

## 7 Anhang

### 7.1 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Hitzeschockproteine als Alarmsignal für antigenpräsentierende Zellen	6
Abbildung 2: Crosspriming	9
Abbildung 3: Tumorzellerkennung durch NK- und $\gamma\delta$ -T-Zellen nach Hyperthermie	11
Abbildung 4: Prinzip der TREC-Analyse	16
Abbildung 1: Lokalisation des Tumors und der Lymphknoten	24
Abbildung 2: Gewinnung murinen Knochenmarks	25
Abbildung 1: Nekrose und späte Apoptose von B16F0-Zellen 24h nach Hyperthermie	46
Abbildung 2: Frühe Apoptose von B16F0-Zellen nach Hyperthermie	47
Abbildung 3: Koloniebildungsrate von B16F0-Zellen nach Hyperthermie.	48
Abbildung 4: Expression von HSP 72/ HSP 73 und von GP 96 in B16F0-Zellen	49
Abbildung 5: Hitzeschockproteine im Kulturüberstand hyperthermierter B16F0-Zellen	50
Abbildung 6: Phagozytose hyperthermierter B16F0-Zellen durch Dendritische Zellen	51
Abbildung 7: Fixierung der Mäuse zur Applikation der regionalen Hyperthermie	52
Abbildung 8: Tumordurchmesser und –gewicht	53
Abbildung 9: Körpertemperatur narkotisierter Mäuse bei Hyperthermie-Behandlung	53
Abbildung 10: Histologie des B16F0-Melanoms	55
Abbildung 11: Leukozyten-Infiltration des B16-Melanoms	56
Abbildung 12: Leukozytenzahl und -differenzierung in den Lymphknoten	57
Abbildung 13: Phagozytose-Aktivität der Monozyten des peripheren Blutes	58
Abbildung 14: MHC II-Präsentation auf Dendritischen Zellen und B-Zellen	59
Abbildung 15: Analyse der Proliferation mittels CFSE in vitro	60
Abbildung 16: Analyse der Proliferation mittels CFSE in vivo	61
Abbildung 17: Etablierung des TREC-Nachweises (1)	64
Abbildung 18: Etablierung des TREC-Nachweises (2)	66
Abbildung 19: TRECs nach Hyperthermie	67
Abbildung 20: Tyrosinase-Expression von B16F0	68
Abbildung 21: Tyrosinase-Expression von nach Hyperthermie	70
Abbildung 22: Halbwertszeit von Tyrosinase in B16F0-Zellen	70
Abbildung 23: Proteasomaler Abbau von Tyrosinase nach Hyperthermie	71

---

Abbildung 24: TAP 1-Transkription bei B16F0-Zellen nach Hyperthermie	72
Abbildung 25: Immunstatus von B16F0-Zellen	74
Abbildung 26: MHC I-Expression bei IFN $\gamma$ -vorstimulierten B16-Zellen nach Hyperthermie	75
Abbildung 27: MHC-I-Expression bei RMA-Zellen nach Hyperthermie	76
Abbildung 28: Zelluläre Lokalisation von HSP 72/73 und GP 96 nach Hyperthermie.	78
Abbildung 29: Qa-1b-Expression bei RMA-Zellen nach Hyperthermie	79
Abbildung 1: Freisetzung von Hitzeschockproteinen nach Hyperthermie	82
Abbildung 2: TRECs: Modell der T-Zell-Proliferation und –Migration	91
Abbildung 3: Kombinationstherapie aus IFN $\gamma$ -Therapie und Hyperthermie	98

## 7.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Melanom-assoziierte Peptide	28
Tabelle 2: in der Durchflußzytometrie verwendete Antikörper	29
Tabelle 3: Kombinationen aus Laser und Filtern beim FACS-Calibur	30
Tabelle 4: Primär- und Sekundäantikörper im Immunfluoreszenznachweis	31
Tabelle 5: im Western Blot verwendete Primäantikörper	35
Tabelle 6: im Western Blot verwendete Sekundäantikörper	36
Tabelle 7: Primer	40
Tabelle 8: In der Immunhistologie verwendete Antikörper	43
Tabelle 9: Etablierung des TREC-Nachweises (Teil 2)	65
Tabelle 10: Tyrosinase-mRNA in hyperthermierten B16F0-Zellen nach Hyperthermie	71

### **7.3 Eigene Veröffentlichungen**

WA Schmidt, W Wetzel, et al: Clinical and serological aspects of patients with anti-Jo-1 antibodies – an evolving spectrum of disease manifestations. *Clinical Rheumatology*, 2000; 19 (5): 371-7.

W.Wetzel, R.Geßner, C.A.Schmidt et al.: Analysis of T cell receptor excision circles (TREC) in OVA-immunised mice. (In Vorbereitung)

W.Wetzel, R. Geßner et al.: MHC I- and TAP-expression in B16 melanoma after hyperthermia  
(In Vorbereitung)

#### 7.4 Curriculum vitae

Name: Wiebke Alexandra Wetzel

Geboren: 23. März 1969 in Rheda-Wiedenbrück (Westfalen)

August 1975 Wilhelm Hauff Grundschule, Heilbronn

August 1979 Justinus Kerner Gymnasium, Heilbronn

Mai 1988 Abitur in den Fächern Mathematik, Geschichte, Kunst und Deutsch

1988-1989 AuPair in Bramhall, Greater Manchester, Großbritannien

ab 1989 Studium der Biologie (Diplom) an der Freien Universität Berlin

ab 1990 zusätzlich Studium der Mathematik (Diplom) an der Freien Universität Berlin, Schwerpunkte Graphentheorie, Kombinatorik, Geometrie

1992 Vordiplom in Biologie

1993-1996 Tutorin am Institut für Pflanzenphysiologie und Mikrobiologie

1996 Diplomprüfung in den Fächern Allgemeine Mikrobiologie, Biochemie und Pflanzenphysiologie, sowie Immunologie, Note 1,1

1996-1997 Diplomarbeit über den „Nachweis von antineutrophilen zytoplasmatischen Antikörpern (ANCA)“ bei Dr. Robert Lange, Abteilung für Immunologie, Klinische Biochemie und spezielle Bakteriologie (AIBB), Immanuel Krankenhaus GmbH, Berlin, Standort Buch, Note 1,0

1997- 1998 Wissenschaftliche Mitarbeiterin in der AIBB am Standort Bernau

1998-2002 Wissenschaftliche Mitarbeiterin (zur Promotion) bei Dr. Harald Renz im Graduiertenkolleg 331 „Hyperthermie“ und im gleichnamigen SFB 273 der DFG im Institut für Labormedizin der Charité Berlin zum Thema „Immunologische Effekte der regionalen Hyperthermie in einem Mausmodell des malignen Melanoms“. Im Frühjahr 1999 wegen Umzugs der Arbeitsgruppe von Dr. Renz nach Marburg Wechsel zu Dr. Reinhard Geßner, ebenfalls Institut für Labormedizin der Charité.

## 7.5 Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde von Prof. Dr. Harald Renz und Dr. Reinhard Geßner initiiert. Ihnen danke ich für die freundliche Aufnahme in ihre Arbeitsgruppen und die großzügige finanzielle Förderung des Projektes.

Mein besonderer Dank gilt Dr. Reinhard Geßner, der nach der Berufung von Prof. Dr. Harald Renz nach Marburg das Projekt inhaltlich und organisatorisch betreut hat. Er war jederzeit bereit, die immunologische Fragestellungen zu diskutieren und hat mich durch seine Ideen immer wieder auf neue Wege gebracht. Damit hat er wesentlich zum Gelingen dieses Projektes beigetragen. Seine Ansprüche an die Planung, Durchführung und Interpretation von Versuchen werden mir immer ein Vorbild sein.

Auch bei Herrn Prof. Dr. Peter Walden danke ich für seine Hilfe und für viele interessante Gespräche über immunologische Probleme. Auch die RMA-Zellen und einige Antikörper verdanke ich ihm und seine wissenschaftlichen Mitarbeiterin Frau Dr. Katrin Sparbier.

Frau Christina Braun, Frau Elke Dyrks und Frau Christa Jostis, die zu verschiedenen Zeiten als technische Assistentinnen in dem Projekt gearbeitet haben, danke ich für die gute Zusammenarbeit und für die Unterstützung bei aufwendigen Versuchen ebenso wie in der Zellkultur und Labororganisation. Ich danke auch Frau Eva Suren und Herrn Kim Vogel für die Hilfe bei der quantitativen PCR. Eva wünsche ich viel Erfolg bei der Fortführung ihrer Arbeit im Hyperthermie-Projekt.

Allen weiteren technischen Assistentinnen, Diplomanden und Doktoranden der Arbeitsgruppen von Dr. Geßner und Prof. Dr. Renz, die aufzuzählen den Rahmen dieser Arbeit sprengen würde, danke ich für die stete Diskussions- und Hilfsbereitschaft und für das gute Arbeitsklima.

Abschließen möchte ich mit einem ganz besonderen Dank an meinen Partner Stephan Brües, der in den letzten Monaten der Leidtragende meiner exzessiven Arbeitszeit war und mich dennoch immer unterstützt hat. Ohne ihn wäre die Arbeit sicher nicht so entspannt zu ihrem Ende gekommen. Auch meiner Familie gilt Dank für ihre seelische Unterstützung.

Bei Ingelore, Jan, Claudia und Wolfram bedanke ich mich für ihre große Gastfreundschaft in den letzten Wochen. Ich habe mich bei ihnen wie zu Hause gefühlt.

Erklärung

Die vorliegende Arbeit habe ich selbständig angefertigt. Ich habe keine unerlaubten oder ungenannten Hilfsmittel verwendet.

Berlin, den 25.August 2002

Wiebke Wetzel