Zellen mit und ohne TRECs verschieden verhalten.

Die Analyse von Proliferation und Migration mittels TRECs ist jedoch nur möglich, wenn es sich um eine starke Immunantwort handelt, da mindestens eine Verdoppelung oder Halbierung der TRECs pro 1000 T-Zellen vorliegen muß, um die Veränderungen messen zu können. Bei tumortragenden Tieren konnte keine Veränderung gegenüber naiven Tieren gemessen werden. Ebenso trat nach Hyperthermie keine Veränderung auf. Auffällig war die starke Streuung der Daten und einige unplausibel hohe Werte, die die Methode zur Beantwortung der Fragestellung in hyperthermierten Mäusen ungeeignet machte.

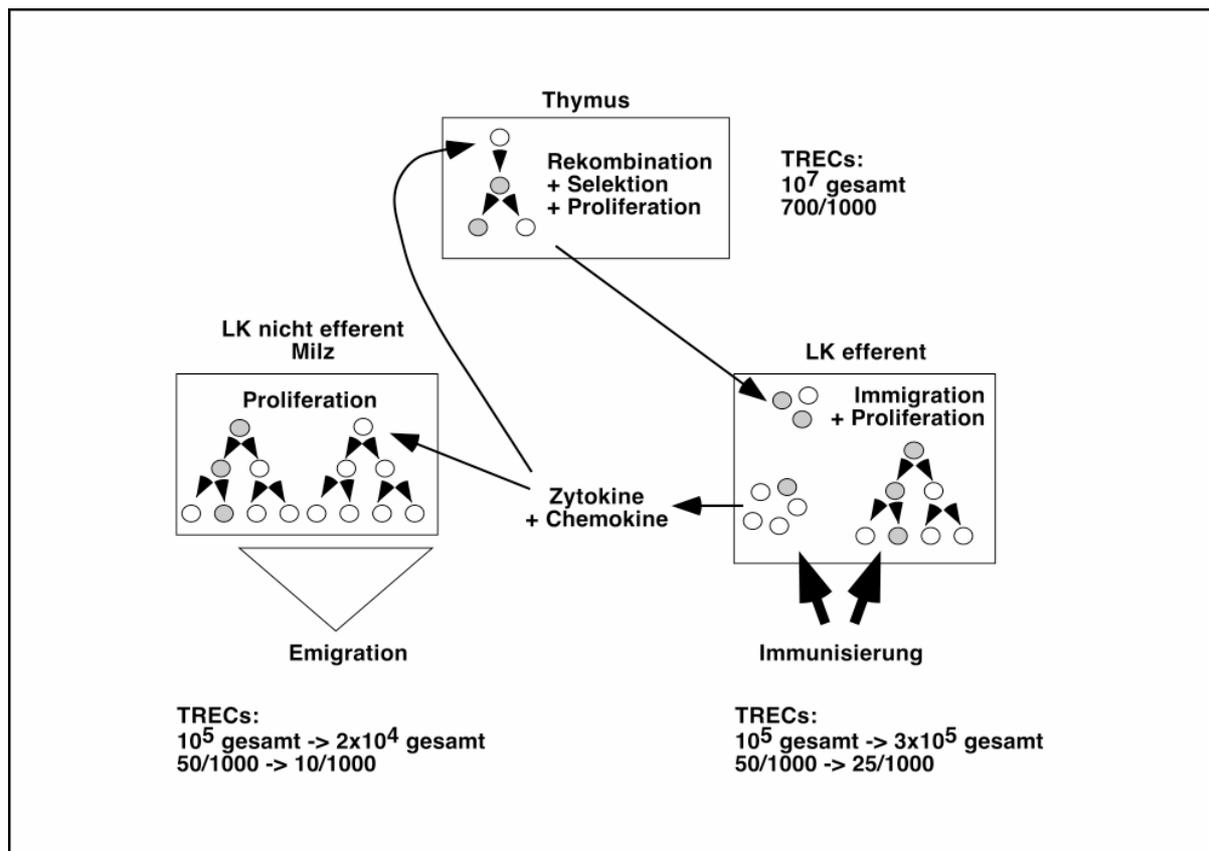


Abbildung 39: TRECs: Modell der T-Zell-Proliferation und -Migration

Die Immunisierung der 129P2/OlaHsd-Mäuse und die Analyse erfolgten wie unter Material und Methoden in Abschnitt 21 dargestellt.

### 4.3 Antigenpräsentation nach Hyperthermie

Nachdem in der vorliegenden Arbeit gezeigt wurde, daß nach Hyperthermie von B16F0-Zellen über freigesetzte Hitzeschockproteine eine Immunantwort gegen Antigene, an Hitzeschockproteine gebundene Peptide ausgelöst werden kann, wurde anschließend untersucht, ob solche Peptide nach Hyperthermie entstehen und an die Hitzeschockproteine gebunden werden können. Des weiteren wurde untersucht, ob durch Hyperthermie B16F0-Zellen nach Hyperthermie durch für zytotoxische T-Zellen erkannt werden können. Als Modellantigen wurden Tyrosinase gewählt, da es als Antigen humaner Melanome bekannt ist (Brichard, Van Pel et al. 1993).

#### 4.3.1 Proteasomale Degradation von Tyrosinase bei B16F0 nach Hyperthermie

Die Tyrosinase-Expression in Zellen des B16-Melanoms wurde mittels Western Blot und quantitativer RT-PCR überprüft. In B16F0-Zellen waren mindestens drei verschiedene

Tyrosinase-Isoformen nachweisbar, während nach Kultur in Tyrosin-armem RPMI zwei Isoformen schwach exprimiert waren. Die Proteinmenge der im Western Blot detektierbaren niedermolekularen Isoformen betrug abhängig von den Kulturbedingungen der Zellen etwa 10-40 % der gesamt vorhandenen Tyrosinase. Es handelt sich vermutlich um nicht oder unvollständig glykosylierte Isoformen, da Tyrosinase in manchen Melanomzelllinien langsamer glykosyliert wird als in Melanozyten (Halaban, Cheng et al. 1997). Diese Isoformen werden vor allem in amelanotischen Melanomzellen proteasomal abgebaut und nicht vollständig prozessiert (Halaban, Cheng et al. 1997).

Die Halbwertszeit von Tyrosinase in B16F0-Zellen betrug in der vorliegenden Arbeit etwa 2,5 Stunden. Sie erwies sich damit gegenüber den für andere murine Zelllinien publizierten 4, bzw. 12 Stunden als sehr niedrig (Halaban, Cheng et al. 1997; Martinez-Esparza, Jimenez-Cervantes et al. 1997). Das heißt, daß aufgrund der geringen Halbwertszeit von Tyrosinase in B16F0-Zellen nach 6 Stunden bereits etwa 80 % der zu einem gegebenen Zeitpunkt in einer Zelle vorhandenen Tyrosinase abgebaut ist. Hyperthermie von 30 Minuten bei 43°C führte nach 3 Stunden zu einer um etwa 50-70% erniedrigten Expression aller Tyrosinase-Isoformen. Durch quantitative RT-PCR konnte gezeigt werden, daß die Transkription von Tyrosinase nach Hyperthermie verringert, doch nicht vollständig inhibiert ist.

Beim Abbau antigener Proteine können Peptide entstehen, die über MHC I-Komplexe an T-Zellen präsentiert werden. Voraussetzung dafür ist, daß das Protein proteasomal abgebaut wird, wie für Tyrosinase bekannt ist (Halaban, Cheng et al. 1997; Mosse, Meadows et al. 1998). Auch nach Hyperthermie wird dieser Weg beschritten, wie die Anreicherung von Tyrosinase bei Inhibition der Proteasomen unmittelbar nach Hyperthermie zeigt. Jedoch nicht jedes Peptid, das dem proteasomalen Abbau entstammt, hat eine für die Bindung an MHC I-Komplexe geeignete Sequenz. Solche Peptide entstehen vermutlich präferentiell dann, wenn das Proteasom die Untereinheiten LMP 2, LMP 7 und LMP 10 enthält (Boehm, Klamp et al. 1997). Alle drei Untereinheiten werden in B16-Zelle nicht exprimiert (Seliger, Wollscheid et al. 2001). Hitzeschockproteine binden Peptiden anders als MHC-Komplexe nicht sequenzabhängig. Auch können Hitzeschockproteine längere Peptide binden als MHC-Komplexe. Für die Bindung von Peptiden an Hitzeschockproteine sollte demzufolge die Beteiligung von LMP 2, LMP 7 und LMP 10 nicht entscheidend sein. Jedoch ist bekannt, daß das Hitzeschockprotein HSP 90 Proteasomen, die keine LMP-Untereinheiten besitzen, hemmen kann (Lu, Michaud et al. 2001). Der Effekt von HSP 90 wird durch den Proteasom-

Aktivator PA 28 (11 S Regulator) aufgehoben (Lu, Michaud et al. 2001), der die Effizienz der Proasomen steigert und vermutlich bei der Generierung antigener Peptide wichtig ist (Boehm, Klamp et al. 1997). B16-Zellen exprimieren unter normothermen Bedingungen keine der beiden PA 28-Untereinheiten (Seliger, Wollscheid et al. 2001). In der vorliegenden Arbeit wurde proteasomaler Abbau von Tyrosinase nach Hyperthermie nachgewiesen, so daß nicht von einer Hemmung der Proteasomen durch Hyperthermie-induzierte Hitzeschockproteine ausgegangen werden muß.

Die beim proteasomalen Abau der Tyrosinase nach Hyperthermie entstehenden Peptide können im Zytosol der Zellen an HSP 72 und HSP 73 gebunden werden. Beide Hitzeschockproteine werden nach Hyperthermie freigesetzt. Dendritische Zellen nehmen Hitzeschockproteine der HSP 70-Familie Rezeptor-vermittelt auf und schleusen die an sie gebundenen Peptide in den MHC I-Präsentationsweg. Treffen sie auf naive peptidspezifische T-Zellen, können sie diese über costimulatorische Proteine aktivieren. Bei der experimentellen Untersuchung der Antigenpräsentation benötigt man man T-Zell-Klone, die gegen Peptide des untersuchten Proteins spezifisch sind, um eine ausreichend starke meßbare T-Zell-Antwort zu erhalten. Ein solcher H-2K<sup>b</sup>- oder H-2D<sup>b</sup>-restringierter T-Zell-Klon gegen murine Tyrosinase ist in der Literatur nicht beschrieben.

#### ***4.3.2 TAP-Expression nach Hyperthermie***

Neben Proteinen der HSP 70-Familie können auch jene der HSP 90-Familie Peptide binden. Auch sie sind in der Lage, nach Freisetzung antigenpräsentierende Zellen zu aktivieren und nach Endozytose die gebundenen Peptide in den MHC I-Präsentationsweg der antigenpräsentierenden Zelle zu schleusen. Die Bindung von Peptiden an das in der Regel im endoplasmatischen Retikulum lokalisierte GP 96 erfordert ihren Transport durch die ER-Membran, der in der Regel über den TAP-Transporter geschieht. Daher wurde in der vorliegenden Arbeit untersucht, ob B16F0-Zellen nach Hyperthermie die beiden Untereinheiten des TAP-Transporters exprimieren.

Die Transkription von streßinduzierbaren Hitzeschockgenen wird durch die Trimerisierung des Transkriptionsfaktors HSF 1 und anschließende Bindung des HSF 1-Trimers an Hitzeschockelemente im Promotor induziert (Kroeger, Sarge et al. 1993). HSF 1-induzierte Transkription erfordert die Bindung zweier Trimere, wobei zur Bindung des zweiten Trimers ein unvollständiges Hitzeschockelement aus ein oder zwei (invers zueinander angeordneten)

Wiederholungen des NGAAN-Motivs genügt (Kroeger, Sarge et al. 1993). Das im bidirektionalen Promotor von tap 1 und Imp 2 (TAP = Transporter assoziiert mit Antigen-Prozessierung, LMP = low molecular weight polypeptide) nahe den multiplen Transkriptionsstartstellen von tap 1 gefundene Hitzeschockelement weist insgesamt vier NGAAN-Motive auf, deren zweites und viertes invers angeordnet sind (Abbildung 32). Damit ist eine Bindung zweier HSF 1-Trimere möglich, von denen eines mit niedriger Affinität gebunden wird, da nur eine von drei Bindungsstellen vorhanden ist. Der Transkriptionsfaktor HSF 2, für dessen Bindung Hitzeschockelemente aus drei NGAAN-Motiven ausreichen, kann nach Hitzeschock keine Transkription von Hitzeschockgenen induzieren, da das Protein aufgrund einer Konformationsänderung in wässriger Umgebung unlöslich wird (Mathew, Mathur et al. 2001).

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten B16F0-Zellen transkribieren kein tap 1. In 2 von 4 Versuchen wurde unter verschiedenen Bedingungen tap 2 transkribiert. Es blieb unklar, wovon die instabile tap 2 Transkription abhing. Andere Autoren beschrieben eine konstitutive Transkription von tap 2, die jedoch nicht zur Expression des Proteins führte (Seliger, Wollscheid et al. 2001). In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, daß das Hitzeschockelement im tap 1-Promotor nach Hyperthermie die Transkription von tap 1 induziert. Da auch Homodimere aus TAP 1 in der Lage sind, bestimmte Peptide zu transportieren (Hosken and Bevan 1992; Gabathuler, Reid et al. 1994), besteht somit die Möglichkeit, daß die beim Abbau der Tyrosinase entstehenden Peptide in das endoplasmatische Retikulum gelangen. Es wäre jedoch wichtig, die Expression von TAP 1 und TAP 2 auch auf Proteinebene zu untersuchen, da nach Hyperthermie die Translation der mRNAs inhibiert sein könnte. Ob Peptide, die dem proteasomalen Abbau melanomassoziierten Antigene entstammen, von TAP 1-Homodimeren transportiert werden können, bleibt noch im Einzelnen zu klären. Die zytosolischen HSP 72 und HSP 73 können mit den Proteinen des TAP-Transporters, welche Peptide aus dem Zytosol in das endoplasmatische Retikulum transportieren, assoziiert sein und die Aktivität des TAP-Transporters erhöhen (Chen and Androlewicz 2001). Ob das Hitzeschockprotein mit TAP 1 oder TAP 2 assoziiert, ist nicht bekannt.

In MHC I-defizienten Tumorzellen können die transportierten Peptide an das Hitzeschockprotein GP 96 gebunden werden. Eine TAP-unabhängige Bindung von Peptiden an GP 96 wurde für bestimmte Peptide beschrieben (Arnold, Wahl et al. 1997), während

andere Peptide nur TAP-abhängig in das endoplasmatische Retikulum gelangen können (Arnold, Wahl et al. 1997; Lammert, Arnold et al. 1997). Nach der Freisetzung von GP 96 nach Hyperthermie gelangen die antigenen Peptide so zu Dendritischen Zellen. Diese können GP 96-gebundene Peptide in ihren MHC I-Präsentationsweg schleusen und so peptidspezifische zytotoxische T-Zellen aktivieren.

#### **4.3.3 MHC I-Expression nach Hyperthermie**

Tumorspezifische zytotoxische T-Zellen, die von antigenpräsentierenden Zellen aktiviert wurden, können Tumorzellen lysieren, die auf MHC I-Komplexen die Peptide präsentieren, auf die die T-Zellen spezifisch reagieren. Tumorzellen, die kein MHC I exprimieren, können von den zytotoxischen T-Zellen nicht erkannt werden und werden daher nicht getötet.

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten B16F0-Zellen präsentieren kein MHC auf ihrer Membran. Auch nach Zugabe MHC I-bindender Peptide oder nach Kultur der Zellen bei erniedrigter Temperatur sind keine MHC I-Komplexe auf ihrer Oberfläche nachweisbar. Durch Zugabe MHC I-bindender Peptide und durch Kultur bei niedrigeren Temperaturen können leere MHC I-Komplexe, d.h. MHC-Komplexe, die kein Peptid gebunden haben, auf der Membran stabilisiert und so vor ihrem Abbau geschützt werden. Bei B16F0 kann davon ausgegangen werden, daß keine leeren MHC I-Komplexe auf der Membran sind. Zum Zeitpunkt des Beginns der vorliegenden Arbeit galten B16-Zellen als MHC-I präsentierend (wenn auch schwach) und es waren zytotoxische T-Zell-Reaktionen gegen B16 nachgewiesen worden (Bloom, Perry-Lalley et al. 1997; Dyllal, Bowne et al. 1998; Overwijk, Tsung et al. 1998). Auch konnte in Versuchen zur Tumorstimulation eine erfolgreiche T-Zell-Antwort gegen das B16-Melanom induziert werden (DeMatos, Abdel-Wahab et al. 1998). Die in der vorliegenden Arbeit nachgewiesene funktionelle MHC I-Defizienz der Zellen wurde im vergangenen Jahr auch von anderen Gruppen beobachtet (Seliger, Harders et al. 1998; Peter, Mezzacasa et al. 2001). Die zuvor nachgewiesenen T-Zell-Reaktionen gegen das B16-Melanom könnten auf einer lokal oder systemisch erhöhten IFN $\gamma$ -Konzentration im Rahmen einer TH 1-Antwort beruhen, die die MHC I-Produktion der B16-Zellen induziert.

Die MHC I-Expression von B16F0-Zellen ist durch IFN $\gamma$  induzierbar, so daß davon ausgegangen werden kann, daß der verminderten Expression nicht eine Mutation in den MHC I-Genen zugrunde liegt. IFN $\gamma$  induziert über die Transkriptionsfaktoren IRF 1 und IRF 2 nicht nur die Transkription der MHC I $\alpha$ -Kette, sondern auch des ebenfalls im

MHC-Komplex enthaltenen  $\beta$ 2-Mikroglobulin, der LMP Proteasom-Untereinheiten und beider Untereinheiten des TAP-Transporters. Diese Proteine werden alle für die Präsentation antigener Peptide auf der Zellmembran benötigt. Das Fehlen eines dieser Proteine kann auch bei vorliegender Translation der MHC I $\alpha$ -Kette eine funktionelle MHC I-Defizienz zur Folge haben (Gabathuler, Reid et al. 1994).

Die MHC I-Expression der B16F0-Zellen ist nicht hitzeinduzierbar. Eine nach IFN $\gamma$ -Stimulation bereits vorhandene MHC I-Präsentation wird durch anschließende Hyperthermie reduziert, doch nicht vollständig inhibiert. Da bei gleichzeitiger Behandlung mit IFN $\gamma$  und Hyperthermie eine deutliche, wenn auch verglichen mit IFN $\gamma$  alleine niedrigere MHC I-Präsentation auf der Membran stimulierbar war, erscheint eine Kombinationstherapie aus Hyperthermie und gleichzeitiger IFN $\gamma$ -Gabe sinnvoll. Außer IFN $\gamma$  induzieren auch IFN $\alpha$ , IFN $\beta$ , IL 12 sowie TNF $\alpha$  die Expression von MHC I auf der Membran (Garbe and Krasagakis 1993). IFN $\alpha$ , IL 12 und TNF $\alpha$  werden in der Therapie von Melanomen bereits eingesetzt und führen zu einer Verlängerung der rezidivfreien Zeit (Nashan and Luger 2001). TNF $\alpha$  wird zusammen mit Chemotherapeutika in der hyperthermen Extremitätenperfusion von Melanomen verwendet (Nashan and Luger 2001). Es inhibiert jedoch die Expression von Tyrosinase und anderen Melanom-assoziierten Antigenen (Martinez-Esparza, Jimenez-Cervantes et al. 1998) und ist daher für eine Therapie mit dem Ziel der T-Zell-Stimulation weniger gut geeignet, als die Interferone, die keinen Einfluß auf die Antigenexpression haben (Garbe and Krasagakis 1993). Interferone können sowohl lokal (subkutane tumornahe oder intratumorale Applikation) als auch systemisch (orale oder intravenöse Applikation) eingesetzt werden. IL 12, das die IFN $\gamma$ -Sekretion steigert, wird gegenwärtig in der klinischen Anwendung noch evaluiert. In Abbildung 40 ist dargestellt, wie Interferon- oder IL12-Therapie in Kombination mit Hyperthermie eine T-Zell-Stimulation bewirken könnte.

Das vollständige Fehlen der MHC I-Expression bei einigen Melanomzelllinien könnte Resultat der langjährigen in vitro Kultur und der Selektion auf maximale Malignität sein. Vollständig MHC I-negative Melanome sind bei Patienten selten (Geertsen, Hofbauer et al. 1998; Johnsen, France et al. 1998; Geertsen, Boni et al. 2002). Daher wurde an einem konstitutiv MHC I-exprimierenden Tumor untersucht, ob Hyperthermie die MHC I-Präsentation beeinflusst. Als Modelltumor wurde das RMA-T-Zell-Lymphom des Thymus gewählt. RMA-Zellen exprimieren die MHC I-Allele H-2D<sup>b</sup> und H-2K<sup>b</sup>. Die Zahl der H-2D<sup>b</sup>-

präsentierenden Zellen war unmittelbar nach Hyperthermie unverändert, doch 90 Minuten nach Hyperthermie deutlich erniedrigt. Auch die Stärke der H-2D<sup>b</sup>-Präsentation der weiterhin positiven Zellen sank 90-180 Minuten nach Hyperthermie. Zugrunde liegt wahrscheinlich ein verminderter Transport neuer MHC I-Komplexe auf die Membran, denn MHC I-Komplexe haben auf der Zellmembran eine kurze Halbwertszeit und werden anschließend internalisiert (Dasgupta, Watkins et al. 1988; Vega and Strominger 1989). Ursache könnte die Denaturierung der im endoplasmatischen Retikulum lokalisierten, nicht an Peptide gekoppelten MHC I $\alpha$ -Ketten sein, da MHC-Komplexe, wenn sie keine Peptide gebunden haben, hitzelabil sind (Reich, Altman et al. 1997; Batalia, Kirksey et al. 2000; Owen and Pease 2001). Die Antigen-Präsentation mittels H-2K<sup>b</sup> hingegen ist bereits unmittelbar nach Hyperthermie deutlich erniedrigt und bleibt in den folgenden 180 Minuten unverändert. In diesem Fall kann man von der Denaturierung sowohl der auf der Membran befindlichen Komplexe, als auch einer reduzierten Präsentation neuer Komplexe und damit auch von einer schlechten Präsentation der durch Hyperthermie entstehenden Antigenen Peptide ausgehen. Eine reduzierte MHC I-Präsentation nach Hyperthermie ist auch für andere Tumorzelllinien bekannt (Dressel, Elsner et al. 2000). Sie führt jedoch nicht zwangsläufig zu einer verminderten zytotoxischen T-Zell-Reaktion gegen die Tumorzellen (Dressel, Elsner et al. 2000). Andere Autoren fanden eine verstärkte MHC I-Präsentation bei Fibroblasten nach Langzeitkultur über mehrere Tage bei 39°C (Aboud, Segal et al. 1992). Moderate Hyperthermie kann demzufolge einen positiven Effekt auf die MHC I-Präsentation haben. Doch nicht nur die Expressionsstärke von MHC I-Komplexen ändert sich nach Hyperthermie. Hyperthermie vermindert auch die laterale Diffusion von MHC I-Komplexen (Mehdi and Hahn 1990). Damit wird zytotoxische Reaktion gegen eine MHC I-präsentierende Tumorzelle erschwert, da diese mit der Bindung mehrerer MHC I-Komplexe an die Rezeptoren der T-Zelle beginnt. Bei Tumoren, die wie das B16F0-Melanom nur schwach oder gar nicht MHC I exprimieren, ist nach Hyperthermie ein vollkommenes Fehlen der MHC I-Präsentation zu erwarten, so daß in den ersten Stunden nach Hyperthermie eine zytotoxische Reaktion gegen den Tumor unwahrscheinlich ist. Die MHC I-Präsentation ist jedoch 24 Stunden nach Hyperthermie nicht mehr beeinträchtigt. Die Möglichkeit, bei MHC I-exprimierenden Tumoren durch Hyperthermie eine zytotoxische T-Zell-Reaktion gegen den Tumor zu induzieren, ist daher von der Kinetik des crosspriming der Dendritischen Zellen und der Aktivierung der T-Zellen abhängig. Hier sind weitere Untersuchungen nötig.

Es bleibt weiterhin zu klären, ob neben MHC I andere Proteinkomplexe des MHC I-Präsentationsweges durch Hyperthermie inhibiert werden.

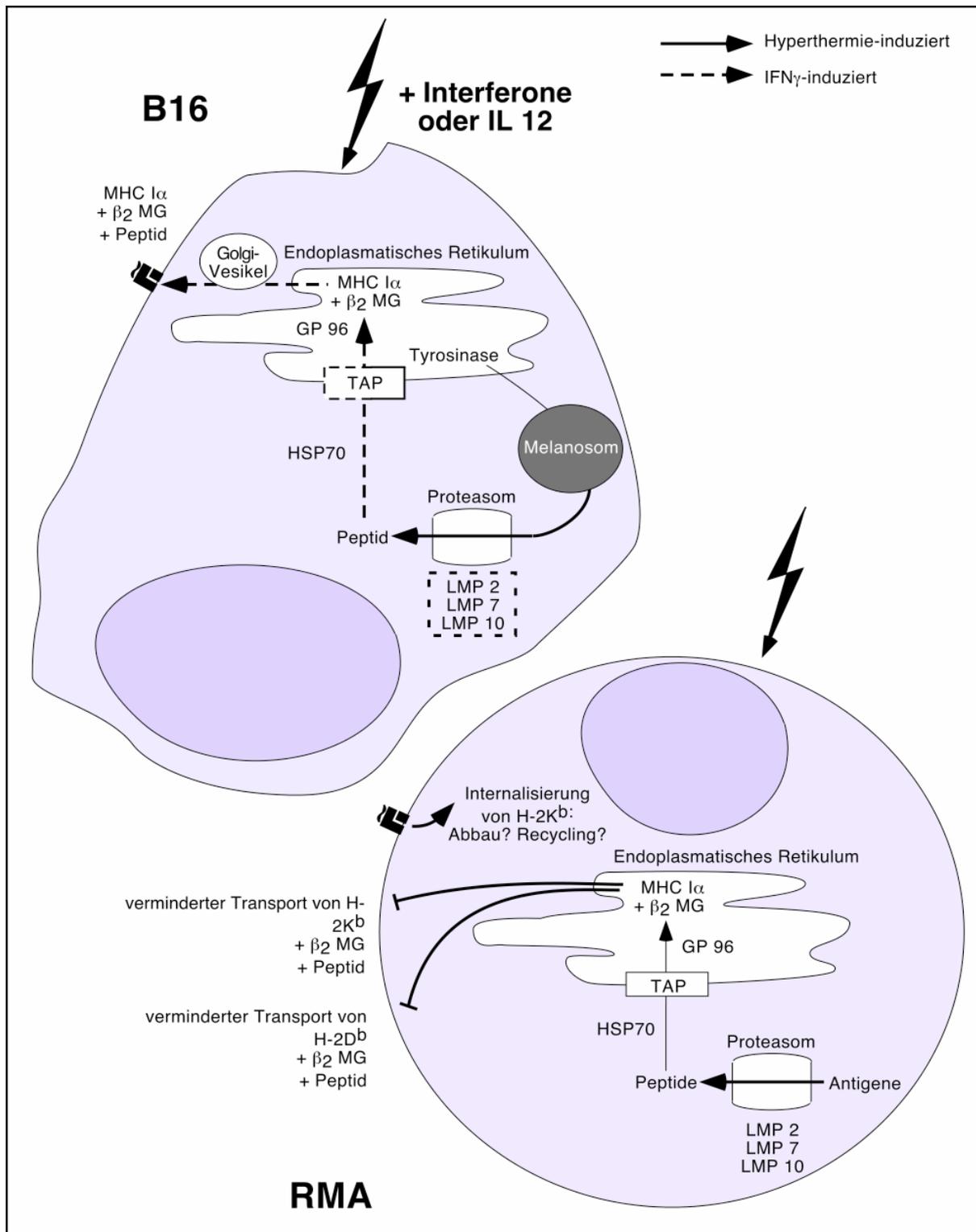


Abbildung 40: MHC I-Expression nach Hyperthermie  
Bei konstitutiv MHC I-exprimierenden Zellen inhibiert Hyperthermie den Transport neuer MHC I-Komplexe auf die Membran. Die funktionelle MHC I-Defizienz bei B16F0-Zellen kann durch

*IFN $\gamma$ -Gabe nach Hyperthermie durchbrochen werden. Daher empfiehlt sich eine Kombinationstherapie aus Interferonen oder IL 12 und Hyperthermie.*

#### **4.4 Expression von Markern für NK-Zellen und $\gamma\delta$ T-Zellen nach HT**

NK-Zellen sind wesentlich für die Immunabwehr MHC I-defizienter Tumore. Sie erkennen das Fehlen der MHC I-Präsentation. Um eine zytotoxische Reaktion auszulösen, wird noch ein zweites Signal in Form NK-Zell aktivierender Proteine auf der Zellmembran benötigt. Eine Vielzahl solcher Marker ist bekannt. Im Rahmen der Hitzeschockantwort ist von besonderem Interesse, daß für einige Tumorzelllinien die Expression von HSP72 und GP96 auf der Zellmembran beschrieben ist (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). Die Hitzeschockproteine werden dort von NK-Zellen und  $\gamma\delta$  T-Zellen erkannt. In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, daß auf der Membran von B16F0-Zellen beide Hitzeschockproteine weder vor noch nach Hyperthermie nachweisbar sind. Eine gegen die Hitzeschockproteine gerichtete NK-Zell- oder  $\gamma\delta$ -T-Zell-Antwort auf B16F0-Zellen ist somit auszuschließen. Andere NK-Zellen und  $\gamma\delta$ -T-Zellen stimulierende Marker sind beim B16-Melanom nicht bekannt.

Ein weiterer  $\gamma\delta$ -T-Zellen aktivierender Marker ist das nicht-klassische MHC I Qa-1<sup>b</sup>. Es ist ubiquitär exprimiert und präsentiert vorrangig die Signalpeptide der klassischen MHC I-Moleküle. Qa-1<sup>b</sup> konnte auf auf 2-3 % der B16F0-Zellen nachgewiesen werden. Da jedoch B16F0-Zellen keine MHC I $\alpha$ -Ketten synthetisieren, ist davon auszugehen, daß keine oder andere Peptide an das Qa-1<sup>b</sup> gebunden sind. Da die fehlende Peptidbindung die Stabilität der Moleküle beeinträchtigen könnte, wurde die Qa-1<sup>b</sup>-Expression nach Hyperthermie am MHC I-exprimierenden RMA-T-Zell-Lymphom des Thymus untersucht. Nach Hyperthermie stieg die Zahl der Qa-1<sup>b</sup>-exprimierenden RMA-Zellen von an, während die Expressionsstärke der einzelnen Zellen zugleich deutlich abnahm. Da aber auch nach Hyperthermie ein deutlicher Unterschied der Qa-1<sup>b</sup>-positiven Zellen zu den negativen Zellen zu sehen war, ist von einer ausreichenden Präsentation der einzelnen Zellen bei einer höheren Zahl präsentierender Zellen auszugehen. Hyperthermie kann also auf dem Weg über die Qa-1<sup>b</sup>-Präsentation  $\gamma\delta$  T-Zellen zu einer zytotoxischen Reaktion gegen den Tumor stimulieren.

Auf NK-Zellen hingegen wirkt Qa-1<sup>b</sup> inhibitorisch, wenn es das Signalpeptid Qdm der MHC I $\alpha$ -Ketten präsentiert. Da B16F0-Zellen kein MHC I $\alpha$  und damit kein Qdm bilden,

spielt die Qdm-vermittelte Inhibition von NK-Zellen im Falle des B16-Melanoms jedoch keine Rolle. In einer Kombinationstherapie des B16F0-Melanoms mit  $\text{IFN}\gamma$  und Hyperthermie muß jedoch von der Präsentation des Qdm-Peptids durch  $\text{Qa-1}^b$  ausgegangen werden. In diesem Fall dürfte die Inhibition der NK-Zellen die Folge sein. Daher könnte Hyperthermie in Kombination mit Interferontherapie eine zytotoxische NK-Zell-Reaktion auf das B16-Melanom verhindern.

## 5 Zusammenfassung und Ausblick

In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob regionale Hyperthermie von Melanomen eine spezifische Immunantwort auf diesen Tumor induzieren oder verstärken kann, um Ansatzpunkte für eine Kombination aus Hyperthermie und Immuntherapie zu entwickeln. Als Modell wurde das murine B16F0-Melanom der C57L/6-Maus gewählt, da es in syngene Mäuse transplantierbar ist und einige Melanozyten-Differenzierungs-Antigene exprimiert, die auch bei Menschen in der Immunantwort auf Melanome eine wesentliche Rolle spielen. Zudem ist es durch eine Fülle von Publikationen gut definiert.

In der Zellkultur zeigte sich, daß Hyperthermie von B16F0-Zellen bis 41°C im Vergleich zu unbehandelten Zellen keinen Einfluß auf Zelltod und Hitzeschockexpression hat. Auch die Phagozytose von Zelldebris der Tumorzellen durch Dendritische Zellen nimmt nicht zu. Es ist daher davon auszugehen, daß Hyperthermie von B16F0-Zellen bis 41°C in der T-Zell-Stimulation durch Dendritische Zellen keine Wirkung hat. Werden die B16F0-Zellen bei 43°C hyperthermiert, so sterben etwa 20 % der Zellen apoptotisch oder nekrotisch und es werden Hitzeschockproteine freigesetzt. Dendritische Zellen phagozytieren den Debris der hyperthermierten B16F0-Zellen, welcher die nach Hyperthermie verstärkt gebildeten Hitzeschockproteine HSP 72, HSP 73 und GP 96 enthält. Die daran gebundenen Peptide der nach Hyperthermie abgebauten Tyrosinase können von den Dendritischen Zellen an T-Zellen präsentiert werden. Da Dendritische Zellen durch Hitzeschockproteine aktiviert werden, können sie wiederum peptidspezifische T-Zellen aktivieren.

Im Mausmodell der regionalen Hyperthermie konnte in der vorliegenden Arbeit kein reduziertes Wachstum des B16F0-Melanoms nach Hyperthermie nachgewiesen werden. Es wurde auch keine verstärkte Migration von Leukozyten nach Hyperthermie in die schwach infiltrierten Tumore gefunden. Betrachtete man die MHC-Präsentation und die Phagozytose-Aktivität der antigepräsentierenden Zellen, so war keine Veränderung zu sehen. Beim Transfer markierter T-Zellen aus immunisierten Mäusen in tumortragende Tiere zeigte sich eine verminderte Proliferation dieser Zellen in den efferenten Lymphknoten der Tiere, die nach Hyperthermie nicht stieg. Zusammenfassend läßt sich sagen, daß nach Hyperthermie keine Induktion einer Immunantwort gegen den Tumor nachgewiesen werden konnte. Da das B16-Melanom sehr schnell wächst, war das Zeitfenster, in dem die Immunstimulation untersucht werden konnte, sehr klein. Die vollständige Ausbildung einer T-Zell-Reaktion

dauert mindesten 9 Tage. Die Synthese von Antikörpern kann man sogar erst nach etwa 14 Tagen messen. Daher wurde im folgenden in Zellkulturexperimenten untersucht, ob die Hyperthermie die Bildung und die Präsentation antigener Peptide beeinflusst, um so die Frage zu beantworten, ob die Stimulation einer T-Zell-Reaktion durch regionale Hyperthermie möglich ist.

Als Modellantigen wurde Tyrosinase gewählt, da dieses Antigen in der T-Zell-vermittelten Immunantwort auf Melanome beim Menschen eine wichtige Rolle spielt. Es konnte gezeigt werden, daß die Transkription von Tyrosinase nach Hyperthermie erniedrigt, aber nicht vollständig inhibiert ist. Vorhandene Tyrosinase wird proteasomal abgebaut, so daß von der Produktion antigener Peptide ausgegangen werden kann. Daher kann man folgern, daß Hyperthermie zur Bildung antigener Peptide eines wichtigen T-Zell-Antigens der Melanome führt.

Es konnte zudem gezeigt werden, daß B16F0-Zellen konstitutiv keine der beiden Untereinheiten des TAP-Transporters bilden, der die antigenen Peptide in das endoplasmatische Retikulum transportiert, wo sie an MHC I $\alpha$ -Ketten gebunden werden können. Bei Analyse des bidirektionalen Promotors von tap 1 und Imp 2, einer Untereinheit der Proteasomen, wurde ein Hitzeschockelement gefunden. Nach Hyperthermie konnte Transkription von tap 1, nicht jedoch von tap 2 nachgewiesen werden. Ob die nachgewiesene mRNA translatiert wurde, bleibt zu klären, ebenso ob ein TAP 1-Homodimer die aus Tyrosinase entstehenden antigenen Peptide transportiert. Ohne diesen Transport können die Peptide nicht zur MHC I $\alpha$ -Kette oder zu den im endoplasmatischen Retikulum lokalisierten Hitzeschockproteinen gelangen.

Neben der Expression des TAP-Transporters wurde auch die Expression der MHC I-Komplexe auf der Membran untersucht. B16F0-Zellen exprimieren konstitutiv kein MHC I. Auch nach Hyperthermie war keine MHC I-Expression nachzuweisen. Um den Einfluß der Hyperthermie auf die MHC I-Expression weitergehend zu untersuchen, wurde das RMA-T-Zell-Lymphom des Thymus verwendet, das ebenfalls der C57BL/6-Maus entstammt und konstitutiv MHC I exprimiert. Hyperthermie führte zur verminderten MHC I-Expression, die vermutlich auf einem reduzierten Transport neuer Komplexe auf die Membran beruht. Im Fall des Allels H-2Kb werden wahrscheinlich auch jene MHC I-Komplexe abgebaut, die sich zum Zeitpunkt der Hyperthermie bereits auf der Membran befinden. Es ist also davon auszugehen, daß nach Hyperthermie auf Tumorzellen eine

verminderte Antigenpräsentation stattfindet, die den Zellen hilft, der Immunantwort zu entgehen.

Stimuliert man B16F0-Zellen mit  $\text{IFN}\gamma$ , so exprimieren sie MHC I-Komplexe auf der Zellmembran. Zwar ist die Präsentation weniger stark, wenn die Zellen unmittelbar vor der  $\text{IFN}\gamma$ -Stimulation hyperthermiert werden, doch sie ist weiterhin vorhanden. Daher sollte eine  $\text{IFN}\gamma$ -Therapie bei Tumoren mit funktioneller MHC I-Defizienz, die unmittelbar nach einer regionalen Hyperthermie erfolgt, die Präsentation der gebildeten T-Zell-Peptide auf den Tumorzellen induzieren. Tumorspezifische T-Zellen, die nach Hyperthermie von Dendritischen Zellen aktiviert wurden, welche Hitzeschockproteine mit daran gebundenen Peptiden aufgenommen haben und nun die Peptide präsentieren, können diese Tumorzellen erkennen und lysieren.

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß Hyperthermie zur Stimulation tumorspezifischer T-Zellen führen kann, wenn eine Mindesttemperatur überschritten wird. Diese beträgt beim B16-Melanom  $43^\circ\text{C}$ . Da jedoch das B16-Melanom keine MHC I-Komplexe exprimiert, können aktivierte tumorspezifische T-Zellen die Tumorzellen nicht erkennen und somit nicht lysieren. Ein möglicher Weg, die MHC I-Expression von B16F0-Zellen zu stimulieren, wäre die Therapie mit  $\text{IFN}\gamma$  unmittelbar nach Hyperthermie. Alternativ könnten  $\text{IFN}\alpha$  oder IL 12 eingesetzt werden, die beide in der Melanomtherapie verwendet werden und zu einer Verlängerung der rezidivfreien Zeit bei Melanompatienten führen. Zudem wäre eine lokale Therapie des Tumors mit dem Zytokin GM-CSF sinnvoll (granulocyte macrophage colony stimulating factor), das die Migration von Dendritischen Zellen in den Tumor induziert, um die Aunahme von Tumorzelldebris nach Hyperthermie zu verstärken.

Bei der Anwendung der regionalen Hyperthermie bleibt zu beachten, daß es Hinweise auf die verstärkte Metastasierung von Tumoren nach Hyperthermie gibt. Daher ist die Untersuchung der Metastasierung in dem in der vorliegenden Arbeit etablierten Mausmodell der regionalen Hyperthermie des B16-Melanoms von entscheidender Bedeutung. Diese Fragestellung wird derzeit innerhalb der Arbeitsgruppe bearbeitet.