

Zur Rolle der HSP70- und MPR300-Gene für die Suszeptibilität von Tumorzellen gegenüber zytotoxischen T-Lymphozyten

Ralf Dressel

Abteilung Immungenetik
Universität Göttingen

Korrespondenzadresse

PD Dr. Ralf Dressel
Universität Göttingen, Bereich Humanmedizin
Abt. Zelluläre und Molekulare Immunologie
Heinrich-Düker-Weg 12
37073 Göttingen
Tel. 0551-395884
Fax 0551-395852
rdresse@gwdg.de



Zur Person

Ralf Dressel, geb. 1967 in Wolfsburg. 1988 bis 1995 Studium der Humanmedizin an der Georg-August-Universität Göttingen und an der Universität Oxford. 1996 – 2000 wissenschaftlicher Mitarbeiter in der Abteilung Immungenetik (Prof. Dr. E. Günther) der Universität Göttingen. Dissertation über „Untersuchungen zur Expression der MHC-gekoppelten HSP70-Gene von Mensch und Ratte“ (1997). 2000 – 2004 wissenschaftlicher Assistent (C1) in der Abteilung Immungenetik der Universität Göttingen (kommissarischer Direktor 2004: Prof. Dr. W. Engel). U. a. Projektleiter im Projekt „Bedeutung von stressinduzierbaren und konstitutiv exprimierten Mitgliedern der Hitzeschockprotein (HSP) 70-Familie für Tumorigenität und Immunogenität von Tumorzellen“ der Krebshilfe (2001-2003). Seit 2005 nach Auflösung der Abt. Immungenetik Arbeitsgruppenleiter in der Abt. Zelluläre und Molekulare Immunologie (Prof. Dr. J. Wienands). Projektleiter im Research Training Network TRANS-NET der EU, im GRK 1034 „Genetische Polymorphismen in der Onkologie“ und im Projekt „Exploring the world of non-messenger RNAs“ (NGFN-2). 2005 Habilitation für das Fach „Immunologie und Immungenetik“ an der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen mit dem Thema „Untersuchungen zur Suszeptibilität von Zielzellen gegenüber der durch zytotoxische T-Lymphozyten vermittelten Zytotoxizität“. Betreuung in der Fakultät durch Prof. Dr. W. Engel (Institut für Humangenetik).

Zusammenfassung der Habilitation

Effektorfunktion

der zytotoxischen T-Lymphozyten

Zytotoxische T-Lymphozyten (CTL) sind eine entscheidende Effektorzellpopulation des Immunsystems für die adaptive Immunreaktion gegen Virusinfektionen und maligne transformierte Zellen. CTL verfügen über verschiedene Mechanismen virusinfizierte Zellen oder Tumorzellen zu zerstören. Ein wesentlicher Mechanismus ist die Exozytose des Inhalts zytotoxischer Granula in eine sogenannte immunologische Synapse zwischen CTL und Zielzelle. Zytotoxische Granula sind spezialisierte sekretorische Lysosomen. Nach Erkennung der Zielzelle durch die zytotoxische Zelle bewegen sich die Granula auf die immunologische Synapse zu, lagern sich an die Membran an und verschmelzen schließlich mit ihr. Defekte in Molekülen, die an der Exozytose beteiligt sind, wie beim Griscelli- bzw. Hermansky-Pudlak-Syndrom, können zu einer Verminderung der über diesen Weg vermittelten zellulären Zytotoxizität führen. In den Granula befinden sich das Protein Perforin und eine Familie von zytotoxisch wirksamen Effektorproteasen, die so genannten Granzyme. Die Granzyme sind notwendig, um die Apoptose in den Zielzellen auszulösen, während Perforin eine entscheidende Rolle bei der Einschleusung der Granzyme in die Zielzellen spielt. Perforin-defiziente Mäuse zeigen eine ausgeprägte Immundefizienz. Mutationen im Perforin-Gen wurden auch in Familien mit Hämophagozytärer Lymphohistiozy-

tose nachgewiesen. Das gegenwärtige Lehrbuchmodell der Internalisierung von Granzymen sieht deren Aufnahme durch Poren vor, die von Perforin in der Membran der Zielzellen gebildet werden. Allerdings gibt es nur wenig experimentelle Evidenz für dieses Modell. Granzym B kann auch unabhängig von Perforin an Zielzellen binden und über eine rezeptorvermittelte Endozytose in endosomale Vesikel aufgenommen werden. Diese Aufnahme genügt aber nicht, um Apoptose in den Zielzellen zu induzieren. Es wird angenommen, dass Perforin die Freisetzung des Granzyms aus den Vesikeln in das Zytosol erlaubt. Interessanterweise wurde im Jahr 2000 berichtet, dass der Mannose-6-phosphat-Rezeptor MPR300 für die Internalisierung von Granzym B verantwortlich ist, und dass dieser Rezeptor nicht nur die CTL-vermittelte Apoptose, sondern auch die Abstoßung allogener Zellen nach einer Transplantation kontrolliert (Motyka et al., Cell 103: 491). Diese Befunde könnten auch eine Erklärung für die Beobachtung anbieten, dass sich *MPR300* wie ein Tumorsuppressorgen verhält. Der Verlust dieses Rezeptors könnte entsprechenden Tumorzellklonen einen Selektionsvorteil gegenüber dem Immunsystem bieten.

Hitzeschockproteine der HSP70-Familie und ihre Rolle bei der Regulation der Apoptose

Hitzeschockproteine, insbesondere solche der HSP70-Familie, können durch Stressoren, z. B. Hitzeschock, induziert werden. Allerdings sind nur einige der zur HSP70-Familie gehö-

renden Hitzeschockproteine nach Stress deutlich vermehrt oder überhaupt erst dann exprimiert. Dazu gehören insbesondere die beiden im Haupthistokompatibilitätskomplex (MHC) lokalisierten Gene *HSP70-1* und *HSP70-2*. Stressinduzierbare Hitzeschockproteine vermitteln als molekulare Chaperone einen protektiven Effekt für Zellen, in denen sie vermehrt exprimiert werden, indem sie zur Renaturierung von denaturierten Proteinen beitragen oder diese dem Abbau zuführen und so die Bildung von toxischen Proteinaggregaten verhindern. HSP70 kann Zellen vor Apoptose schützen und wird entsprechend in Tumoren häufig überexprimiert gefunden. Die tumorbiologische Relevanz der anti-apoptotischen Wirkung von HSP70 konnte auch in vivo durch Tierexperimente gezeigt werden. In verschiedenen Tumormodellen führte die Herunterregulation von HSP70 in den Tumoren tatsächlich zu einer Tumorregression. Interessanterweise wurde aber auch beschrieben, dass die HSP70-Expression in Tumoren mit einer günstigen Prognose assoziiert sein kann. Experimentelle Befunde sprechen ebenfalls dafür, dass HSP70 nicht immer Resistenz gegen apoptoseauslösende Mechanismen vermitteln muss, sondern eine wesentlich komplexere Rolle spielt. Verschiedene tierexperimentelle Modelle zeigten, dass eine HSP70-Expression in Tumoren mit einer Tumorregression assoziiert sein kann. Diese Befunde können durch eine verstärkte Immunogenität HSP70-exprimierender Tumore erklärt werden. Hitzeschockproteine, darunter HSP70, können das Immunsystem antigenspezifisch aber auch antigenunspezifisch aktivieren. Im Tierexperiment ist es möglich, mit HSP70-Präparationen aus Tumorzellen eine tumorspezifische Vakzinierung durchzuführen und tumorspezifische CTL zu induzieren. Der Grund für die spezifische Immunogenität der Hitzeschockprotein-Präparationen ist in ihrer Fähigkeit zu suchen, antigene Peptide zu binden. Die besondere Immunogenität der HSP/Peptid-Komplexe ist darauf zurückzuführen, dass die Hitzeschockproteine und damit auch die gebundenen Peptide, die das antigene Repertoire der Tumorzellen repräsentieren, rezeptorvermit-

telt in professionelle antigenpräsentierende Zellen (APC) eingeschleust werden. Die rezeptorvermittelt aufgenommenen Antigene gelangen in den MHC-Klasse-I-Präsentations-Weg der professionellen APC, so dass eine starke durch CTL getragene antitumorale Immunantwort induziert wird. Es stellte sich daher die Frage, ob HSP70 gegenüber der CTL-vermittelten Zytotoxizität protektiv wirkt, an deren Induktion das Protein beteiligt ist. Die Rolle der Hitzeschockproteine der HSP70-Familie in der über den Granula-Exozytose-Weg vermittelten zellulären Zytotoxizität war bisher kaum analysiert worden.

Proapoptotische Wirkung von HSP70 im Granula-Exozytose-Weg der CTL

Die Ratten-Myelomzelllinie Y3 entwickelt nach Hitzeschock eine reversible Resistenz gegenüber alloreaktiven CTL. Ein ähnliches Verhalten ist in der Literatur nur für wenige andere Zelllinien beschrieben worden. In diesem Modell konnten wir zeigen, dass HSP70 die in dieser Zelllinie durch Hitzeschock auslösbare Resistenz gegen CTL zu verhindern vermag. Ein HSP70-Transfer erhält in diesen Zellen die Suszeptibilität gegenüber CTL, die den Granula-Exozytose-Weg zur Apoptoseinduktion nutzen. Die Hypothese, dass HSP70 die CTL-induzierte und über den Granula-Exozytose-Weg vermittelte Apoptose von Zielzellen zu steigern vermag, wurde gestützt und erweitert durch Befunde, die wir in einem anderen experimentellen System erhoben haben. Auch in einer humanen Melanomzelllinie konnten wir durch eine akute Überexpression von HSP70 in einem konditionalen Expressionssystem die Suszeptibilität der Zellen gegenüber CTL steigern. Eine permanente starke Überexpression von HSP70 führte dagegen nicht zu einer veränderten Lyserbarkeit dieser Zellen. Diese Unterschiede zwischen akuter und permanenter HSP70-Überexpression konnten auf Adaptationsvorgänge des zellulären Chaperonnetzwerkes in Reaktion auf eine permanente HSP70-Überexpression zurückgeführt werden, die zu einer kompensatorischen Reduktion der Expression von HSC70, einem konstitutiv exprimier-

ten HSP70-Familienmitglied, führen. Die Gegenregulation der HSC70-Expression infolge der permanenten HSP70-Überexpression findet interessanterweise nicht auf der RNA- sondern auf der Proteinebene statt. In den beiden untersuchten Modellen, den Myelom- und den Melanomzellen, wurde durch HSP70 nicht die Erkennung der Zielzellen über die Antigenpräsentation beeinflusst, sondern die Exekution der zellulären Zytotoxizität im Granula-Exozytose-Weg. HSP70 kann also offenbar bei akuter Überexpression in den Zielzellen von CTL eine pro-apoptotische Funktion übernehmen. HSP70 könnte als molekulares Chaperon den Ablauf der Perforin- und Granzym-abhängigen CTL-induzierten Apoptose verbessern. Im Rahmen der Analyse der molekularen Mechanismen dieser HSP70-Wirkung haben wir zunächst die Granzym B-vermittelte Apoptose untersucht.

Keine Rolle für den MPR300 bei der im Granula-Exozytose-Weg vermittelten zellulären Zytotoxizität

Das konstitutiv exprimierte Mitglied der HSP70-Familie, HSC70, ist auch als „clathrin-uncoating ATPase“ bekannt; es spielt also eine Rolle bei der Clathrin-abhängigen Endozytose. Daher sollte überprüft werden, ob die akute HSP70-Überexpression die in der Literatur beschriebene MPR300-abhängige Endozytose von Granzym B steigert. Anhand von MPR300- und zusätzlich MPR46-defizienten Mäusen konnten wir jedoch zeigen, dass beide Rezeptoren für die Granzym B-Aufnahme und die Granzym B- oder CTL-induzierte Apoptose keine Rolle spielen. Da der MPR300 auch für die Transplantatabstoßung essentiell sein sollte, wurde das Wachstum von MPR300-defizienten Zellen in vivo untersucht. In der allogenen Situation wurden jedoch auch die MPR300-defizienten Zellen abgestoßen. In einer histokompatiblen Situation zeigten sie aber in der Maus eine erhöhte Tumorigenität, was mit einer postulierten Rolle des *MPR300*-Gens als Tumorsuppressorgen vereinbar ist und über eine verstärkte Proliferation der MPR300-defizienten Zellen erklärt werden könnte.

Überlegungen zur Funktion von HSP70 in den Zielzellen zellulärer Zytotoxizität

Die Funktion von HSP70 als molekulares Chaperon macht es wahrscheinlich, dass das Resultat einer veränderten HSP70-Expression primär von den Zielmolekülen abhängt, deren Funktion durch dieses Chaperon moduliert wird. Es ist daher nicht unplausibel, dass neben anti-apoptotischen auch pro-apoptotische Proteine bzw. Funktionen durch Chaperone unterstützt werden können, und es daher von weiteren Faktoren abhängt, wie sich eine HSP70-Überexpression in einem bestimmten Apoptoseweg auswirkt.

So könnte ein Hitzeschock in den HSP70-negativen Myelomzellen zu einem partiellen Funktionsverlust von Molekülen führen, die für den Ablauf des CTL-induzierten Perforin- und Granzym-abhängigen Zelltodes notwendig sind. Transferiertes HSP70 könnte in seiner Eigenschaft als molekulares Chaperon nach Hitzeschock zelluläre Proteine funktionsfähig erhalten, die die CTL-induzierte Lyse vermitteln und so die Suszeptibilität der Zielzellen steigern. In der humanen Melanomzelllinie, die mit einem System zur konditionalen Überexpression von HSP70 transfiziert wurde, führte die akute Induktion von HSP70 zu einer erhöhten Suszeptibilität gegen CTL, ohne dass die Zellen zuvor einem Stress ausgesetzt worden waren. HSP70 als molekulares Chaperon scheint hier den Ablauf der CTL-induzierten Apoptose verbessern zu können, auch ohne dass zuvor Proteine durch einen Stress, z. B. einem Hitzeschock, in ihrer Funktion beeinträchtigt worden sind. Ein konzeptionell ganz ähnlicher Befund ist für das Chaperon HSP60 berichtet worden, das durch Bindung an die Procaspase-3 deren Aktivierung ermöglicht. Als Zielmoleküle für das HSP70, die die postulierte pro-apoptotische Wirkung vermitteln, kommen alle Proteine in Betracht, die auf der Zielzelleseite essentiell am Perforin/Granzym-vermittelten Zelltod beteiligt sind. Als erstes sind hier die Granzyme selbst zu nennen. Interessanterweise ist eine Interaktion zwischen HSP70 und Granzym A in den Zielzellen von CTL gefunden worden. Auch Granzym B

bindet direkt an HSP70. Diese Interaktion könnte die Effektivität der Granzym-Wirkung steigern. Hitzeschockproteine könnten die Granzyme beispielsweise vor Inaktivierung schützen oder eine Funktion beim intrazellulären Transport der Granzyme übernehmen. HSP70 kann auch an die caspaseaktivierte DNase (CAD) binden und deren Aktivität dadurch steigern. Dieser Befund wurde nach einer Apoptoseinduktion durch T-Zell-Rezeptor-Stimulation erhoben, doch er könnte auch nach einer CAD-Aktivierung im Rahmen einer Granzym-vermittelten Apoptose relevant sein. Die genauen Mechanismen der Perforin/Granzym-vermittelten Apoptose sind keineswegs schon vollständig verstanden. Daher ist es möglich, dass entscheidende Interaktionspartner von HSP70 im Granula-Exozytose-Weg der zellulären Zytotoxizität noch unbekannt sind und erst in weiteren Untersuchungen der CTL-induzierten Apoptose identifiziert werden müssen.

Hypothese zur biologischen Bedeutung von HSP70 in den Zielzellen zellulärer Zytotoxizität

Es ist bekannt, dass die zelluläre Stressreaktion eine zytoprotektive Wirkung hat, die auch die Suszeptibilität von Tumorzellen, z. B. gegenüber Chemotherapeutika, vermindern kann. Sterben aber Tumorzellen ab, tragen freigesetzte Hitzeschockproteine dazu bei, das angeborene und adaptive Immunsystem zu aktivieren und eine antitumorale Immunantwort in Gang zu setzen. Unsere Ergebnisse zeigen, dass die Überexpression von HSP70 Tumorzellen nicht vor der durch CTL vermittelten zellulären Zytotoxizität schützt. Im Gegensatz zu anderen Apoptosewegen wirkt HSP70 im Granula-Exozytose-Weg der CTL nicht zytoprotektiv und nicht anti-apoptotisch. Eine akute Überexpression von HSP70 kann sogar die Suszeptibilität der Zellen gegenüber den CTL steigern. CTL sind somit in der Lage auch solche Zellen zu beseitigen, die eine an sich zytoprotektive Stressreaktion durchlaufen oder durchlaufen haben und gegen zahlreiche Apoptosemechanismen eine erhöhte Resistenz zeigen. Das adaptive Immunsystem verfügt damit über zytotoxische Mechanismen, die in der Lage sind, anti-

apoptotische Mechanismen der Stressantwort potentieller Zielzellen zu umgehen.

Resistenz- und Suszeptibilitätsfaktoren im Granula-Exozytose-Weg der CTL

Da dem Granula-Exozytose-Weg der zellulären Zytotoxizität eine große Bedeutung bei der immunologischen Abwehr von Infektionen und Tumoren aber auch bei der Transplantatabstoßung und bei Autoimmunreaktionen zugemessen wird, ist die Aufklärung weiterer Resistenz- und Suszeptibilitätsfaktoren der Zielzellen von großer medizinischer Relevanz. Es sind noch zahlreiche Aspekte der Wirkung von Perforin, der Aufnahme von Granzymen in Zielzellen und der molekularen Wirkung der verschiedenen Granzyme unverstanden. Gene, welche die Suszeptibilität bzw. Resistenz von Zielzellen gegenüber zytotoxischen Zellen modulieren, sind von besonderem Interesse. Die Rolle von HSP70, das bei akuter Überexpression in diesen zytotoxischen Wegen im Gegensatz zu seinen sonstigen anti-apoptotischen Funktionen offenbar pro-apoptotisch wirkt, ist ein besonders interessantes Beispiel. Es wird Gegenstand weiterer Arbeiten sein, den molekularen Mechanismus der HSP70-Wirkung aufzuklären.

Literatur

Dressel R, Lübbers M, Walter L, Herr W, Günther E (1999) Enhanced susceptibility to cytotoxic T lymphocytes without increase of MHC class I antigen expression after conditional overexpression of heat shock protein 70 in target cells. *Eur J Immunol* 29: 3925-3935.

Dressel R, Elsner L, Quentin T, Walter L, Günther E (2000) Heat shock protein 70 is able to prevent heat shock-induced resistance of target cells to cytotoxic T lymphocytes. *J Immunol* 164: 2362-2371.

Dressel R, Grzeszik C, Kreiss M, Lindemann D, Herrmann T, Walter L, Günther E (2003) Differential effect of acute and permanent heat shock protein 70 overexpression in tumor cells on lysis by cytotoxic T lymphocytes. *Cancer Res* 63: 8212-8220.

Dressel R, Raja SM, Höning S, Seidler T, Froelich CJ, von Figura K, Günther E (2004) Granzyme-mediated cytotoxicity does not involve the mannose 6-phosphate receptors on target cells. *J Biol Chem* 279: 20200-20210.

Dressel R, von Figura K, Günther E (2004) Unpaired allorecognition of cell deficient for the mannose 6-phosphate receptors, MPR300 and MPR46. *Transplantation* 78: 758-761.