

**Aus dem Interfakultären Institut für Zellbiologie der Universität
Tübingen**

-Abteilung Immunologie-

Abteilungsleiter: Professor Dr. H.-G. Rammensee

**Aktivierung von T-Zellen durch Glykoprotein 96-
gereifte Dendritische Zellen**

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin**

**der Medizinischen Fakultät
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen**

**vorgelegt von
Sabina Maria Haager
aus München**

2004

Dekan: Professor Dr. C. D. Claussen
1. Berichterstatter: Professor Dr. H.-G. Rammensee
2. Berichterstatter: Frau Professor Dr. C. Müller

Inhaltsverzeichnis

Vorbemerkung	5
1. EINLEITUNG	6
1.1 Das Immunsystem - ein Überblick	6
1.2 Die Zellen des adaptiven Immunsystems	8
1.2.1 Die B-Lymphozyten	8
1.2.2 Die T-Lymphozyten	10
1.3 Wege der Antigen-Prozessierung	13
1.3.1 Die MHC-Moleküle	13
1.3.2 Der klassische MHC Klasse I Antigenprozessierungsweg	16
1.3.3 Der klassische MHC Klasse II Antigenprozessierungsweg	18
1.3.4 Kreuzpräsentation	19
1.4 Die Dendritischen Zellen	23
1.5 Das Hitzeschockprotein Gp96	24
1.5.1 Die Peptidbindung	27
1.5.2 Rezeptorvermittelte Endozytose	28
1.5.3 HSP-vermittelte Zytokinproduktion und DC-Reifung	29
1.6 Zielsetzung	31
2. MATERIAL UND METHODEN, ERGEBNISSE	32
Glycoprotein 96-activated dendritic cells induce a CD8-biased T-cell response (zur Publikation eingereicht)	
2.1 Introduction	34
2.2 Materials and Methods	36
2.2.1 Mice	36
2.2.2. Generation of DCs	36
2.2.3 Stimulation of DCs	37
2.2.4 Stimulation of alloreactive T cells	38

2.2.5	Stimulation of St42 CD8 T cells <i>in vitro</i>	38
2.2.6	Adoptive Transfer	38
2.3	Results	40
2.3.1	Dendritic cells are activated by Gp96	40
2.3.2	Dendritic cells matured by Gp96 show enhanced stimulation of peptidespecific CD8 T cells <i>in vitro</i>	40
2.3.3	Gp96-matured dendritic cells show enhanced stimulation of CD8 T cells <i>in vivo</i>	41
2.3.4	Mouse Gp96-matured DCs preferentially activate CD8 T cells vs. CD4 T cells <i>in vivo</i>	44
2.3.5	Human Gp96-matured dendritic cells preferentially stimulate CD8 T cells	46
2.4	Discussion	48
3.	DISKUSSION	51
3.1	Aktivierung von DCs durch Gp96	51
3.2	Wirkung der durch Gp96 aktivierten DCs auf peptidspezifische CD8 und CD4 T-Zellen	52
3.3	Aktivierung von alloreaktiven CD8 T-Zellen durch humane mit Gp96 aktivierte DCs	53
4.	ZUSAMMENFASSUNG	55
5.	LITERATURVERZEICHNIS	57
5.1	Lehrbücher	57
5.2	Original Publikationen und Reviews	57
6.	DANKSAGUNG	68
7.	LEBENS LAUF	70

Vorbemerkung

Material und Methoden sowie der Ergebnisteil der vorliegenden Dissertation wurden in englischer Sprache verfasst, da dieser Teil der Doktorarbeit zu einer Publikation geführt hat und nur in englischer Sprache die wissenschaftliche Verbreitung der Ergebnisse gewährleistet ist. Die Einleitung und der Diskussionsteil wurden in der deutschen Sprache belassen.

1. Einleitung

1.1 Das Immunsystem – ein Überblick

Über 400 Millionen Jahre hat die Evolution benötigt, um den hochdifferenzierten und anpassungsfähigen Abwehrapparat in Form unseres Immunsystems zu entwickeln, welches unseren Organismus vor Infektionserregern wie Bakterien, Viren, Pilzen, Parasiten sowie entarteten Zellen zu schützen versucht.

Die Wissenschaft der Immunologie begann wohl im Jahre 1798, als Edward Jenner, englischer Arzt, mit seiner Publikation „An inquiry into the Causes and Effects of the Variolae Vaccinae“ die Pocken-Impfung einführte, die Grundlage werden sollte für einer der größten Triumphe der modernen Medizin, nämlich der im Jahre 1979 von der Weltgesundheitsorganisation bekannt gegebenen Ausrottung der Pocken.

Jedoch wusste Jenner noch nichts von dem die Krankheit auslösenden Agens und so war es Robert Koch vorbehalten, Ende des 19. Jahrhunderts den Beweis zu liefern, dass infektiöse Krankheiten von Mikroorganismen verursacht werden. Wir kennen heute 4 große Kategorien von krankheitsauslösenden Mikroorganismen oder Pathogenen: Viren, Bakterien, pathogene Pilze und Parasiten.

Um 1880 experimentierte Louis Pasteur mit Bakterien, die später *Pasteurella multocida* genannt wurden und Cholera in Hühnern hervorrufen konnten. Im Rahmen dieser Versuche demonstrierte er, dass auch mit Kulturen abgeschwächter Bakterien eine Impfung, hier gegen Hühnercholera, möglich ist.

So entbrannte in dieser Zeit eine große Diskussion um den Mechanismus der Impfung, die den Grundbaustein darstellte für die Entwicklung der Wissenschaft der Immunologie.

Der Begriff Immunsystem stammt vom lateinischen Wort *Im-munitas*, was eigentlich Schutz vor gesetzlicher Verfolgung bedeutet, hier aber den Schutz des Organismus vor Fremdkörpern meint.

Das Immunsystem gliedert sich in ein angeborenes und ein adaptives System. Das angeborene System ist phylogenetisch älter und bildet eine erste Barriere gegen eindringende Pathogene. Es umfasst z.B. den Säuremantel der Haut, eine intakte Epidermis, das Komplementsystem, antimikrobielle Enzymsysteme sowie unspezifische Mediator-

ren wie Interferone und Interleukine. Auf der zellulären Seite sind v.a. das Makrophagen-Monozyten-System, die Granulozyten und die Natürlichen Killerzellen (NK) zu nennen, wobei letztere eine Zwischenstellung zwischen dem angeborenen und dem adaptiven System einnehmen.

Zunächst wurde dieses System als ein unspezifisches bezeichnet, da es nicht auf ein individuelles Pathogen antworten kann. Es wird unabhängig vom pathogenen Erreger direkt aktiv, ohne dass es zu einem früheren Zeitpunkt mit ihm in Berührung gekommen sein muss. So ist seine schnelle Einsatzfähigkeit gesichert. Heute weiß man jedoch, dass es nicht so unspezifisch ist, wie zunächst vermutet und sehr wohl zwischen selbst und fremd unterscheiden kann. Es erkennt hochkonservierte Schlüsselmoleküle, die auf Pathogenen vorkommen (pathogen associated molecular patterns, PAMPs) wie z.B. bakterielles Lipopolysaccharid (LPS), Peptidoglykane, Lipoteichonsäure, Mannane sowie Glykane über invariable Rezeptoren (pattern recognition receptors, PRRs) (Aderem and Ulevitch, 2000). Zu diesen PRRs zählen z.B. der Mannose Rezeptor, der v.a. bei Makrophagen vorkommt und an konservierte Mannose reiche Kohlehydrate auf Bakterien und einigen Viren bindet und so zur Phagozytose führt (Aderem and Underhill, 1999; Fraser et al., 1998). Auch Scavenger-Rezeptoren wie CD36 und CD91 können hier angeführt werden. Sie erkennen bestimmte anionische Polymere und acetylierte low-density Lipoproteine (Febbraio et al., 2001; Herz and Strickland, 2001).

Die Trennung zum adaptiven System ist jedoch nicht immer so klar, da das angeborene System auch an der Initiation und Steuerung der adaptiven Immunabwehr beteiligt ist.

Das adaptive Immunsystem, das erstmals bei Wirbeltieren zu finden ist, zeichnet sich durch Antigen-spezifität, einer Vielfalt an Rezeptoren, einem Gedächtnis und einer Selbst-Fremd-Erkennung aus. Die B- und T-Lymphozyten, die die Zellen dieses Systems darstellen, haben demnach jeweils nur einen spezifischen Rezeptor mit jeweils unterschiedlichen Spezifitäten und können so auch molekulare Strukturen (Antigene) erkennen. Wenn sie ein Antigen erkennen, kommt es zu einer klonalen Proliferation, die 3 bis 5 Tage dauert und es entstehen Effektor- und Gedächtniszellen, wobei letztere für das immunologische Gedächtnis verantwortlich sind.

Das adaptive Immunsystem kann so auch effizient gegen pathogene Organismen vorgehen, die resistent gegenüber der angeborenen Abwehr sind.

Bei Neugeborenen sind es die Antikörper der Mutter, die bis zur Reifung der eigenen adaptiven Abwehr für den immunologischen Schutz zuständig sind

1.2 Die Zellen des adaptiven Immunsystems

Eine Beteiligung von Lymphozyten an der Immunabwehr wurde zum ersten Mal 1942 von Karl Landsteiner und Merrill Chase bewiesen, obwohl z.B. die Makrophagen schon 1883 von Ellie Metchnikoff beschrieben wurden.

Dass es zwei Arten von Lymphozyten sind, die für die adaptive Immunität verantwortlich sind, wurde erst 1962 von Burnet gezeigt. Jedoch wurden sie erst später B- (für Bursa Fabricii) und T-(für Thymus) Zellen genannt.

Das adaptive System gliedert sich in eine zelluläre und eine humorale Komponente (humor, lat.: Flüssigkeit). Effektorzellen der humoralen Seite sind die B-Zellen, wohingegen die T-Zellen zur zellulären Abwehr zählen.

1.2.1 Die B-Lymphozyten

Aufgabe der aus dem Knochenmark stammenden B-Lymphozyten ist es Antikörper zu produzieren. Um diesen Vorgang in Gang zu setzen, binden Antigene spezifisch an die B-Zell-Oberfläche über membrangebundene Immunglobuline und werden internalisiert. Im Zellinnern erfolgt dann der Abbau der endozytierten Proteine zu Peptiden und anschließend der Transport an die Zelloberfläche. Dort werden diese Peptide über MHC Klasse II-Moleküle (MHC = Major Histocompatibility Complex) T-Helfer-Zellen präsentiert, die wiederum die B-Zelle aktivieren bzw. primen und so ihre Differenzierung in eine Antikörper sezernierende Plasmazelle unterstützen. 3 Signale sind notwendig für das Priming der B-Zelle: erstens ein Antigen, das den B-Zellrezeptor (BZR) kreuzvernetzt, zweitens die T-Helfer-Zelle, die Peptid-Fragmente spezifisch auf MHC Klasse II-Molekülen an der B-Zell-Oberfläche erkennt, und drittens die Bindung von CD40-Ligand (CD40-L) der T-Helfer-Zelle an CD40 auf der B-Zelle, was zu einer Stimulation der T-Helfer-Zelle führt mit einem Anstieg der Interleukin-4 (IL-4) Produktion. IL-4 bewirkt daraufhin eine Proliferation und Differenzierung der B-Zellen.

Diese Kooperation zwischen B- und T-Zellen wurde zum ersten Mal gezeigt in den 1960er Jahren von Anthony Davies, Henry Claman, Graham Mitchell und Jacques Miller. Die Plasmazelle kann nun lösliche Immunglobuline bzw. Antikörper sezernieren, die v.a. eine Neutralisation und eine Opsonierung der Fremdkörper bewirken, aber auch das Komplement-System aktivieren, das ebenfalls eine Opsonierung, aber auch eine Lyse des Pathogens hervorrufen kann. Opsonierung bedeutet eine Kreuzvernetzung von Antigenen auf der Oberfläche von Pathogenen, was die Erkennung durch phagozytische Zellen erleichtert.

Die Existenz von Antikörpern wurde zum ersten Mal 1890 von Emil von Behring und Shibasaburo Kitasato postuliert, die mit *Corynebacteriae diphtheriae* arbeiteten. Sie spritzten Serum von Tieren, die gegen Diphtherie resistent waren, in normale Tiere und beobachteten, dass auch diese vakzinierten Tiere resistent wurden. Daraus schlossen sie, dass das Serum der immunen Tiere Antitoxine enthalten muss, das spezifisch die Toxine der Bakterien neutralisieren kann, die zuvor das Tier infiziert haben. Erst 1900 wurde das deutsche Wort „Antikörper“ von Karl Landsteiner eingeführt. Die Substanzen, die von diesen Antikörpern erkannt wurden, wurden als Antigene bezeichnet.

Eine erste Isolierung von Antikörpern gelang 1926 Felton und Bailey, so dass chemische Analysen durchgeführt werden konnten, die zeigten, dass es sich um Proteine handelt.

Jeder B-Zell-Klon hat einen unterschiedlichen Antikörper membrangebunden auf der Oberfläche, und ein Klon kann auch nur diesen einen Antikörper nach Antigen-Bindung und Differenzierung in eine Plasmazelle produzieren. Diese Diversität der Antikörper beruht auf somatischer Rekombination der Immunglobulin-Gene, wofür erste Hinweise um 1975 von Susumu Tonegawa geliefert wurde, wofür ihm 1987 der Nobelpreis verliehen wurde (Hozumi and Tonegawa, 1976).

1.2.2 Die T-Lymphozyten

Auch die T-Lymphozyten stammen aus dem Knochenmark, wandern jedoch als unreife T-Zellen in den Thymus, um sich dort zu Ende zu entwickeln. Es gibt hauptsächlich zwei verschiedene Arten von T-Zellen, die $\alpha:\beta$ - und die $\gamma:\delta$ -T-Zellen, die sich in ihrem T-Zell-Rezeptor (TCR), einem heterodimeren, membranständigen Molekül, unterscheiden.

Von den $\gamma:\delta$ -T-Zellen weiß man wenig. Sie befinden sich in lymphoiden und intraepithelialen Geweben und man glaubt, dass sie Liganden wie Hitzeschockproteine (HSP), nicht klassische MHC-Moleküle, Nukleotide und Phospholipide ohne die Notwendigkeit einer Präsentation über MHC-Moleküle erkennen.

Dagegen ist die Anforderung an die $\alpha:\beta$ -T-Zellen, dass sie körpereigene MHC-Moleküle über ihren TCR erkennen können (Selbst-MHC-Restriktion), aber tolerant sind gegenüber auf MHC-Molekülen präsentierten Selbstpeptiden (Selbsttoleranz). Hierfür ist eine Selektion im Thymus notwendig. In der Maus dauert diese ungefähr drei Wochen, und es verlassen nur ca. 2-4% den Thymus als reife T-Zellen.

Der Thymus ist geteilt in eine äußere kortikale Region (Kortex) und in eine innere, die Medulla. Während der Entwicklung der $\alpha:\beta$ -T-Zellen findet die positive Selektion im Kortex statt, d.h., nur wenn die eigenen MHC-Moleküle erkannt werden, überleben die Zellen und wandern weiter zur Medulla. Dort kommt es zur negativen Selektion. Erkennen die Zellen Selbst-Antigene (Peptide körpereigener Proteine), werden sie durch Apoptose, dem programmierten Zelltod, eliminiert. Wenn nicht, verlassen die $\alpha:\beta$ -T-Zellen nun den Thymus als reife, naive CD4 oder CD8 T-Zellen. So befinden sich ca. 25-100 Millionen naive T-Zellklone unterschiedlicher Spezifität im menschlichen Organismus (Arstila et al., 1999), wofür ähnlich wie bei den Antikörpern der B-Zellen eine Kombination mehrerer Gensegmente, die Insertion und Deletion von Verbindungsbereichen (junctions) sowie die zufällige Kombination der fertigen Ketten verantwortlich sind.

Die $\alpha:\beta$ T-Zellen unterteilen sich in CD4 oder CD8 T-Zellen.

Zu den CD4 T-Zellen gehören sowohl T_H1 - als auch T_H2 -Zellen. In welche dieser Subtypen sich naive CD4 T-Zellen entwickeln, hängt v.a. von dem sie umgebenden Zyto-

kinmilieu zum Zeitpunkt der Antigenerkennung ab. Während IFN- γ und IL-12 v.a. eine T_H1-Antwort initiieren, bevorzugt IL-4 eine T_H2-Antwort. T_H1- und T_H2-Zellen unterscheiden sich in ihrem Zytokin-Profil. T_H1-Zellen produzieren vor allem IFN- γ und induzieren bevorzugt zelluläre Immunität. Sie aktivieren v.a. Makrophagen, die Antigene auf den MHC Klasse II-Molekülen präsentieren, durch Hochregulation von CD40L und verschiedenen Zytokinen. T_H2-Zellen dagegen zeichnen sich hauptsächlich durch Produktion von IL-4 und IL-5 aus und bevorzugen die Aktivierung der humoralen Immunität ebenfalls durch verstärkte Expression von CD40L.

Die CD8 T-Zellen sind als zytotoxische T-Zellen (CTLs) v.a. für die Elimination von virusinfizierten Zellen verantwortlich. Dies erfolgt durch Perforine, die Löcher in der Zellmembran hervorrufen, durch Granzyme, die als Proteasen intrazellulär agieren und Apoptose bewirken, und durch Fas Ligand (CD95L), der an den Todesrezeptor Fas (CD95) bindet und ebenfalls zur Apoptose führt.

Die α : β -T-Lymphozyten zirkulieren im Blut und den peripheren lymphatischen Organen. Wenn sie in den Lymphknoten mit ihrem TCR auf ein passendes Antigen treffen, das dort auf MHC-Molekülen von Antigen präsentierenden Zellen (APCs) (=Erstsignal) zusammen mit kostimulatorischen Molekülen (=Zweitsignal) gezeigt wird, kommt es zur Aktivierung (Priming) der T-Lymphozyten. Dabei erkennen naive CD8 T-Zellen ihr Antigen auf MHC Klasse I-Molekülen, die auf allen kernhaltigen Zellen exprimiert werden, wohingegen für CD4 T-Zellen das Antigen an MHC Klasse II-Moleküle gebunden sein muss, die v.a. auf APCs zu finden sind. Diese MHC-Restriktion wurde zum ersten Mal 1974 von Peter Doherty und Rolf Zinkernagel gezeigt, wofür ihnen 1996 der Nobelpreis verliehen wurde.

Der alleinige Kontakt von TCR und MHC-Peptid-Komplex führt jedoch nur zu einem schwachen Signal, so dass einerseits eine hohe Antigenkonzentration notwendig ist, andererseits das Signal durch die Korezeptoren CD4 und CD8 um das 100fache verstärkt wird.

Die T-Zellen finden Eingang in die Lymphknoten über die sogenannten high endothelial venules (HEV). Diese sezernieren secondary lymphoid tissue chemokine (SCL), das an CCR7 der T-Zellen bindet, und exprimieren Adhäsions-Moleküle, wodurch eine Erleichterung des Homings für T-Lymphozyten stattfindet. Z.B. bindet GlyCAM-1 und CD34 an L-Selectine auf der Oberfläche von naiven T-Lymphozyten.

Die darauffolgende Zell-Zell-Interaktion wird v.a. über Integrine gesteuert, den intercellular adhesion molecules (ICAMs) und dem lymphocyte function-associated antigen 1 (LFA-1). Speziell bei der Interaktion der T-Zellen mit den APCs interagiert CD2 mit LFA-3, LFA-1 mit ICAM-1, LFA-1 mit ICAM-2 oder ICAM-3 mit Lectin DC-SIGN, das nur auf DCs zu finden ist (Montoya et al., 2002).

Für das Priming sind zwei Signale notwendig: erstens die spezifische Antigen-Erkennung durch den TCR auf MHC-Molekülen der APCs und zweitens die Kostimulation.

Die Kostimulation erfolgt v.a. über die Interaktion des Oberflächenmoleküls CD28 auf T-Zellen mit den B7-Molekülen (B7.1 = CD80 und B7.2 = CD86) auf APCs. Außerdem kommt es zu einer Hochregulation von Signalmolekülen auf beiden Seiten.

Es wird z.B. CD40L (CD154) von aktivierten CD4 T-Zellen und zugleich CD40 auf APCs hochreguliert, was zu einem Anstieg der B7-Moleküle sowie der MHC-Moleküle führt. Außerdem gehört dazu auch die Expression von 4-1BB (CD137) auf aktivierten T-Zellen zusammen mit dem 4-1BB-Ligand (4-1BBL, CD137L) auf aktivierten DCs. CTLA-4 (CD152) auf aktivierten T-Zellen führt dagegen bei Interaktion mit den B7-Molekülen zu einer Inhibition der T-Zellen, eine Modulationsmöglichkeit der T-Zell-Antwort (Schwartz et al., 2002). Zudem kommt es in diesem Rahmen auch zu einer Interaktion von ICOS (inducible costimulator) mit LICOS (Ligand von ICOS) auf aktivierten APCs.

Die T-Zellen die auf diese Weise geprimt werden, treten in die G1-Phase des Zellzykluses ein, proliferieren 2-3 mal pro Tag über mehrere Tage und produzieren IL-2, was die Synthese der α -Kette (CD25) des IL-2 Rezeptors zur Folge hat. Der IL-2 Rezeptor besteht aus 3 Ketten, der α , β , und γ -Kette. Ruhende T-Zellen exprimieren eine Form dieses Rezeptors bestehend aus β - und γ -Kette. Dieser Rezeptor bindet IL-2 mit mäßiger Affinität, eine Antwort entsteht daher nur bei sehr hohen IL-2 Konzentrationen. Wird dagegen noch die α -Kette assoziiert, entsteht eine höhere Affinität für IL-2, die eine Antwort auch bei sehr geringen IL-2 Konzentrationen ermöglicht. Die Bindung von IL-2 an den Rezeptor bildet dann ein Signal für die Zelle, den Rest des Zellzykluses zu durchlaufen.

Die Entwicklung zur Effektorzelle dauert in etwa 4 bis 5 Tage.

Für die Differenzierung der naiven CD8 T-Zellen zu CTLs ist bei Abwesenheit von Infektionen noch zusätzlich eine indirekte Stimulation durch T_H1 -Zellen notwendig. Nur wenn diese gleichzeitig mit ihrem CD40L an CD40 auf der Oberfläche von APCs binden, können die CD8 T-Zellen geprimt werden (Schoenberger et al., 1998).

Wenn die T-Zelle einmal geprimt wurde, ist keine Kostimulation mehr nötig. Jedes Zusammentreffen mit dem entsprechenden Antigen führt dann zu einer Immunantwort. Eine Antigen-Erkennung ohne kostimulatorisches Signal führt dagegen zur T-Zell-Toleranz, die T-Lymphozyten werden anergisch. Sie produzieren kein IL-2, es kommt zu keiner Proliferation und Differenzierung in eine Effektor-Zelle. Somit besteht ein zusätzlicher Schutz zur Toleranz gegenüber Selbstmolekülen, falls die negative Selektion im Thymus einmal nicht funktioniert hat oder periphere Antigene im Thymus nicht exprimiert werden. Allerdings wird diskutiert, ob nicht auch ein kostimulatorisches Milieu, d.h. Zytokine und Kostimulation von nahen APCs, ausreicht für das Priming. Dies wäre ein möglicher Erklärungsansatz, warum Autoimmunerkrankungen oft in Zusammenhang mit Infektionen stehen.

1.3 Wege der Antigen-Prozessierung

1.3.1 Die MHC-Moleküle

1936 wurden zunächst die MHC-Moleküle der Maus von Peter Gorer entdeckt, der sich v.a. für Gene interessierte, die das Tumorwachstum kontrollieren. George Snell hat diese H2- (Histocompatibility-2) Moleküle genannt. Der Begriff MHC für Major Histocompatibility Complex entstand erst viel später. Die MHC-Moleküle des Menschen wurden 1958 zum ersten Mal von Jean Dausset und 1962 von Jon van Rood und Rose Payne beschrieben, wobei sie letzterer auch den Namen HLA (Human Leukocyte Antigen) verdanken.

MHC-Moleküle haben ein gebundenes Peptid als integralen Bestandteil ihrer Struktur. Es wird verhindert, dass leere MHC-Moleküle auf die Zelloberfläche gelangen können und dort extrazelluläre Peptide binden (Rock and Goldberg, 1999).

Die ca. 200 Gene des HLA-Komplexes befinden sich auf Chromosom 6. Dabei zeichnen sie sich durch eine hohen Polymorphismus aus, so dass für jedes Gen multiple Allele existieren. Es wurden teilweise über 100 Allele pro Locus im Menschen und in der Maus gefunden, aber jedes Individuum hat nur bis zu 6 verschiedene Klasse I und 12 verschiedene Klasse II Allele. Dieser Polymorphismus trägt dazu bei, dass in einer großen Population höchstwahrscheinlich immer einige Individuen ein passendes MHC-Molekül tragen, um eine Immunantwort gegen neu aufgetretene Pathogene initiieren zu können. Außerdem wird es Pathogenen schwer gemacht, die versuchen, durch Mutation ihrer Strukturgene einer Präsentation über MHC-Moleküle zu entgehen.

Zusätzlich zu den Genen der MHC-Moleküle liegen in diesem Bereich auch Gene anderer immunologisch bedeutsamer Proteine wie TAP (Transporter Associated with Antigen Processing), MICA und MICB (MHC-class I chain genes A und B) sowie auch einiger Hitzeschockproteine.

Hauptaufgabe der MHC-Moleküle, die ursprünglich im Zusammenhang mit Transplantationsabstoßungen entdeckt wurden, ist die Antigen-Präsentation, d.h. das Vorzeigen von Antigenen in Form von Peptiden, die an MHC-Moleküle auf der Zelloberfläche gebunden sind. Um die Antigene jedoch präsentieren zu können, ist zunächst eine Antigen-Prozessierung notwendig. Proteine müssen in Peptide zerlegt werden, um an MHC-Moleküle binden zu können. Diese gebundenen Peptide werden dann T-Zellen präsentiert und T-Zell-Epitop genannt, wenn ein an ein MHC-Molekül gebundenes Peptid von T-Zellen erkannt wird. Diese Antigenprozessierung findet in allen Zellen, die MHC-Moleküle besitzen, statt, aber eine Immunantwort wird normalerweise nur durch APCs wie B-Zellen, Makrophagen und DCs ausgelöst.

Aufgrund von Struktur und Peptidbindungseigenschaften wird zwischen zwei großen Gruppen von MHC-Molekülen, den Molekülen der Klasse I und denen der Klasse II unterschieden. MHC Klasse I-Moleküle präsentieren v.a. intrazelluläre Antigene wie virale Proteine den CD8 T-Zellen, während MHC Klasse II-Moleküle hauptsächlich Antigene auf ihrer Oberfläche tragen, die aus dem Extrazellulärraum in die Endosomen aufgenommen wurden (z.B. bakterielle Proteine, Proteine von Pilzen) und CD4 T-Zellen gezeigt werden sollen.

Das MHC Klasse I-Molekül ist ein Heterodimer aus zwei Polypeptidketten. Die schwere Kette, ein membrangebundenes Glykoprotein, besteht aus den drei Domänen $\alpha 1$, $\alpha 2$ und $\alpha 3$. Die kleinere Kette, ein $\beta 2$ -Mikroglobulin, wird nichtkovalent angelagert. Die gefaltete Struktur der $\alpha 3$ -Domäne und des $\beta 2$ -Mikroglobulins ähnelt einer Immunglobulin C Domäne. Die Domänen $\alpha 1$ und $\alpha 2$ bilden zusammen den peptidbindenden Spalt an der Oberfläche des Moleküls, in dem eher kurze Peptide von 8-10 Aminosäuren fest binden. Diese Peptide besitzen konservierte Aminosäuren („Bindungsanker“) an Positionen, die wichtig sind für die Interaktion mit dem MHC-Molekül und je nach MHC-Allel variieren. Somit kann man für jedes MHC-Molekül ein allelspezifisches Bindungsmotiv finden (Falk et al., 1991; Rammensee, 1995). Die meisten MHC Klasse I Liganden haben Anker an Position 2 und dem Carboxylende des Peptids.

Da wie bereits schon erwähnt jeder Mensch von den teilweise über 100 gefundenen Allelen pro Locus nur bis zu 6 verschiedene Klasse I-Allele besitzt, präsentieren die Zellen eines Individuums damit bevorzugt eine Auswahl an Peptiden, die den Bindungsmotiven ihrer MHC-Moleküle entsprechen. Mutationen im zelleigenem Genom müssen dann nicht unbedingt zur Präsentation von als fremd erkannten Peptiden führen. Dies könnte ein Erklärungsansatz sein für die Assoziation bestimmter Autoimmunerkrankungen mit dem Haplotyp eines Individuums (z.B. Spondylitis ankylosans mit HLA-B27).

Von den ca. 20 MHC Klasse I Genen in der HLA-Region besitzen die Loci HLA-A, -B und -C beim Menschen die größte Bedeutung, während es bei der Maus die Loci H2-K, -D und -L sind.

MHC Klasse I-Moleküle werden auf allen kernhaltigen Zellen exprimiert und binden im klassischen Modell der Antigen-Präsentation bevorzugt Peptide endogener Proteine (Pamer and Cresswell, 1998).

Die MHC Klasse II-Moleküle stellen ein Heterodimer aus einem nichtkovalentem Komplex zweier Ketten (α und β) dar, die jeweils aus zwei Domänen bestehen und die Zellmembran durchdringen. Die Peptidbindungsfurche wird gebildet durch die membrandistalen Domänen $\alpha 1$ und $\beta 1$, der Spalt ist hier weiter geöffnet als bei den

MHC Klasse I-Molekülen und die Peptide sind 13 Aminosäuren lang oder auch länger. Auch diese Peptide besitzen sogenannte Bindungsanker.

Es gibt vier potentielle MHC Klasse II-Loci, nämlich HLA-DR, -DP, -DQ und -DM. Die MHC Klasse II-Moleküle sind lediglich auf APCs, aktivierten T-Zellen und Epithelzellen des Thymus zu finden, können aber auch bei einigen anderen Zellen durch IFN- γ induziert werden (Klein and Sato, 2000). Im klassischen Modell der Antigen-Präsentation binden sie v.a. Peptide exogener Proteine (Watts, 1997).

Die Beobachtung, dass Transplantate trotz MHC-Identität von Spender und Empfänger zu Abstoßungsreaktionen führen können, führte zum Postulat und Nachweis (Speiser et al., 1990; Wallny and Rammensee, 1990) sogenannter minor histocompatibility complexes (Minor-H Antigene). Diese zelleigenen polymorphen Proteine können sowohl als Peptide im Kontext mit MHC-Molekülen als auch direkt auf der Zelloberfläche durch zytotoxische T-Zellen erkannt werden. Zu den derzeit identifizierten Minor-H Antigenen zählen z.B. das β_2 -Mikroglobulin, welches direkt erkannt werden kann (Rammensee et al., 1986), wie auch das auf H-2 D^b Molekülen präsentierte Y-chromosomale H-Y Antigen.

1.3.2 Der klassische MHC Klasse I Antigenprozessierungsweg

Für eine Präsentation auf MHC Klasse I-Molekülen müssen die Proteine im Zytosol zu Peptiden abgebaut werden. Dies geschieht v.a. durch das Proteasom, einem multikatalytischen Enzymkomplex. Als Quelle dienen zum einen gealterte Proteine, aber auch zu ca. 30% neue, jedoch fehlerhaft synthetisierte Proteine als DRiPs (defective ribosomal products). Dadurch können T-Zellen schon sehr früh über eine mögliche Virusinfektion oder Entartung der Zelle informiert werden (Schubert et al., 2000; Reits et al., 2000; Schild and Rammensee, 2000b).

Das eukaryotische 20S Proteasom ist ein 770 kD Proteinkomplex, bestehend aus 14 α - und 14 β Einheiten, die 4 Ringe aus jeweils 7 Untereinheiten formen. Die äußeren α -Ringe sind proteolytisch inaktiv, während die inneren β -Ringe drei proteolytische Untereinheiten enthalten, β_1 , β_2 und β_5 (Delta, MECL-1, MB1), die alle Threonin-Proteasen darstellen. Durch Zugabe von IFN- γ kann man die Synthese von alternativen

proteolytischen Untereinheiten, $i\beta 1$, $i\beta 2$ und $i\beta 5$ induzieren, wodurch sich das Proteasom zum Immunoproteasom wandelt mit einer anderen proteolytischen Spezifität (Toes et al., 2001). Jedoch ist nicht vollkommen klar, ob dies einen Vorteil für die Generierung einer Immunantwort bedeutet.

Außerdem kann das 20S Proteasom an seinen außenstehenden α -Ring um ein oder zwei endständige 19S-Kappen (PA700-Regulator) zum 26S Proteasom erweitert werden. So kann es Proteine, die zum Abbau mit Ubiquitin markiert wurden, erkennen (Hershko and Ciechanover, 1998). Zusätzlich ändert sich die proteolytische Spezifität (Emmerich et al., 2000). Zudem kann durch IFN- γ an die Stelle der 19S-Kappe das regulatorische PA28 (11S-Regulator) treten, das aus sechs ringförmig angeordneten Untereinheiten besteht.

Laut massenspektrometrischen Studien generiert das Proteasom in vielen Fällen lediglich den korrekten C-Terminus des Epitops (Rock and Goldberg, 1999), der N-Terminus wird dann von anderen Proteasen prozessiert.

Einige Peptide können dem totalen Abbau entkommen und werden ins ER transportiert. Dieser Transport erfolgt spezifisch und ATP-abhängig durch den TAP-Transporter.

Ein Vergleich von freien und an Hitzeschockproteine (HSPs) gebundene Proteine im Zytosol zeigte, dass eine effektivere Präsentation auf MHC Klasse I-Molekülen im Falle der Assoziation mit HSPs erfolgt (Binder et al., 2001), was dafür sprechen könnte, dass im Zytosol lokalisierte Chaperone, zu denen u.a. die HSPs gehören, evtl. eine wichtige Rolle in der Antigen-Prozessierung besitzen (Relay Line Hypothese) (Srivastava et al., 1994).

Der TAP-Transporter ist ein Heterodimer aus zwei Untereinheiten, TAP-1 und TAP-2, die beide in der MHC-Genregion kodiert sind. Jede Untereinheit besteht aus zwei Domänen, einer hydrophoben Transmembrandomäne und einer ATP-bindenden Kassettdomäne. Die Bindung des Peptids an den TAP-Transporter erfolgt ATP-unabhängig, jedoch ist eine ATP-Hydrolyse erforderlich für den Transport des Peptids in das ER-Lumen. ER-Protein-Translokations-Experimente haben gezeigt, dass der TAP-Transporter im humanen System bevorzugt Peptide mit 8 oder mehr Aminosäuren mit basischen oder hydrophoben Aminosäure-Resten am Carboxylende bindet, worin sich die Kriterien der Peptide, die MHC Klasse I-Moleküle binden, widerspiegeln. In

der Maus werden v.a. Peptide mit einem hydrophoben C-Terminus gebunden (Powis et al., 1996).

Im ER können diese Peptide frei vorkommen oder auch an Chaperone wie z.B. an das HSP Gp96 binden, was Kreuzvernetzungsexperimente gezeigt haben (Lammert et al., 1997).

Wie bereits erwähnt, sind MHC-Moleküle ohne gebundenes Peptid instabil. Neusynthetisierte MHC Klasse I- α -Ketten werden daher an das Chaperone Calnexin gebunden und bleiben so in einem partiell gefaltetem Zustand. Wenn anschließend das β 2-Mikroglobulin bindet, dissoziiert das so entstandene Heterodimer vom Calnexin-Molekül ab und lagert sich an einen Protein-Komplex (Calreticulin und Tapasin) an, bis ein Peptid bindet. Nach Peptidbindung löst sich das MHC-Molekül vom Proteinkomplex wieder ab und wird als vollständig gefaltetes MHC Klasse I-Molekül über Golgi-Vesikel an die Zelloberfläche transportiert.

1.3.3 Der klassische MHC Klasse II Antigenprozessierungsweg

APCs nehmen exogene Antigene v.a. durch Phagozytose, rezeptor-vermittelter Endozytose und Makropinozytose auf, bevor sie über frühe und späte Endosomen in Lysosomen gelangen, in denen sie enzymatisch zu Peptiden abgebaut werden.

Daher ist für die MHC Klasse II-Moleküle, deren α - und β -Kette auch im ER synthetisiert werden, die aber Peptide aus intrazellulären, endosomalen Vesikeln präsentieren, eine Verhinderung der Peptidbeladung im ER notwendig. Hierfür ist die mit dem MHC Klasse II-Molekül assoziierte invariante Kette (Ii) verantwortlich. Mit Hilfe von Chaperonen wie z.B. Calnexin bilden sich Trimere aus drei MHC Klasse II- $\alpha\beta$ -Heterodimeren und drei Ii, wobei jeweils ein Ii ein $\alpha\beta$ -Heterodimer nichtkovalent bindet. Da ein Teil der Ii-Polypeptidkette in der Peptidbindungsfurche zum Liegen kommt, wird diese dadurch blockiert.

Ein weiterer Teil der Ii enthält eine Signalsequenz, die den aus 9 Ketten bestehenden Komplex zu den sauren Vesikeln der Endozytose führt. Dort werden die Ii durch Proteasen, wie Cathepsine S und L verdaut, nur ein kleiner Teil der Ii bleibt als CLIP-

Fragment (Class II associated invariant chain peptide) gebunden. Die Kompartimente, in denen die Ii gespalten wird, sind nicht klar definiert. Es existieren verschiedene Namen wie MIIC oder CIIV (Neefjes, 1999).

Im Menschen katalysiert HLA-DM, ein nicht klassisches MHC Klasse II-Molekül, anschließend die Freisetzung von CLIP und die Bindung eines Peptids aus diesem Kompartiment, das zuvor durch Phagozytose, Makropinozytose oder rezeptorvermittelte Endozytose wie z.B. über B-Zell Rezeptoren aufgenommen wurde. In der Maus ist hierfür H-2M verantwortlich. HLA-DM ist auch für die Selektion von stabil gebundenen Peptiden zuständig, dem Peptide Editing, d.h. das schwach gebundene Peptide durch andere Peptide ersetzt werden. Es besteht ein negativer Regulationsmechanismus durch ein anderes nicht klassisches MHC-Molekül, dem HLA-DO, das in Epithelialzellen des Thymus und in B-Zellen produziert wird. Im Gegensatz zum HLA-DM ist jedoch die Expression der HLA-DO β -Kette nicht durch IFN- γ induzierbar, so dass bei einer Entzündung die Hochregulation von HLA-DM überwiegt.

1.3.4 Kreuzpräsentation

Der klassische Weg der Antigenprozessierung bedeutet also, dass endogene Peptide über MHC Klasse I-Moleküle den CTLs präsentiert werden und exogene Peptide auf MHC Klasse II-Moleküle gelangen, um CD4-T-Zellen gezeigt werden zu können. Diese Trennung macht auch Sinn, da so virusinfizierte Zellen durch die CTLs eliminiert werden können, während gerade Zellen, die z.B. viralen Zellschutt durch Endozytose aufgenommen haben, von den CTLs verschont bleiben sollen. Jedoch ist wie bereits erwähnt für das Priming der T-Zellen zusätzlich eine Kostimulation durch APCs essentiell. Demnach müssten also alle Viren auch APCs infizieren, damit das System funktioniert. Es gibt aber Viren, bei denen das nicht so ist, wie z.B. das humane Papillomavirus (HPV), das ausschließlich epitheliale Zellen infiziert (McMurray et al., 2001). Trotzdem wurden aber natürliche HPV CTL Epitope identifiziert (Ressing et al., 1995), so dass es einen Transport geben muss von den identifizierten epithelialen Zellen

zu den APCs, die die Antigene aufnehmen, prozessieren und auf MHC Klasse I-Molekülen präsentieren können.

Diese Beobachtung entspricht den Versuchsergebnissen etlicher Studien, in denen immer wieder gezeigt wurde, dass es einen alternativen Weg der Antigen-Prozessierung geben muss, in dem exogene Antigene auch über MHC Klasse I-Moleküle den CTLs präsentiert werden können (Brossart and Bevan, 1997; Carbone and Bevan, 1990; Huang et al., 1996; Jondal et al., 1996; Kurts et al., 2001; Rock, 1996; Rock et al., 1990; Staerz et al., 1987; Watts, 1997).

Ursprünglich wurde der Begriff „Cross-Priming“ von Michael Bevan eingeführt, der zeigte, dass Minor-H-Antigene auf APCs eines anderen Empfängers mit verschiedenem MHC-Haplotyp transferiert werden und dort spezifisch CTLs primen konnten. Er nannte dies Cross-Priming, um den Unterschied deutlich zu machen zu einer direkten T-Zell-Aktivierung durch die Zellen, die ursprünglich die Minor-H-Antigene exprimierten (Bevan, 1976b; Bevan, 1976a). So umfasste Kreuzpräsentation ursprünglich zellassoziierte Klasse I und Klasse II restringierte Antigene, während das Wort heute auch nur für die der Klasse I verwendet wird.

Kreuzpräsentation meint also einen alternativen Aktivierungsweg zytotoxischer T-Zellen durch exogene Antigene, die vorher von APCs aufgenommen, prozessiert und repräsentiert wurden (Heath and Carbone, 1999). Dies stellt einen eigenen Prozessierungsweg dar, der es möglich macht, dass APCs zytotoxische T-Zellen primen können mit Antigenen, die aus einer anderen Zelle stammen. Damit können sie virusspezifische CTLs induzieren, ohne selbst infiziert zu sein. Für Viren, die ausschließlich nicht-hämatopoetische Zellen infizieren, scheint sogar Kreuzpräsentation durch APCs essentiell für die Auslösung einer CTL-Antwort zu sein (Sigal et al., 1999).

Über den eigentlichen Mechanismus dieses Weges ist relativ wenig bekannt. Erste Versuche zur Präsentation exogener löslicher Antigene auf MHC Klasse I-Molekülen führten jedoch bald zu den APCs mit Ursprung im Knochenmark (Huang et al., 1994) als wichtige Mediatoren von Kreuzpräsentation und Cross-Priming. Es wurden verschiedene in vitro Studien durchgeführt, die zeigten, dass DCs (Norbury et al., 1997), Makrophagen (Norbury et al., 1995) und B-Zellen (Ke and Kapp, 1996) fähig

sind, exogene Antigene auf MHC Klasse I-Molekülen zu präsentieren. In weiteren Versuchen wurde v.a. mit der Aufnahme von apoptotischen Zellen durch DCs (Albert et al., 1998b) und Makrophagen (Bellone et al., 1997) und der nachfolgenden Kreuzpräsentation der Antigene, die in diesen Zellen enthalten waren, experimentiert. Man glaubt heute mehrheitlich, dass nur DCs zelluläres Antigen kreuzpräsentieren können, auch wenn diese Auffassung nach wie vor umstritten ist.

Makrophagen und DCs können Antigene, die in apoptotischen Zellen enthalten sind, über den Scavenger Rezeptor CD36 und das Integrin $\alpha_v\beta_3$ aufnehmen. Für die Kreuzpräsentation ist jedoch z.B. das Integrin $\alpha_v\beta_5$ wichtig, das im Gegensatz zu den Makrophagen lediglich die DCs exprimieren. Da nur DCs in der Lage sind, eine CTL-Antwort auszulösen (Albert et al., 1998a), liegt ein Grund in der besonderen Fähigkeit der DCs zur Kreuzpräsentation wohl in der Expression bestimmter Oberflächenrezeptoren.

Außerdem haben auch Amigorena und Mitarbeiter Hinweise dafür geliefert, dass nur DCs im Gegensatz zu Makrophagen oder B-Zellen Antigen, das sie über Fc γ -Rezeptoren aufgenommen haben, kreuzpräsentieren können. Fc-Rezeptoren werden von den APCs exprimiert und spielen eine wichtige Rolle in der Komplement-Aktivierung. Amigorena konnte zeigen, dass die besondere Fähigkeit der DCs zur Kreuzpräsentation mit einem speziellen Antigen-Prozessierungsweg zusammenhängt, den es nur in DCs gibt. Antigen konnte nach Aufnahme durch die Fc γ -Rezeptoren in Endosomen und Lysosomen selektiv in das Cytosol transferiert und in den regulären MHC-I Prozessierungsweg eingeschleust werden (Rodriguez et al., 1999; Amigorena, 2002). So enthalten DCs zusätzlich spezielle Translokations-Systeme, um ihrer besonderen Aufgabe der Kreuzpräsentation gerecht zu werden.

DCs konnten so auch nach Inkubation mit bestrahlten und damit apoptotischen Zellen, die das Tumorantigen MAGE-3 exprimierten, *in vitro* Lymphozyten eines MAGE-3⁺ Melanompatienten spezifisch aktivieren (Russo et al., 2000).

Eine Zugabe von CD40-L oder CD40-L und IFN- γ konnte die Effektivität des Cross-Primings Tumor-assoziiertes Antigene *in vitro* sogar noch verstärken, indem die Expression von MHC Klasse I und MHC Klasse II sowie die kostimulatorischen Moleküle der DCs hochreguliert wurden (Hoffmann et al., 2001).

Es existieren unterschiedliche Subpopulationen von DCs. In der Mausmilz wurden drei verschiedene DC-Populationen entdeckt, zwei, die CD8 negativ waren und v.a. in Randgebieten der Milz gefunden wurden, und eine CD8 positive v.a. in den T-Zell-Ge-bieten der Milz. Die Menge an MHC-Molekülen und kostimulatorischen Molekülen an der Oberfläche ist gleich, jedoch unterscheiden sie sich in den sezernierten Zytokinen, in ihrem Einfluß auf die Zytokinproduktion der von ihnen aktivierten T-Zellen und in ihrer Fähigkeit zum Cross-Priming. Es bestehen Hinweise, dass nur CD8⁺ DCs durch Cross-Primings eine CTL-Antwort auslösen können (den Haan et al., 2000), während die CD8⁻ DCs effektiver bei der Aktivierung von CD4 T-Zellen im Rahmen der klassischen Antigenprozessierung sein sollen (Pooley et al., 2001).

Kreuzpräsentation kann sowohl zur T-Zell-Aktivierung („cross-priming“) als auch zur T-Zell-Toleranz („cross-tolerance“) führen (Kurts et al., 1997; Kurts et al., 1998a).

DCs und Makrophagen besitzen einen Rezeptor für Phosphatidylserin (PSR), der bei Apoptose von der Innenseite der Zellmembran nach außen gelangt (Fadok et al., 2000). So ist eine Unterscheidung zwischen Zelltod durch Apoptose, der im Rahmen des normalen Zelluntergangs geschieht, und dem durch Nekrose im Rahmen einer Entzündung oder Tumornekrose möglich. Dies ist wichtig, da Hinweise bestehen, dass die Aufnahme nekrotischer Zellen in die DCs die Hochregulation kostimulatorischer Moleküle induziert, die wichtig für die T-Zell-Aktivierung ist, während dies bei Antigenaufnahme von apoptotischen Zellen nicht der Fall ist (Sauter et al., 2000; Steinman et al., 2000). Apoptotische Zellen führten nur zur Produktion von anti-inflammatorischen Zytokinen wie z.B. IL-10, TGF- β (Fadok et al., 2000) und zur Inaktivierung bzw. Toleranzentwicklung von T-Zellen.

Diesbezüglich wurden aber unterschiedliche Beobachtungen gemacht. Andere Versuche haben gezeigt, dass sowohl apoptotische wie auch nekrotische Zellen (Kotera et al., 2001) oder nur apoptotische Zellen (Albert et al., 1998a) DCs aktivieren können. In diesem Rahmen könnte auch die gleichzeitige Anwesenheit von nekrotischen Zellen, Zytokinen oder CD4 T-Zellen (Albert et al., 2001) eine Rolle spielen.

Auch molekulare Chaperone und HSPs (siehe dazu Kapitel 1.5), die z.B. durch nekrotisierende Zellen freigesetzt werden (Basu et al., 2000), können über rezeptorvermittelte Endozytose aufgenommen werden und eine zytotoxische T-Zell-

Antwort induzieren (Arnold et al., 1997; Singh-Jasuja et al., 2000b). Diesem Thema ist ein eigenes Kapitel gewidmet (siehe dazu 1.5.2).

Zudem kann Kreuzpräsentation auch im Rahmen der Notwendigkeit der Toleranz gegenüber Selbst-Antigenen eine Rolle spielen. Zusätzlich zur Selektion der T-Zellen im Thymus wurde eine CD95-vermittelte Apoptose autoreaktiver Zellen in der Peripherie durch Cross-Präsentation beobachtet (Kurts et al., 1998b).

1.4 Die Dendritischen Zellen

Die dendritischen Zellen wurden 1974 von Ralph Steinman in lymphoiden Organen entdeckt und verdanken ihren Namen v.a. den vielen Dendriten, die sie ausbilden (Steinman et al., 1974). Jedoch vergingen noch mehr als 20 Jahre, bis ihre Bedeutung für das adaptive Immunsystem als potenteste antigenpräsentierende Zellen erkannt wurde.

DCs nehmen eine Sonderstellung als Mittler zwischen erworbener und adaptiver Immunität ein. Sie besitzen PRRs, mit denen sie Tumorzellen, virusinfizierte Zellen, bakterielle DNA und andere PAMPs erkennen können. Folge ist eine Produktion von IFN- α , TNF und IL-1 mit Aktivierung von NK-Zellen und Makrophagen.

Unreife DCs befinden sich normalerweise in nichtlymphatischem Gewebe wie z.B. die Langerhans-Zellen in der Haut und sind spezialisiert auf Endozytose und Antigen-Processing. Die Antigen-Aufnahme erfolgt über Mikro- und Makropinozytose und v.a. auch über rezeptorvermittelte Endozytose. Die für die T-Zell-Aktivierung so wichtigen kostimulatorischen Moleküle exprimieren sie in diesem Stadium kaum. Erst eine Aktivierung durch Stimuli wie Pathogene, LPS, bakterielle DNA und Gewebsschädigung führt zur chemokinvermittelten Migration ins lymphatische Gewebe, zu morphologischen Veränderungen und zum Verlust ihrer endozytischen Fähigkeit, indem sie z.B. ihre Endozytose-Rezeptoren (F_c- und F_ε-Rezeptoren, DEC-205, Mannose-Rezeptor) herunterregulieren. Sie spezialisieren sich nun auf die Antigen-Präsentation über MHC Klasse I- und MHC Klasse II-Moleküle sowie auf das Priming von T-Zellen. Dies erfolgt durch eine Hochregulation von MHC Klasse II-Molekülen, kostimulatorischen

Molekülen wie CD80 und CD86 und T-Zell-Adhäsions-Molekülen wie CD48 und CD58 sowie durch Sekretion von inflammatorischen Zytokinen wie z.B. Interleukin-12 (IL-12) und TNF α , anti-inflammatorischen Zytokinen und Chemokinen.

Reife DCs sind hochspezialisierte T-Zell-Aktivatoren. Während im klassischen Modellversuch der Transplantationsabstoßung für die gemischte Leukozytenreaktion (mixed leukocyte reaction, MLR) normalerweise gleiche Mengen Donor- und Akzeptorleukozyten gemischt werden müssen, reicht eine DC aus, um 100-3000 T-Zellen zu aktivieren (Banchereau and Steinman, 1998).

Diese außergewöhnliche starke T-Zell-Aktivierung durch DCs beruht unter anderem auf einer DC-spezifischen Kommunikation mit T-Zellen. Als Ligand des Adhäsionsmoleküls ICAM-3, das ruhende T-Lymphozyten exprimieren, wurde ein Typ II Membranprotein identifiziert, das eine Mannose-bindende Lectindomäne enthält (Geijtenbeek et al., 2000b). Dieses als DC-SIGN (*DC-specific, ICAM-3 grabbing, non-integrin*) bezeichnete Molekül exprimieren auch unreife DCs. Man nimmt daher an, dass darüber der anfängliche, eher lockere Kontakt zwischen T-Zelle und DC erfolgt. Durch anschließende Expression kostimulatorischer Moleküle zusammen mit MHC Klasse I und MHC Klasse II kann sich ein geschützter Bereich der Kommunikation formen, eine „immunologische Synapse“ (Steinman, 2000). Ein Nachteil von DC-SIGN besteht jedoch darin, dass es ursprünglich entdeckt wurde durch seine Fähigkeit, die glykanreiche Hülle von HIV-1 zu binden. HIV-1 kann auf diese Weise an T-Helferzellen weitervermittelt werden, ohne DCs selbst zu infizieren (Geijtenbeek et al., 2000a).

1.5 Das Hitzeschockprotein Gp96

Die Gruppe der Hitzeschockproteine ist nach ihrem molekularen Gewicht unterteilt in 6 Subfamilien: small HSP, HSP40, HSP60, HSP70, HSP90 und HSP100. Immunologische Relevanz besitzen dabei bis jetzt v.a. die HSP60-, die HSP70- und die HSP90-Familie. Im weiteren soll jedoch hauptsächlich auf die HSP90-Familie eingegangen werden und innerhalb dieser Familie v.a. auf das Glykoprotein 96 (Gp96),

das im Gegensatz zum Zytosolprotein Hsp90 im ER lokalisiert ist, da es das bislang am besten untersuchte immunologisch relevante HSP ist.

Beim Hitzeschockprotein Gp96, auch bekannt als Glukose-regulierendes Protein (Grp94), handelt es sich um ein Glykoprotein von 94 kDA. Es gehört zur HSP90-Familie und besitzt bzgl. den Gensequenzen auch eine hohe Übereinstimmung mit dem zytosolischen Hsp90. Phylogenetische Analysen deuten darauf hin, dass Gp96 eventuell durch Genduplikation von Hsp90 entstanden ist (Gupta, 1995).

Wie alle Mitglieder der HSP90-Familie wird auch Gp96 in sämtlichen Metazoen exprimiert und ist hochkonserviert. HSPs werden in der Zelle konstitutiv exprimiert, wobei die Expression durch Zellstress wie z.B. bei Hitze, Glukose-Mangel oder Virusinfektionen induziert werden kann.

Gp96 ist ein ER-Protein und besitzt als solches auch eine aminoternale Signalsequenz, welche das Protein in das Lumen des ER dirigiert. Außerdem enthält es eine C-terminale ER-Retentionssequenz (KDEL-Motiv), auch wenn an der Zelloberfläche von Tumor- und nichttransformierten Zellen kleinere Anteile von Gp96 gefunden wurden (Altmeyer et al., 1996; Robert et al., 1999). Der Grund hierfür und die funktionellen Konsequenzen sind jedoch unbekannt.

Obwohl man mehrere Glykosylierungssequenzen finden kann, enthält Gp96 lediglich am Asparagin-196 einen Endo H-sensitiven Glykosylrest. Bei Glucose-Mangel entstehen auch nicht glykosylierte Formen von Gp96.

Hauptaufgabe der HSPs ist die Unterstützung der korrekten Protein-Faltung. Sie binden dazu an vollständig oder teilweise denaturierte Proteine und verhindern die Aggregation durch Unterstützung der Renaturierung oder Initiation des proteolytischen Abbaus bei irreparabler Schädigung.

Immunologisch bedeutsam ist im Falle des Gp96 jedoch besonders die Bindung von Peptiden im ER. Gp96 gilt dabei (neben PDI und Calreticulin) als Peptidakzeptator TAP-translozierter Peptide, kann darüber hinaus aber auch andere Peptide binden (Lammert et al., 1997; Arnold et al., 1997). Eine direkte, essentielle Beteiligung von Gp96 an der Beladung von MHC Klasse I-Molekülen erscheint jedoch unwahrscheinlich, da in Zellen, in denen das Gp96-Expressionslevel künstlich niedrig

gehalten wurde, keine Veränderung in der Antigenpräsentation festgestellt werden konnte (Lammert et al., 1996).

Da bis jetzt keine Röntgen-Kristallstruktur von Gp96 besteht, konnten bisher auf Struktur und Funktion nur ausgehend von der bekannten Struktur der bei der HSP90-Familie hoch konservierten N-terminalen Domäne des Hsp90 Homologs Hsp82 der Hefe Rückschlüsse gezogen werden (Prodromou et al., 1997). Demnach ist Gp96 in der Lage zu dimerisieren, was eine Peptidbindungsfurche zur Folge hätte, in der Peptide von ca. 9 AS aufgenommen werden können. Diese Annahme erfährt Unterstützung durch die Beobachtung, dass Hsp90 und auch kleinere Mengen von Gp96 in der Zelle als Dimere vorliegen (Qu et al., 1994). Jedoch konnte Linderoth und Mitarbeiter zeigen, dass die Peptidbindungsstelle von Gp96 im C-Terminus liegt, in dessen Nähe auch die Dimerisierungsstelle angrenzt (Linderoth et al., 2000).

Es konnte auch eine Art Peptidbindungsmotiv für Gp96 durch Kreuzvernetzungsversuche ermittelt werden. Danach bindet Gp96 bevorzugt Peptide mit einer Länge von 8-20 Aminosäuren und 9er Peptide mit ungeladenen Resten an den Positionen 2 und 9 (Spee and Neefjes, 1997).

Zudem fungiert Gp96 unter Umständen auch als schwache Aminopeptidase (Menoret et al., 2001), indem es am N-Terminus erweiterte Peptidvorläufer so schneiden kann, dass sie von MHC Klasse I-Molekülen gebunden werden können.

Auf den immunogenen Charakter der HSPs stieß man v.a. durch die Beobachtung, dass Vakzinierungen von Mäusen mit HSPs, die zuvor aus Tumorzellen isoliert wurden, zu einem Schutz der Mäuse vor den Tumorzellen führten, aus denen die HSPs stammten. Dieser Schutz konnte jedoch nicht hervorgerufen werden mit Gp96, das aus anderem Tumorgewebe isoliert wurde. (Tamura et al., 1997; Udono et al., 1994). Es konnte durch Gp96 eine spezifische CTL-vermittelte Immunantwort ausgelöst werden (Arnold et al., 1995). Eine derartige Vakzinierung bei Tumoren, die chemisch und physikalisch induziert sein konnten, führte zu Tumormunität, verlangsamtem Tumorstadium bestehender Tumoren, Rückgang von Metastasen sowie zu einer verlängerten Überlebenszeit (Tamura et al., 1997).

Es stellt sich nun die Frage, warum gerade extrazelluläre HSPs, im speziellen Gp96, immunogen wirken können, während es auch andere peptid-bindende Proteine gibt, die

wie z.B. das ER-Protein Proteindisulfidomerase (PDI) Peptide mit einer viel größeren Affinität binden können, mit dem aber eine Immunisierung bislang nicht gezeigt werden konnte.

Das spezifische Phänomen der Immunogenität wird zur Zeit auf vier Eigenschaften der HSPs zurückgeführt, nämlich auf die Fähigkeit, Peptide zu binden, die Möglichkeit der rezeptorvermittelten Endozytose durch APCs, ferner auf deren Stimulation zur Zytokinproduktion sowie auf die Reifung der DCs durch Gp96 (Singh-Jasuja et al., 2001; Basu and Srivastava, 2000). Es wurde außerdem gezeigt, dass Thrombozyten Gp96 binden können mit der Folge einer Neutralisation dessen Fähigkeit zur DC-Reifung (Hilf et al., 2002). Kürzlich wurde zusätzlich auch eine Aktivierung von polymorphonuklearen Neutrophilen und Monozyten mit daraus resultierender verstärkter phagozytischen Aktivität beobachtet (Radsak et al., 2003).

1.5.1 Die Peptidbindung

Da die Immunogenität von Hitzeschockproteinen weder auf unterschiedliche HSP-Varianten zurückgeführt werden konnte, da ihnen eine monomorphe Kodierung zugrunde liegt, noch tumor- oder virusspezifische Mutationen in Hsp90 oder Gp96 cDNAs gefunden wurden (Srivastava and Maki, 1991), stieß man letztendlich auf die an HSPs gebundenen Peptide als Ursache. Sie konnten in mehreren unabhängigen Experimenten als Mediatoren der spezifischen Immunität identifiziert werden.

Gp96-Präparationen aus mit dem β -Galactosidase-Gen (β -gal) transfizierten Zellen induzierten eine spezifische gegen ein L^d-restringiertes β -gal-Epitop gerichtete CTL-Antwort im Gegensatz zu Gp96 aus identischen, aber nicht transfizierten Zellen (Arnold et al., 1995). Der MHC-Haplotyp der HSP-Donorzelle spielt dabei keine Rolle, da die HSPs im Unterschied zu den MHC-Molekülen nicht polymorph sind. Jedes HSP-Gen besitzt nur ein Allel. So konnten im Rahmen des klassischen Cross-Priming-Experiments HSP-Peptid-Komplexe auch eine CTL-Antwort gegen Minor-H-Antigene bei einer Maus eines anderen Haplotyps auslösen (Bevan, 1976b; Arnold et al., 1995).

Auch eine in vitro-Beladung von Hsp70 und Gp96 mit Peptiden konnte eine spezifische CTL-Antwort induzieren (Blachere et al., 1997). Wenn bestimmte HSP-assoziierte

Peptide entfernt wurden, konnte durch die HSPs keine Immunantwort mehr ausgelöst werden (Udono and Srivastava, 1993). Gleichzeitig konnte der Nachweis erbracht werden, dass weder HSPs allein noch die einzelnen Peptide fähig waren, eine Immunreaktion auszulösen. Auch führten Peptidkomplexe mit anderen nicht zur HSP-Familie gehörenden Proteine wie z.B. mit dem peptidbindenden Serumprotein Albumin nicht zu einer Immunogenität.

Ebenfalls konnten bei Gp96-Präparationen aus virusinfizierten Zellen ähnliche Beobachtungen gemacht werden. So konnte Gp96 aus VSV (vesicular stomatitis virus)-infizierten EL-4-Zellen eine VSV8 (RGYVYQGL)-spezifische CTL-Antwort induzieren (Nieland et al., 1996). Dabei war Gp96 aus virusinfizierten Zellen mit bekannten viralen Peptiden assoziiert, während diese bei einer Herkunft aus nicht infizierten Zellen nicht gefunden werden konnten.

Zu ähnlichen Ergebnissen kam man mit HSPs im Rahmen von SV40-transformierten Zellen (Blachere et al., 1993), im Influenza-System (Heikema et al., 1997) oder mit LCMV-Epitopen (Ciupitu et al., 1998).

1.5.2 Rezeptorvermittelte Endozytose

Da nur geringe Mengen an HSP-Peptid-Komplexen ausreichend für eine effiziente T-Zell Antwort sind, wurden schon bald spezifische Rezeptoren für HSPs auf der Oberfläche von APCs postuliert (Srivastava et al., 1994). Folgendes Modell wurde vorgeschlagen: Eine Lyse von Virus-infizierten Zellen oder Tumorzellen führt zur Freisetzung von HSPs mit anschließender Aufnahme der HSP-Peptid-Komplexe durch APCs. Dadurch kann das an HSPs assoziierte Peptid in den endogenen MHC Klasse I-Weg eingeschleust werden und folglich über MHC Klasse I-Moleküle an der Oberfläche den CD8-Zellen präsentiert werden.

In elektronenmikroskopischen Bindungsstudien mit Gold-markiertem Hsp70 und Gp96 wurde dann auch eine spezifische Bindung der HSPs an Clathrin-reiche Oberflächenregionen (Clathrin coated pits) von Makrophagen und Monozyten beobachtet (Arnold-Schild et al., 1999).

Im Durchflußzytometrie-Versuch mit Fluoresceinisothiocyanat- (FITC-) markiertem Gp96 konnte genanntes Ergebnis bestätigt und zugleich eine Sättigung der Rezeptor-Bindung sowie eine Kompetition durch nicht markiertes Gp96 nachgewiesen werden. Es wurde eine spezifische Gp96-Bindung auf APCs wie Makrophagen, B-Zellen und DCs gezeigt, T-Zellen dagegen konnten kein Gp96 binden. Nur eine rezeptorvermittelte Endozytose von Gp96 durch die APCs führte zu Kolo-kalisation mit MHC Klasse I- und MHC Klasse II-Molekülen in endosomalen Kompartimenten und zur Kreuzpräsentation der assoziierten Peptide (Singh-Jasuja et al., 2000b). Durch chemisches Cross-Linking von Gp96 mit Plasmamembranfraktionen von Makrophagen und anschließender Sequenzierung der gebundenen Proteine konnte CD91, bislang nur bekannt als Rezeptor für α 2-Makroglobulin und low density lipoprotein (LDL), als erster Gp96-Rezeptor identifiziert werden (Binder et al., 2000b). Jedoch wurde kürzlich auch eine CD91-unabhängige Kreuzpräsentation von Gp96- assoziierten Peptiden bei Makrophagen beobachtet (Berwin et al., 2002).

Insgesamt gilt, dass eine rezeptorvermittelte Endozytose für eine Kreuzpräsentation der an HSP assoziierten Peptide essentiell ist, eine unspezifische Endozytose oder Makropinozytose führten nicht dazu.

1.5.3 HSP-vermittelte Zytokinproduktion und DC-Reifung

Wie schon mehrmals erwähnt ist für eine Induktion spezifischer T-Zell-Antworten nicht nur die Erkennung des MHC-Peptid-Komplexes durch den TCR notwendig, sondern auch die Expression kostimulatorischer Moleküle.

In diesem Rahmen wurde Gp96 nicht nur als Peptidübermittler speziell für die MHC Klasse I-Moleküle, sondern auch als ein Aktivator von DCs des Menschen und der Maus identifiziert, indem es eine Hochregulation von kostimulatorischen Molekülen sowie eine nachfolgende Verstärkung der Stimulation von T-Zellen *in vitro* induzieren kann (Singh-Jasuja et al., 2000a). Die Injektion von 1 μ g Gp96 in Mäuse führte so zu massiver Infiltration reifer DCs in die regionären Lymphknoten des Injektionsareals (Binder et al., 2000a). Auch wenn genetisch eine Expression von Gp96 auf der

Zelloberfläche von Tumorzellen induziert wurde, konnten DCs aktiviert werden mit einem nachfolgend verstärkten Priming von tumorspezifischen T-Zellen (Zheng et al., 2001).

Außerdem werden die DCs zur Produktion von pro-inflammatorischen Zytokinen wie IL-12 und TNF- α angeregt, wodurch eine inflammatorische Antwort des angeborenen Immunsystems hervorgerufen wird (Singh-Jasuja et al., 2000a). Durch Hitze denaturiertes Gp96 war dagegen dazu nicht in der Lage, während eine Hitze-Behandlung von LPS zu keiner Einschränkung der aktivierenden Effekte von LPS führte. Damit sollten LPS-Verunreinigungen in den HSP-Präparationen als Ursache für den aktivierenden Effekt ausgeschlossen werden.

Damit sind die HSPs neben ihrer Rolle in der adaptiven Immunität auch wichtige Mediatoren des angeborenen Immunsystems. DCs können so zu Koordinatoren dieser beiden Immunantworten werden.

Die molekulare Basis dieses Prozesses beruht v.a. auf der Aktivierung von DCs durch Gp96 über Toll-like-Rezeptoren TLR4 und zu einem geringeren Teil TLR2. Sie wurden hinsichtlich der Hochregulation des kostimulatorischen Moleküls CD86 und der Sekretion von IL-12 und TNF α durch Gp96 identifiziert (Vabulas et al., 2002b; Vabulas et al., 2002c). Jedoch wurde beobachtet, dass die Gp96-vermittelte DC-Aktivierung streng abhängig von Endozytose ist. So könnte das CD91-Molekül, das wie oben beschrieben gebundenes Gp96 endozytiert und den Transport zu den endozytotischen Vesikeln vermittelt (Arnold-Schild et al., 1999) auch hier eine große Rolle spielen. Es könnte einen so hohen Anstieg der lokalen Konzentration von Gp96 bewirken, dass dadurch erst der Signalweg über TLR2 und TLR4, die ebenfalls in den Vesikeln vorhanden sind (Wagner, 2001), möglich wird. Damit können die TLRs nicht mehr ausschließlich mit den PAMPs assoziiert werden, da Gp96 in Bakterien oder Pilzen nicht exprimiert wird und so einen nicht pathogenen Ligand der TLRs darstellt.

Die Tatsache, dass normalerweise intrazelluläres Gp96 von nekrotischen, aber nicht von apoptotischen Zellen freigesetzt wird, verleiht der Gp96-Wirkung auch eine physiologische Bedeutung (Basu et al., 2000; Berwin et al., 2001).

Durch die Möglichkeit von Gp96, intrazelluläre Peptide zu binden, diese Peptide auf MHC Klasse I-Moleküle von DCs und anderen APCs über CD91 und rezeptorvermittelte Endozytose zu transferieren und DCs zu aktivieren mit einer daraus folgenden Hochregulation von kostimulatorischen Oberflächen-Molekülen sowie einer Sekretion von pro-inflammatorischen Zytokine wie IL-12 und TNF α , wird Gp96 zu einem potentiellen nekrotischen Messenger, der das Immunsystem in einen Alarmzustand versetzen kann (Schild and Rammensee, 2000a).

1.6 Zielsetzung

Ausgangspunkt dieser Arbeit waren die Beobachtungen, dass Gp96 eine Aktivierung von DCs vermitteln kann, indem sowohl kostimulatorische Moleküle wie MHC Klasse II-Moleküle, CD86 und CD83 hochreguliert als auch proinflammatorische Zytokine wie IL-12 und TNF α sezerniert werden. Daraus resultierend war eine verstärkte CTL-Antwort in einem *in vitro* Proliferationsassay mit allogenen T-Zellen beobachtet worden (Singh-Jasuja et al., 2000a).

Die vorliegende Arbeit sollte daher untersuchen, ob auch eine peptidspezifische CTL-Antwort durch Gp96-gereifte DCs induziert werden kann. Hierbei sollten *in vitro* wie auch *in vivo* Modelle Berücksichtigung finden und ein Vergleich mit anderen DC-Aktivatoren, hier v.a. mit LPS, stattfinden. Der Grund dafür liegt in der Tatsache, dass LPS präsent ist im Verlauf von Infektionen mit gramnegativen Bakterien, die bevorzugt antikörperdominierte Immunantworten auslösen. Gp96 dagegen wird v.a. von nekrotischen Zellen freigesetzt, z.B. nach viralen Infektionen. Die anschließende Elimination von vielen Viren erfolgt im Gegensatz zu den gramnegativen Bakterien v.a. über CTLs.

Daraus folgend sollte auch ein besonderes Augenmerk auf die Gegenüberstellung der Wirkung der mit Gp96 oder LPS aktivierten DCs auf CTLs im Vergleich zu CD4-Helferzellen gerichtet werden.

2. Material und Methoden, Ergebnisse

Es wird Bezug genommen auf folgendes Manuskript:

Sabina Haager^{*‡}, Harpreet Singh-Jasuja^{*‡}, Tobias Warger^{*}, Matthias Hofmann^{*},
Sibylla Braedel-Ruoff^{*}, Norbert Hilf^{*}, Katrin Wiemann^{*}, Hans-Georg Rammensee^{*},
Hansjörg Schild^{*}

Glycoprotein 96-activated dendritic cells induce a CD8-biased T-cell response

^{*} Institute for Cell Biology, Dept. of Immunology, University of Tübingen, Auf der
Morgenstelle 15, D-72076 Tübingen, Germany

[‡] contributed equally

(zur Publikation eingereicht)

Heat shock proteins (HSPs) are able to induce protective immune responses against pathogens and tumors after injection into immunocompetent hosts. Crucial for the establishment of immunoprotection is the activation of components of the adaptive immune system, including cytotoxic T lymphocytes (CTLs) specific for pathogen- or tumor-derived peptides. HSPs acquire these peptides during intracellular protein degradation and when released during necrotic cell death, facilitate their uptake and MHC-restricted representation by professional antigen-presenting cells (APCs). In addition, the interaction of HSPs with APCs, including the ER-resident chaperone Gp96, induces the maturation of these cells by Toll-like receptor (TLR)-mediated signalling events. We now provide evidence that in contrast to LPS-mediated DC maturation, the interaction of Gp96 with dendritic cells (DCs) leads to the preferential expansion of antigen-specific CD8-positive T cells *in vitro* and *in vivo*. This CD8 preference induced by mouse and human DCs did not correlate with enhanced levels of IL-12 secretion. However, for human DCs we observed the induction of MHC class I-related chain A and B (MICA/B) expression exclusively by Gp96- but not by LPS-mediated DC maturation. Thus, despite the fact that both, LPS and Gp96 activate DCs in a TLR4-dependent manner, our experiments clearly demonstrate qualitative differences in the outcome of this maturation process which preferentially favours the expansion of CD8-positive T cells.

2.1 Introduction

Antigenic peptides chaperoned by heat shock proteins have been described as potent tumor vaccines in animal models and are currently studied in clinical trials. Recently, a considerable number of new functions have been uncovered for particularly one heat shock protein, the ER-resident Glycoprotein 96 (Gp96, also known as Glucose-regulated protein 94, Grp94). Gp96 is not only a peptide carrier but also targets surface receptors on antigen-presenting cells, e.g. CD91 for efficient delivery of its peptide cargo into the MHC class I antigen processing pathway. This results in receptor-dependent cross-presentation of the previously Gp96-complexed peptides on MHC class I molecules and activation of cytotoxic T lymphocytes (Arnold-Schild et al., 1999; Wassenberg et al., 1999; Singh-Jasuja et al., 2000b; Binder et al., 2000b). Furthermore, Gp96 simultaneously activates antigen-presenting cells like dendritic cells *in vitro* (Singh-Jasuja et al., 2000a; Basu et al., 2000c) and *in vivo* (Binder et al., 2000a) resulting in increased co-stimulatory activity and release of inflammatory cytokines and nitric oxide (Panjwani et al., 2002). Recently, we have demonstrated that maturation of dendritic cells by Gp96 requires the presence of Toll-like receptor 2 and 4 (Vabulas et al., 2002b). It has been speculated that heat shock proteins like Gp96 function as local danger signals in response to cellular stress. This has been underlined by several observations: Gp96 is released during necrotic cell death and viral lysis but not after apoptosis (Basu et al., 2000a; Berwin et al., 2001). Necrotic lysates from primary tumor tissue able to mature dendritic cells have been shown to be enriched of HSPs and the amount of HSPs in the lysates was critical for the ability of DC maturation (Somersan et al., 2001). At the same time, platelets efficiently bind Gp96, neutralizing its ability to activate DCs, a proposed regulatory mechanism confining the effective area of activating HSPs to the local tissue (Hilf et al., 2002). The APC-activating function of Gp96 is presumably an intrinsic capability independent of the associated peptides (Baker-LePain et al., 2002).

Previously, we have shown that dendritic cells activated by Gp96 exhibit an enhanced T-cell stimulatory capacity demonstrated by *in vitro* proliferation assays with allogeneic T cells (Singh-Jasuja et al., 2000a). Investigating this phenomenon in more detail, we now find that human monocyte-derived and mouse bone-marrow-derived dendritic cells

matured by Gp96 rather activate CD8⁺ cytotoxic T cells than CD4⁺ helper T cells *in vitro* as well as *in vivo*. On the other hand, DC maturation by LPS shows a preference for the expansion of CD4⁺ T cells. In the case of human DCs the preferred induction of CD8⁺ T cells by Gp96-stimulated DCs correlates with the induction of expression of MHC class I-related chain A and B (MICA/B). These molecules co-stimulate CD8⁺ T cells via interaction with NKG2D molecules (Bauer et al., 1999; Steinle et al., 2001; Groh et al., 2001). We conclude that the interaction of Gp96 with DCs induces maturation signals that qualitatively differ from those mediated by LPS resulting in the induction of immune responses dominated by CD8 T-cells.

So far, this preference for CD8 T-cell activation by dendritic cells has been observed only for the heat shock protein Gp96 as DC-maturing signal and not for any other molecule with adjuvant activity.

2.2 Materials and methods

2.2.1 Mice

C57BL/6 (H2^b, CD90.2⁺) and congenic C57BL/6J-Igh^aThy1^aGpi1^a (H2^b, CD90.1⁺) mice were obtained from Jackson Laboratories. OT-I (Hogquist et al., 1994) and OT-II (Barnden et al., 1998) mice which have a transgenic T-cell receptor for the H2-K^b-restricted SIINFEKL peptide derived from Ovalbumin₂₅₇₋₂₆₄ or for the H2-A^b-restricted ISQAVHAAHAEINEAGR peptide derived from Ovalbumin₃₂₃₋₃₃₉, respectively, and St42 mice (transgenic T-cell receptor for H2-D^b-restricted Ad5-E1A₂₃₄₋₂₄₃ peptide) were obtained from the animal facility of the Leiden University Medical Center (The Netherlands) (den Boer et al., 2001).

2.2.2 Generation of DCs

Mouse immature DCs were generated from bone marrow of C57BL/6 mice according to standard protocols (Inaba et al., 1992) in Iscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM; BioWhittaker, Verviers, Belgium) supplemented with 200mM L-glutamine (GibcoBRL Life Technologies, Paisley, GB), 100 IU/ml penicillin/streptomycin (Gibco), 10% FCS (PAA, Linz, Austria) and cytokines as indicated below. Briefly, bone marrow cells were incubated with 150 U/ml granulocyte-macrophage colony stimulation factor (GM-CSF, PeproTech, London, GB) for 7 days with medium renewed every 2 days. Approximately 90-100% of all cells in the FACS gate used for monocytes were DCs determined by flow cytometry with antibodies (obtained from Pharmingen, San Diego, CA) to be CD11c⁺, CD14⁻, CD86^{low} and H2-A^{b+}. Human immature DCs were prepared from peripheral mononuclear blood cells (PBMC) according to (Bender et al., 1996) in X-Vivo 15 medium (Walkersville, USA) supplemented with 200mM L-glutamine, 100 IU/ml penicillin/streptomycin, 1% human serum (Peel-Freez, Brown Deer, WI, USA) and cytokines as indicated below. Briefly, monocytes isolated by Ficoll density gradient (Lymphoprep, Nycomed, Oslo, Norway) and plastic adherence were cultured in medium supplemented with 10µg/ml interleukin-4 (IL-4, R&D Systems, Minneapolis, USA) and 50µg/ml GM-CSF (Leukomax,

Novartis Pharma GmbH, Nürnberg, Germany) for 6-8 days. The cells generated in this way showed a large number of dendrites up to day 12 and were only slightly adherent. They expressed CD1a, low CD14, low CD86, HLA-DR and very low CD83 on their surface as determined by different antibodies (from BD PharMingen) in flow cytometry (data not shown). All FACS analyses were performed on a FACSCalibur® (Becton Dickinson, Mountain View, CA) using Cell Quest Software.

2.2.3 Stimulation of DCs

Mouse BMDCs were stimulated by addition of Gp96 or heat-treated Gp96 (95°C for 20 min) or LPS (from *Salmonella typhimurium*, Sigma Chemicals, St. Louis, MO) for 6h to 3 days. Gp96 (kindly provided by Immatics Biotechnologies, Tübingen, Germany) was purified from the IGELa2 mouse cell line (tested mycoplasma-free). Endotoxin content in commercial Gp96 preparations was tested using a *Limulus* Amebocyte Lysate Kit (QCL-1000, BioWhittaker) according to the guidelines published by the US Food and Drug Administration. The endotoxin content determined in all cases was below 0.05 EU/µg Gp96.

Supernatants were taken after 18-24 h and mouse IL-12 (p40) was measured using standard sandwich ELISA protocols (antibodies and standards by BD PharMingen), streptavidin-conjugated horseradish peroxidase and 2,2'-azino-bis-(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS) substrate (Sigma). Furthermore, on day 3 after activation, expression of the co-stimulatory molecule CD86 was measured by flow cytometry (data not shown).

Human monocyte-derived, immature dendritic cells (day 7) were stimulated by Gp96, heat-treated Gp96, LPS or heat-treated LPS. Supernatants were assayed for TNF- α or IL-12 by sandwich ELISA as described above (data not shown). On day 3 after activation, expression of co-stimulatory molecules CD83 and CD86 and MICA/B were measured by flow cytometry. The MICA/B-specific mouse monoclonal antibody BAMO1 (Immatics Biotechnologies, Tübingen, Germany) was obtained by immunizing BALB/c mice with MIC-transfected P815 cells (Salih et al., 2002).

2.2.4 Stimulation of alloreactive T cells

Human DCs were stimulated with different activators in a 96 well plate for 3 days as described above, washed extensively and incubated with PBLs (ratio 1:10) from a different donor for 5 days. CD69 and MHC class II (data not shown) expression, both markers for human T-cell activation, was determined on day 1 or 5, respectively, by flow cytometry.

2.2.5 Stimulation of St42 CD8 T cells in vitro

Immature BMDCs were activated as described above for three days, washed extensively and loaded with 1 µg/ml H2-D^b-restricted Ad5-E1A₂₃₄₋₂₄₃ peptide (sequence SGPSNTPPEI) for 1.5 h at 37°C. E1A peptide was synthesized on a ABI 432 A peptide synthesizer (Applied Biosystems) applying Fmoc strategy. 2x10⁴ loaded BMDCs were washed four times and incubated with 1x10⁶ CFSE-labelled spleen cells from a St42 mouse. 5 days later proliferation and IFN-γ production were measured by flow cytometry. Cells were labelled with CFSE (carboxyfluorescein diacetate succinimide ester) by incubation with 1 µM CFSE in PBS at room temperature for 3 min in the dark and then washed three times with IMDM containing 10% FCS. Intracellular IFN-γ staining for flow cytometry was performed using the Cytofix/Cytoperm™ kit (BD PharMingen, San Diego, CA) according to the instructions of the manufacturer using a phycoerythrin-labelled anti-mouse IFN-γ antibody (BD PharMingen).

2.2.6 Adoptive Transfer

St42 adoptive transfer: 30x10⁶ CFSE labelled CD90.1⁺ heterozygous St42 spleen cells were injected i.v. into CD90.2⁺ homozygous C57BL/6 on day 0. Transferred CFSE-labelled cells could be detected by flow cytometry in the retroorbital blood on day 1. On day 2, BMDCs from C57BL/6 mice activated with different stimulators as described above were loaded with 100 µg/ml H2-D^b-restricted Ad5-E1A₂₃₄₋₂₄₃ peptide (sequence SGPSNTPPEI) or 100 µg/ml H2-D^b-restricted Ad5-E1B peptide (sequence VNIRNCCYI) as a negative control peptide for 1h at 37°C and 4x10⁵ peptide-loaded

2. Material und Methoden, Ergebnisse

BMDCs were injected i.p. into the mice. Cells in retroorbital blood at day 6 and 8 as well as in lymph nodes on day 8 were analyzed by flow cytometry.

OT-I/OT-II adoptive transfer was performed similar to the adoptive transfer of St42 mice except following changes: 30×10^6 CFSE labelled CD90.2⁺ homozygous OT-I or OT-II spleen cells were injected i.v. into CD90.1⁺ homozygous C57BL/6 mice on day 0. BMDCs from C57BL/6 mice were incubated with 100ng/ml K^b-restricted Ova₂₅₇₋₂₆₄ peptide or 10µg/ml A^b-restricted Ova₃₂₃₋₃₃₉ peptide for 1h at 37°C.

2.3 RESULTS

2.3.1 Dendritic cells are activated by Gp96

Bone-marrow derived dendritic cells (BMDC) were generated from C57BL/6 mice according to established protocols. Incubation of these immature dendritic cells with Gp96 for 3 days led to up-regulation of the co-stimulatory molecules CD80 and CD86 (data not shown, see (Singh-Jasuja et al., 2000a)) and release of pro-inflammatory cytokines like IL-12 and IL-6 (Fig. 1A). As lipopolysaccharides (LPS) from gram-negative bacteria are also described as potent TLR-4-dependent DC stimulators, the possibility of LPS contaminations in the Gp96 preparation had to be excluded. For this, the following control experiments were performed: A) Gp96 and LPS were both boiled for 20 min prior addition to the cell culture medium. While the activity of Gp96 was completely lost by the heat treatment, the activity of LPS was not affected (Singh-Jasuja et al., 2000a). B) The addition of the endocytosis inhibitor monodansylcadaverine (MDC) affected the activity of Gp96 but not LPS. Thus, activation of DCs by Gp96 is dependent on endocytosis of Gp96 while activation by LPS is not (Vabulas et al., 2001). C) Endotoxin levels in the Gp96 preparations by Limulus lysate assay were determined to be below 0.05 E.U./ μ g. LPS concentrations corresponding to the same endotoxin levels (less than 0.5 ng/ml) were not able to mature dendritic cells (Fig. 1A). D) Flanking fractions from the FPLC purification procedure which contained no Gp96 but similar levels of endotoxin compared to the Gp96-containing fraction did not lead to maturation of DCs (Fig. 1A).

2.3.2. Dendritic cells matured by Gp96 show enhanced stimulation of peptide-specific CD8 T-cells *in vitro*

So far, activation and proliferation of T cells by Gp96-matured DCs has only been reported for allogeneic T cells (Singh-Jasuja et al., 2000a). For peptide-specific T-cell activation, BMDCs from C57BL/6 mice were activated by Gp96, boiled Gp96 or LPS. One day later, the activation status of the BMDCs was measured by determining IL-12 levels in the supernatant (Fig. 1C). On day 3 after activation, these DCs were loaded

with E1A peptide, washed extensively and co-cultured with CFSE-labelled spleen cells from St42 mice expressing transgenic T-cell receptors specific for E1A peptide bound to H2-D^b molecules. The fluorescein-based dye CFSE is split among daughter cells during cell proliferation, thus emission of CFSE-labelled cells is reduced with every round of proliferation (Weston and Parish, 1990). On day 8, activation and proliferation of CD8 T cells in the culture was measured simultaneously by surface staining of CD8 molecules (not shown) and determining the level of CFSE and intracellular IFN- γ (Fig. 1B). DCs matured by Gp96 induced a stronger activation of CD8 T cells from St42 mice compared to LPS-matured DCs. This is despite the fact that LPS-matured DCs produced higher levels of IL-12 (Fig. 1C) or IL-6 and showed no difference in the expression of costimulatory molecules (data not shown).

2.3.3 Gp96-matured dendritic cells show enhanced stimulation of CD8 T cells *in vivo*

To extend the results for St42 T-cell proliferation *in vitro*, a physiologically more relevant setting was used. For this, CFSE-labelled spleen cells from St42 mice (CD90.1⁺) were injected into the tail vein of CD90.2⁺ C57BL/6 mice. 24 hours later the injected CD90.1⁺ CFSE⁺ cells could be detected in the blood of CD90.2⁺ mice and constituted approx. 1% of all peripheral blood cells (data not shown). One day later, BMDCs that had been matured by Gp96 or LPS for 6 hours or 3 days were loaded with E1A peptide or irrelevant E1B control peptide and injected intraperitoneally into these mice. On day 8 after injection of St42 cells retroorbital blood and draining lymph nodes were collected. In this way, proliferation of the CFSE-labelled CD90.1⁺ St42 T cells could be studied in response to DC immunization *in vivo*. Fig. 2 shows that *in vivo* proliferation of St42 T cells in response to dendritic cells matured by Gp96 was significantly stronger compared to non-matured or LPS-matured DCs (Fig. 2A, B) although Gp96 and LPS maturation of DCs was comparable as judged on the basis of IL-12 (Fig. 2C) or IL-6 release determined prior to DC injection *in vitro*. No proliferation was observed in all cases if DCs were not injected (Fig. 2B) or DCs had been loaded with the control peptide (data not shown).

2. Material und Methoden, Ergebnisse

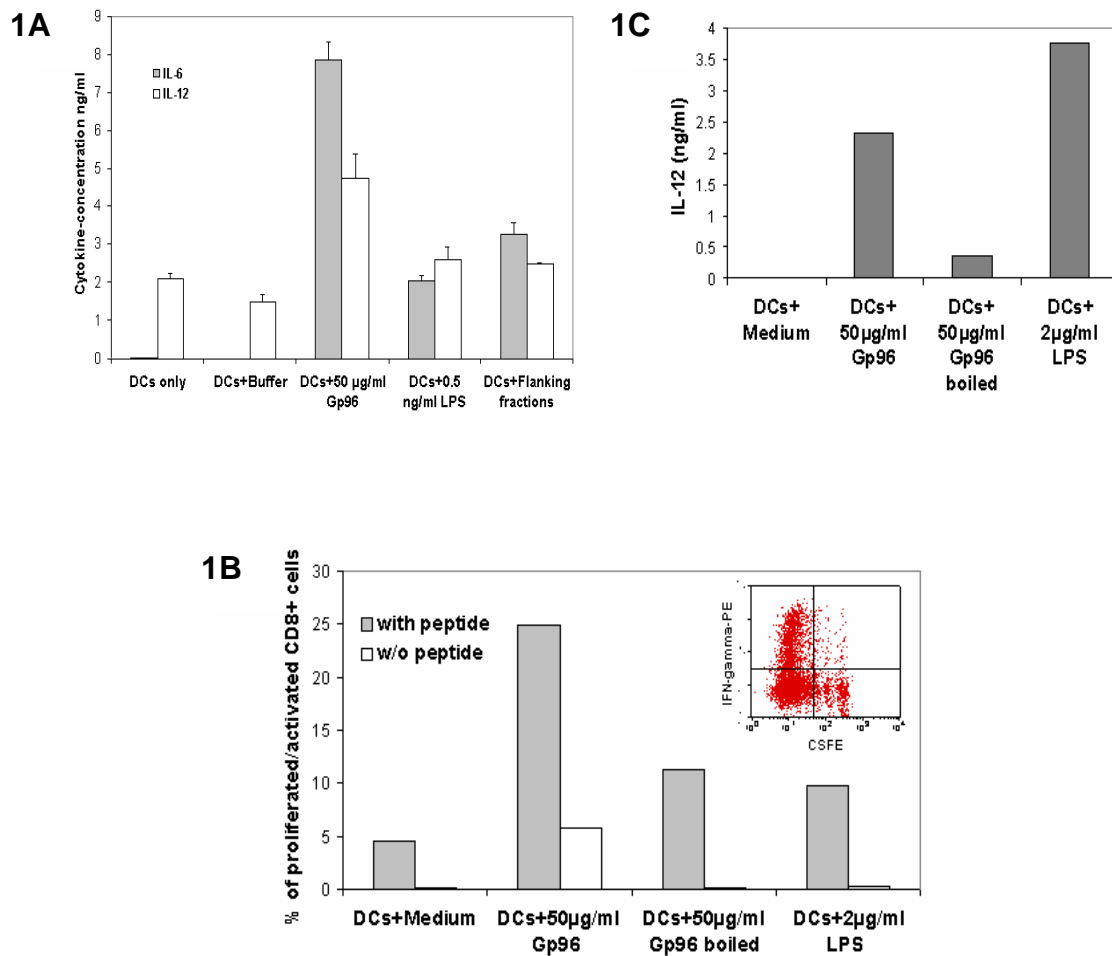


Figure 1. Mouse bone-marrow derived dendritic cells (BMDCs) matured by Gp96 induce peptide-specific proliferation and interferone (IFN)- γ production by CD8 T cells *in vitro*. (A) Cytokine production by mouse BMDCs matured by Gp96 or control stimuli. (B) IFN- γ of St42 CD8 T cells *in vitro*. On day 0 BMDCs from C57BL/6 mice were treated with Gp96, heat-treated Gp96 or lipopolysaccharide (LPS). On day 3 the pre-treated DCs were loaded with Ad5-E1A peptide and used for co-culture with carboxyfluorescein diacetate succinimide ester (CFSE-) labelled spleen cells from St42 mice. Proliferation and IFN- γ production of CD8 T cells were assayed by flow cytometry on day 8. The graph shows the percentage of IFN- γ production of the most proliferated CD8 T cells (see insert). (C) IL-12 production of the BMDCs used for the *in vitro* activation of St42 T cells. The results are representative of three independent experiments.

2. Material und Methoden, Ergebnisse

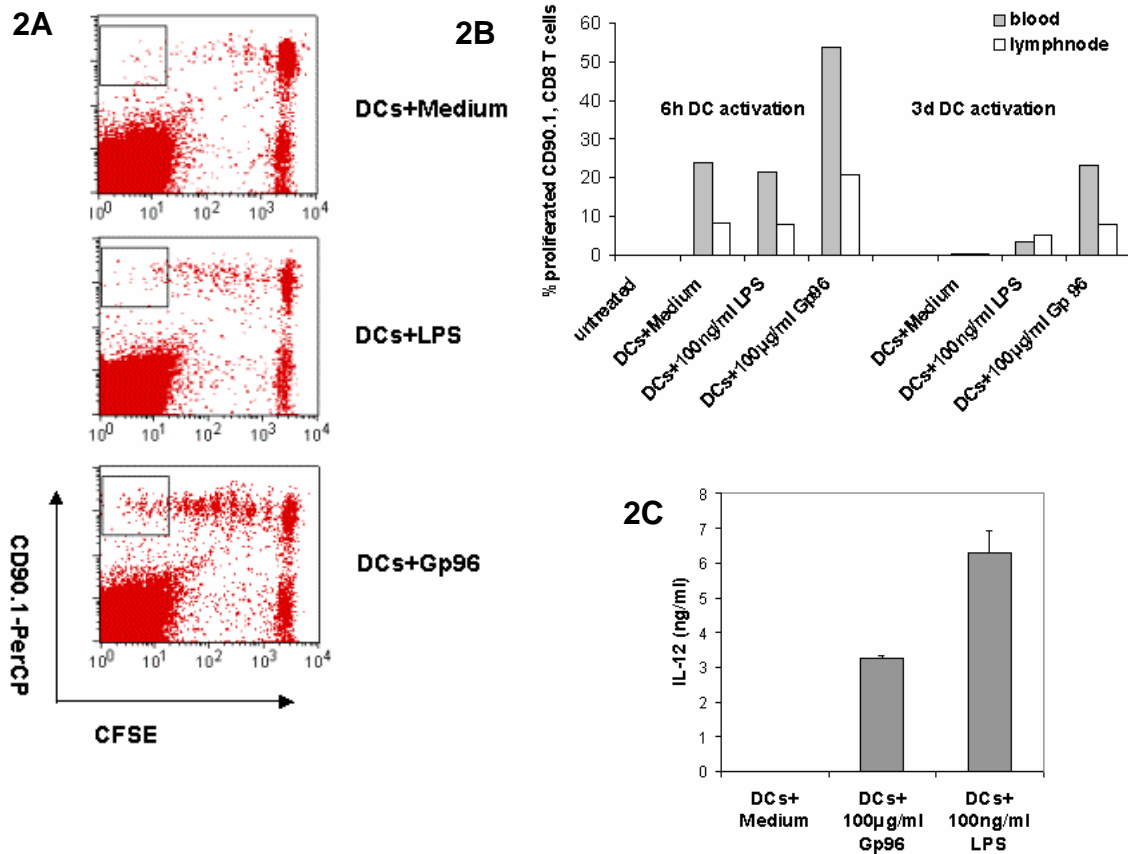


Figure 2. BMDCs matured by Gp96 induce peptide-specific proliferation of CTLs *in vivo*. On day 0 CFSE-labelled St42 spleen cells (CD90.1) were injected i.v. into C57BL/6 mice (CD90.2). BMDCs from C57BL/6 mice were matured by Gp96 or LPS for 6 hours or 3 days and loaded with Ad5-E1A peptide or Ad5-E1B peptide as a negative control. BMDCs were injected i.p. into C57BL/6 mice previously transferred with St42 splenocytes. On day 8 blood samples were taken by infraorbital puncture and draining lymph nodes were collected. (A) Proliferation of St42 CD8 T cells from lymph nodes 6 days after the immunization with Ad5-E1A peptide-loaded dendritic cells (DCs) matured by Gp96 or LPS for three days. (B) Percentage of proliferated St42 CD8 T cells (gate as shown in (A)) after immunization with peptide-loaded BMDCs treated as indicated. Untreated mice received St42 spleen cells only. (C) IL-12 production of BMDCs stimulated with Gp96 or LPS and used for immunization. Error bars give SD of triplicates. The results are representative of two independent experiments.

2.3.4 Mouse Gp96-matured DCs preferentially activate CD8 T cells vs. CD4 T cells *in vivo*

So far, we demonstrated that although Gp96 and LPS were able to mature BMDCs *in vitro* to similar extent, Gp96-matured DCs induced a stronger CD8 T-cell stimulation compared to LPS-matured DCs. To directly compare the proliferation of CD8 and CD4 T cells in response to the immunization with DCs matured by Gp96 or LPS, the OT-I and OT-II transgenic mouse systems were chosen. T cells of OT-I mice bear a transgenic T-cell receptor for a MHC class I epitope derived from ovalbumin while OT-II transgenic T cells recognize a MHC class II epitope also derived from ovalbumin. Analogous to the experiments using T cells from St42 mice CSFE-labelled OT-I or OT-II spleen cells (CD90.2⁺) were injected *i.v.* into C57BL/6 mice (CD90.1⁺). 48 hours later BMDCs that had been matured by Gp96 or LPS for 6 hours and subsequently loaded with either the MHC class I or class II restricted peptide from ovalbumin were injected *i.p.* into these mice. On day 8 retroorbital blood and lymph nodes were collected to detect proliferated CSFE-labelled CD90.2⁺ cells. Thus, it was possible to study the proliferation of CSFE-labelled CD8 as well as CD4 T cells *in vivo*. Although DCs were matured to similar levels by Gp96 and LPS judged by IL-12 release *in vitro* (Fig. 3D) proliferation of CD8 T cells in OT-I mice in response to Gp96-matured DCs was significantly stronger compared to LPS-matured DCs (Fig. 3A, B). On the other hand, proliferation of CD4 T cells in OT-II mice was enhanced when LPS-matured DCs were used as stimulator cells (Fig. 3A, C). No proliferation was observed when DCs loaded with a control peptide (Fig. 3A, B, C) or no DCs at all (Fig. 3B, C) were injected.

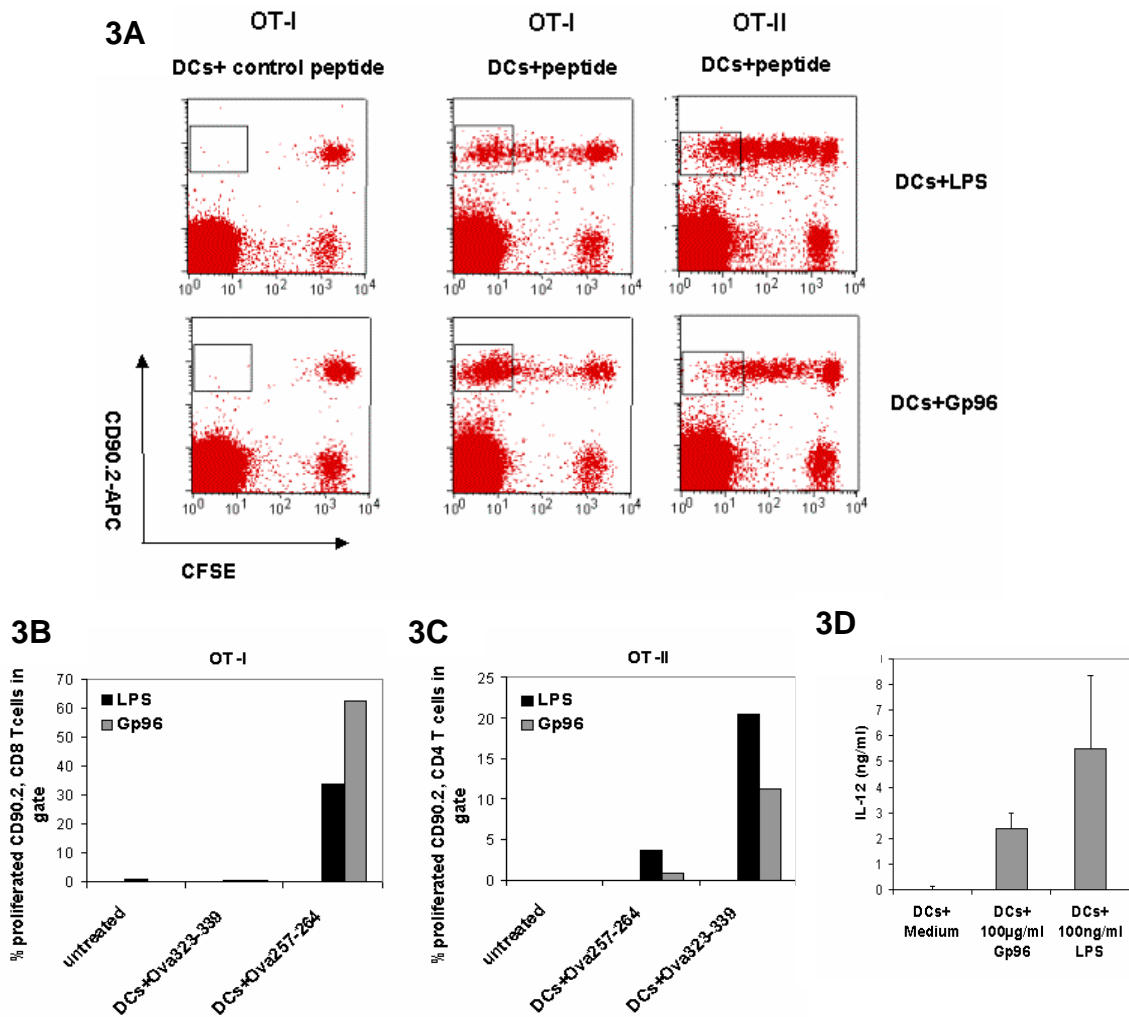


Figure 3. Mouse Gp96-matured DCs preferentially activated CD8 vs. CD4 T cells *in vivo*. On day 0 CFSE labelled OT-I or OT-II spleen cells (CD90.2⁺) were injected i.v. into C57BL/6 mice (CD90.1⁺). On day 2, BMDCs from C57BL/6 mice matured by Gp96 or LPS were loaded with H2-K^b-restricted Ova₂₅₇₋₂₆₄ peptide or H2-A^b-restricted Ova₃₂₃₋₃₃₉ peptide and injected i.p. into C57BL/6 mice previously injected with OT-I or OT-II spleen cells. On day 8, blood samples were taken by infraorbital puncture and the draining lymph nodes were collected. (A) Proliferation of OT-I or OT-II T cells in lymph nodes. (B, C) Summary of the proliferation of OT-I and OT-II T cells *in vivo*. The graphs show the percentage of proliferation present in the gates shown in (A). Untreated mice received OT-I or OT-II spleen cells only. (D) IL-12 production of DCs matured by Gp96 and LPS. Error bars give SD of triplicates. The results are representative of two independent experiments.

2.3.5. Human Gp96-matured dendritic cells preferentially stimulate CD8 T cells

Next, the preference for CD8 T-cell activation by Gp96-matured DCs was analyzed using human cells. Monocyte-derived human dendritic cells were generated according to established protocols by plastic adherence and culturing of the purified monocytes with GM-CSF and IL-4 for 7 days. Incubation of these immature dendritic cells with Gp96 or LPS for 3 days led to up-regulation of the co-stimulatory molecule CD86 and the maturation marker CD83 as well as the release of pro-inflammatory cytokines like IL-12, TNF- α and IL-6 (data not shown). These DCs were co-cultured with allogeneic PBL. Activation of the T cells was measured by surface staining of human T-cell activation markers CD69 on day 1 (Fig. 4A) and MHC class II molecules on day 5 (data not shown) after DC co-culture. As expected, on both days significantly less T cells were activated by immature dendritic cells compared to dendritic cells matured by Gp96 or LPS (also see (Singh-Jasuja et al., 2000a)). When the expansion of CD8⁺ versus CD4⁺ T cells were determined we observed that Gp96-matured DCs preferentially activated CD8⁺ T cells while this preference was not observed using different LPS concentrations for the maturation of stimulator DCs (Fig. 4A). Reducing the amount of Gp96 resulted in a reduced overall T-cell activation but did not influence the ratio of CD8⁺ vs. CD4⁺ T cells (data not shown).

One possible explanation for the preferred activation of CD8⁺ T cells by Gp96-stimulated DCs is the expression of molecules that specifically co-stimulate the CD8⁺ T cell subset. Possible candidates are MIC molecules which show inducible expression and interact with NKG2D molecules present on the surface of CD8⁺ but not CD4⁺ T cells (Bauer et al., 1999). We therefore stimulated human DCs with Gp96 or LPS and investigated the expression of MIC molecules with a monoclonal antibody that detects both MICA and MICB. As shown in Fig. 4B, only Gp96 but not LPS is able to significantly up-regulate the expression of MICA/B on DCs.

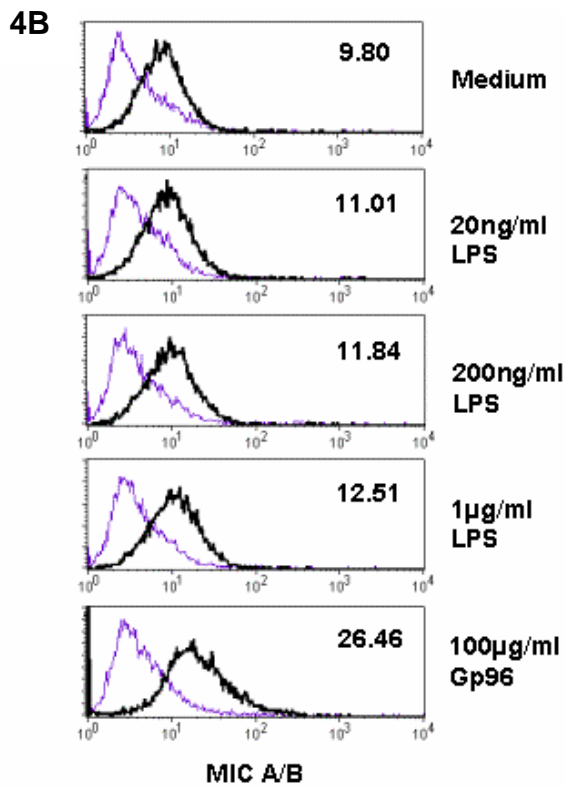
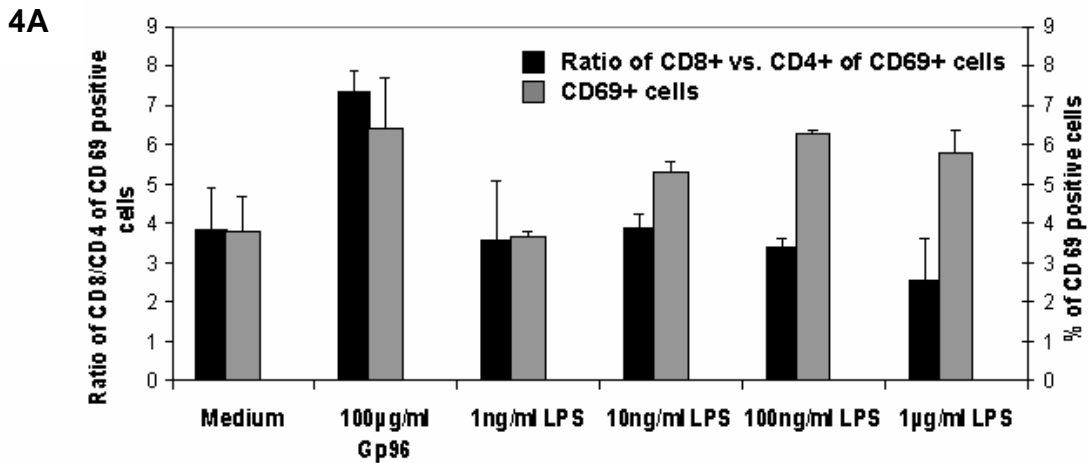


Figure 4. Human DCs matured by Gp96 preferentially induce activation of allogeneic CD8 T cells. Monocyte-derived human dendritic cells were incubated with Gp96 or LPS for 3 days and then co-cultured with allogeneic PBL. (A) Percentage of CD69 expressing T cells (grey bars) and the CD8/CD4 ratio of CD69 positive T cells (black bars) 1 day after stimulation with matured DCs. Results are representative of two independent experiments. (B) Human DCs express elevated MHC class I-related chain (MIC)A/B levels after Gp96 stimulation. Human DCs were stimulated with the indicated concentrations of Gp96 or LPS and stained with the anti-MIC A/B mAb BAMO1 (dark line) or control mAb (grey line). The numbers indicate mean fluorescence intensity of anti-MICA/B staining. The results are representative of two independent experiments.

2.4 DISCUSSION

Heat shock proteins like Gp96 and Hsp70 have been shown to contribute to CTL activation (Srivastava et al., 1998; Schild et al., 1999; Schild and Rammensee, 2000; Srivastava, 2002) and to promote the maturation of BMDCs *in vivo* and *in vitro* (Singh-Jasuja et al., 2000a; Basu et al., 2000b; Todryk et al., 1999). This results in the secretion of pro-inflammatory cytokines (Fig. 1A) and the up-regulation of co-stimulatory molecules in a TLR-2/4-dependent fashion (Vabulas et al., 2002a; Vabulas et al., 2002b; Asea et al., 2002).

In this work we analyzed whether BMDC activation by Gp96 induces adaptive immune responses that differ from those induced by LPS-activated BMDCs. The reason to compare these two stimuli is based on the fact that LPS is present during infections with gram-negative bacteria which will be controlled predominantly by antibody-dominated immune responses. Gp96, on the other hand, is released during necrotic cell death, for example as a consequence of viral infections (Berwin et al., 2001); the elimination of many viruses requires the activation of CTLs.

Using BMDCs activated with either of the two stimuli we find that Gp96-mediated stimulation promotes predominantly the activation and expansion of antigen-specific CD8⁺ T cells *in vitro* (Fig. 1B) and *in vivo* (Fig. 2 and Fig. 3), whereas LPS-mediated stimulation favors the activation and expansion of antigen-specific CD4⁺ T cells (Fig. 3). This bias, which also argues against an endotoxin contamination in the Gp96 preparation, is not based on differences in the production of IL-12 or IL-6 or the expression of MHC or co-stimulatory molecules (Fig. 1C, Fig. 2C, Fig. 3D; data not shown) by Gp96- or LPS-stimulated BMDCs. Our findings contrast previous observations where the stimulation of CD4⁺ T cells by anti-CD3 mAb in the presence of Gp96 results in the production of a Th2-type cytokine profile (Banerjee et al., 2002). However, these results were obtained exclusively *in vitro* in an antigen-independent manner.

A similar bias is observed for the activation of alloreactive CD8⁺ T cells by human DCs stimulated by Gp96 (Fig. 4). Examining the ratio of activated CD8⁺ versus CD4⁺ T cells, we find that Gp96-activated human DCs preferentially stimulate the activation of CD8⁺ T cells as compared to LPS-activated DCs. The reduced activation of CD8⁺ T

cells by LPC-activated DCs does not depend on the amount of LPS used for DC activation. Increasing the concentration of LPS results in an increase of CD69⁺ T cells but the CD8/CD4 ratio does not change as compared to untreated DCs (Fig. 4A).

To explain the CD8-biased T-cell activation we looked for possible differences in the expression of the surface molecules MICA/B which support the activation of CD8⁺ but not CD4⁺ T cells. Analyzing Gp96- or LPS-activated DCs we find that only Gp96 but not LPS at different concentrations enhances the expression of MICA/B (Fig. 4B). The MICA/B monoclonal antibody available to us did not block the preference for CD8 T-cell activation by Gp96-matured DCs. The reason might be that although detecting surface expression this mAb reduces the binding of soluble NKG2D only partially (data not shown). Still, these findings provide an attractive explanation for the CD8 bias in the activation of human T cells. The effect of Gp96 is of special interest as MICA/B expression on human DCs has so far only been induced by a *M. tuberculosis* infection where the expression of MICA enhanced the lytic activity of V γ 2V δ 2 expressing T cells (Das et al., 2001) and by IFN-alpha where the induction of MICA leads to the activation of NK cells (Jinushi et al., 2003). Our observations suggest that the induced expression of MICA/B molecules favors the activation of CD8⁺ T cells not only at the level of effector functions but already during the induction of immune responses. It is possible that a similar scenario also explains our results obtained in the mouse system. However in mice, MICA/B-like molecules have not been detected so far. Whether Mill1/Mill2 molecules sharing about 35% identity at the amino acid level with MICA/B molecules can interact with potential ligands expressed by mouse CD8⁺ T cells remains to be determined (Kasahara et al., 2002).

The participation of TLR4 in APC activation by heat shock proteins requires that endotoxin contaminations in the HSP preparations have to be excluded. Several arguments have been discussed previously, including HSP effects being sensitive to heat treatment or the presence of monodansylcadaverine and insensitivity to polymyxin B (Singh-Jasuja et al., 2000a; Vabulas et al., 2001). Extending these findings, we now show that flanking FPLC fractions obtained during the purification of Gp96 (containing no Gp96 but the identical amount of endotoxin as the Gp96 preparation used for DC activation) do not activate BMDCs. Furthermore, LPS concentrations (0.5 ng/ml) corresponding to the amount of endotoxin present in the Gp96 preparation do not

activate BMDCs (Fig. 1A). Recently, it was shown that Gp96 molecules expressed on the surface of tumor cells or secreted either as intact molecules or as NH₂-terminal fragments are able to promote BMDC activation (Zheng et al., 2001; Baker-LePain et al., 2002). All together, these data allow the conclusion that Gp96 molecules themselves mediate APC activation.

In summary, our data show that heat shock proteins such as Gp96, as well as endotoxins such as LPS, are messengers that are able to specifically induce and influence the outcome of adaptive immune responses. Extracellular pathogen-associated signals such as LPS result in CD4 T cell-dependent antibody responses. Intracellular pathogen-associated signals such as Gp96 induce CD8 T-cell responses. Thus, precisely those immune mechanisms are triggered that are the most suitable for counteracting the pathogens that need to be eliminated.

Hinweis zur Mitarbeit der einzelnen Mitautoren:

Alle dargestellten Ergebnisse und Experimente beruhen allein auf meiner eigenen Arbeit. Eine Ausnahme bildet Figure 1A, da dieses Experiment von Mitautorin Sibylla Braedel durchgeführt wurde. Die Arbeit der restlichen Autoren beruht entweder auf entscheidenden Vorarbeiten zu meinem Projekt (Harpreet Singh-Jasuja), technischen Hilfestellungen (Tobias Warger, Matthias Hofmann, Norbert Hilf, Katrin Wiemann), oder der Betreuung dieser Arbeit (Harpreet Singh-Jasuja, Hans-Georg Rammensee, Hansjörg Schild).

3. Diskussion

3.1 Aktivierung von DCs durch Gp96

Eine Inkubation von bone-marrow derived dendritic cells (BMDCs) - also von Dendritischen Zellen aus dem Knochenmark von Mäusen - mit Gp96 führt zu einer TLR-2/4 abhängigen Hochregulation von kostimulatorischen Molekülen (Singh-Jasuja et al., 2000; Vabulas et al., 2002b; Vabulas et al., 2002a; Asea et al., 2002) und zur Freisetzung der pro-inflammatorischen Zytokine IL-12 und IL-6 (Fig. 1A). Dies hat zur Folge, dass HSPs wie Gp96 oder auch Hsp70 eine Reifung von BMDCs *in vivo* und *in vitro* bewirken und so eine CTL Aktivierung vermitteln können (Srivastava et al., 1998; Schild et al., 1999; Schild and Rammensee, 2000; Srivastava, 2002).

Da auch LPS von gram-negativen Bakterien einen TLR-4 abhängigen Aktivator von DCs darstellt, muss eine Endotoxin-Kontamination in den HSP-Präparationen ausgeschlossen werden. Hierfür wurden mehrere Kontrollexperimente durchgeführt. Es wurde gezeigt, dass die Aktivität von Gp96 durch Kochen von 20 Min. aufgehoben werden konnte, während die Aktivierung durch LPS dadurch nicht beeinflusst wurde. Weiter beeinträchtigte die Zugabe des Endozytose-Inhibitors Monodansylcadaverin (MDC) nur die Aktivität von Gp96 und nicht die von LPS, womit auf die Endozytoseabhängigkeit von Gp96 geschlossen werden kann, die aber nicht für LPS zutrifft (Vabulas et al., 2001). Zudem wurde die Endotoxin-Kontamination der Gp96-Präparationen mittels des Limulus-Assay bestimmt. Sie lag unter 0.05 E.U./ μg , wobei eine entsprechende LPS-Konzentration keine Reifung von DCs auslösen konnte (Fig. 1A). Darüber hinaus konnte jetzt auch gezeigt werden, dass die flankierenden FPLC (fast protein liquid chromatography)-Fraktionen, die während einer Gp96-Aufreinigung gewonnen werden und kein Gp96, dafür aber ungefähr die gleiche Menge an Endotoxin wie die Gp96-Präparationen, die zur DC-Aktivierung verwendet wurden, enthalten, keine Aktivierung von BMDCs bewirken konnten (Fig. 1A). Da außerdem Daten vorliegen, die zeigen, dass Gp96-Moleküle, die auf der Oberfläche von Tumor-Zellen exprimiert oder als intakte Moleküle bzw. als NH_2 -terminale Fragmente sezerniert werden, eine BMDC-Aktivierung hervorrufen können (Baker-LePain et al., 2002;

Zheng et al., 2001), ist es erlaubt, hier die Schlussfolgerung zu ziehen, dass die Gp96-Moleküle selbst für die Aktivierung von DCs verantwortlich sind.

DCs sind zunehmend immer wichtiger im Rahmen neuer Vakzinierungsstrategien gegen Tumoren, Infektionen und Autoimmunerkrankungen. So führten z.B. Hybride aus Tumorzellen und DCs zu einer Regression und in manchen Fällen sogar zu einer Elimination des metastasierenden Nierenzellkarzinoms (Kugler et al., 2000). Die Ansätze der DC-Vakzinierung konzentrieren sich zum einen auf eine Aktivierung der DCs und zum anderen auf eine spezifische Komponente durch Peptidbeladung oder Transfektion von Proteingenen. Gp96 besitzt in diesem Rahmen also ein einzigartiges Potential für die Entwicklung von Vakzinierungsstrategien, da es sowohl spezifische Peptide bindet als auch DCs aktivieren kann.

3.2 Wirkung der durch Gp96 aktivierten DCs auf peptidspezifische CD8 und CD4 T-Zellen

Da LPS vor allem eine Rolle im Rahmen von Infektionen mit gram-negativen Bakterien spielt mit anschließender Antikörper-dominiertes Immunantwort und Gp96 freigesetzt wird durch nekrotische Zellen z.B. im Rahmen von Virusinfektionen (Berwin et al., 2001), die zur Elimination einer Aktivierung von CTLs bedürfen, sollte in dieser Arbeit untersucht werden, ob Gp96-aktivierte DCs eine adaptive Immunantwort auslösen können, die sich von der durch LPS-aktivierte DCs ausgelöst unterscheidet.

Bislang war eine Aktivierung und Proliferation von T-Zellen durch Gp96 aktivierte DCs nur für allogene T-Zellen gezeigt worden (Singh-Jasuja et al., 2000). In dieser Arbeit konnte zum ersten Mal dargestellt werden, dass diese DCs *in vitro* nicht nur auch eine peptidspezifische Aktivierung von CD8 T-Zellen vermitteln können, sondern im Vergleich zu LPS sogar zu einer verstärkten Aktivierung führten (Fig. 1B). Dies war der Fall obgleich durch LPS gereifte DCs zu einer stärkeren Produktion von IL-12 (Fig. 1C) oder IL-6 angeregt wurden und keine Differenz zu Gp96 in der Expression von kostimulatorischen Molekülen bestand.

Da die physiologische Relevanz von *in vitro* Experimenten in Frage gestellt werden kann, wurden die Experimente auch auf ein *in vivo*-Modell ausgeweitet. Die genannten

Ergebnisse konnten bestätigt werden, indem auch hier im Vergleich zu nicht oder mit LPS gereiften DCs eine verstärkte Proliferation von peptidspezifischen CD8 T-Zellen als Antwort auf durch Gp96 aktivierte DCs beobachtet wurde (Fig. 2 und Fig. 3). Die IL-12- (Fig. 2C und Fig. 3D) und die IL-6-Produktion sowie die Expression der MHC- und der kostimulatorischen Moleküle der durch Gp96 oder LPS gereiften DCs waren auch hier vergleichbar.

Wenn man dagegen die Aktivierung und Proliferation von antigenspezifischen CD4 T-Zellen betrachtet, ergibt sich genau das Gegenteil. Diese Aktivierung wird verstärkt durch eine LPS vermittelte Stimulation der DCs (Fig. 3), womit sich zudem ein zusätzliches Argument gegen eine Endotoxin-Kontamination in der Gp96-Präparation ergibt.

Diese Ergebnisse stehen im Gegensatz zu früheren Darstellungen, in denen eine anti-CD3 vermittelte Stimulation von CD4 T-Zellen in der Gegenwart von Gp96 zu einer Produktion eines T_H2 -Zytokin Profils führte (Banerjee et al., 2002), woraus eine Funktion von Gp96 als T_H2 kostimulatorisches Molekül gefolgert wurde. Jedoch wurden diese Experimente nur *in vitro* und auch nur in einem Antigen-unabhängigen Modell durchgeführt.

3.3 Aktivierung von alloreaktiven CD8 T-Zellen durch humane mit Gp96 aktivierte DCs

Die Präferenz der CD8 T-Zell-Aktivierung durch Gp96-gereifte DCs konnte zudem mit humanen Zellen bestätigt werden (Fig. 4A), indem das Verhältnis der aktivierten CD8 zu den aktivierten CD4 T-Zellen bestimmt wurde. Die Ergebnisse waren unabhängig von der für die DC Reifung eingesetzten LPS Menge. Eine höhere LPS-Konzentration führte zu einer verstärkten Hochregulation von CD69, jedoch blieb das Verhältnis von CD8 zu CD4 im Vergleich zu unbehandelten DCs gleich (Fig. 4A).

Im Rahmen dieser Experimente wurde zudem nach möglichen Ursachen dieser Präferenz gesucht. Mögliche Kandidaten könnten MHC class I-related chain- (MIC-) Moleküle sein, die mit NKG2D Molekülen auf der Oberfläche von CD8 aber nicht von CD4 T-Zellen interagieren (Bauer et al., 1999) und so zu einer Aktivierung führen.

Deswegen wurden die DCs nach Stimulation mit Gp96 oder LPS auf einen Unterschied in der Expression von MIC Molekülen hin untersucht. Diese Experimente lieferten Hinweise, dass nur Gp96 und nicht LPS in verschiedenen Konzentrationen signifikant die Expression von MICA/B hochreguliert (Fig. 4B). Leider konnte keine Blockierung durch den verwendeten MICA/B monoklonalen Antikörper ausgelöst werden. Ein Grund hierfür könnte sein, dass, obwohl dieser Antikörper die Expression der MIC-Moleküle auf der Oberfläche erkennt, er die Bindung durch lösliches NKG2D nur teilweise verhindern kann.

Besonders interessant ist der Effekt von Gp96 auf die MICA/B Expression an der Oberfläche von DCs auch, da diese bisher nur im Rahmen einer *M.tuberculosis* Infektion hervorgerufen werden konnte, in der die Expression von MICA die lytische Aktivität der V γ 2V δ 2 exprimierenden T-Zellen verstärkte (Das et al., 2001), und durch IFN α mit nachfolgender verstärkter Aktivierung von NK-Zellen (Jinushi et al., 2003). Somit könnte die bevorzugte Aktivierung von CD8 T-Zellen durch eine Expression von MICA/B-Molekülen nicht erst auf der Effektor-Ebene stattfinden, sondern schon während der Induktion einer Immunantwort.

Es ist möglich, dass ähnliche Gründe auch für die CD8 T-Zell-Präferenz im Maussystem verantwortlich sind, jedoch wurden bisher in Mäusen keine MICA/B Moleküle entdeckt. Ob Mill1/Mill2 Moleküle, die zu ca. 35% eine Identität mit den Aminosäuren der MICA/B-Moleküle aufweisen, mit potentiellen Liganden, die von CD8 T-Zellen der Maus exprimiert werden, interagieren können, bleibt noch zu untersuchen (Kasahara et al., 2002).

4. Zusammenfassung

Gp96 bindet nicht nur Peptide, sondern kann auch spezifisch mit bestimmten Oberflächenrezeptoren auf APCs, z.B. CD91, interagieren und so den effizienten Transport der gebundenen Peptide in den MHC-I Prozessierungsweg ermöglichen. Dies führt zu einer rezeptorvermittelten Endozytose von Gp96-Peptid Komplexen mit anschließender Kreuzpräsentation der Peptide auf MHC Klasse I-Moleküle und Aktivierung von zytotoxischen T-Lymphozyten (Arnold-Schild et al., 1999; Wassenberg et al., 1999; Singh-Jasuja et al., 2000b; Binder et al., 2000b).

Außerdem aktiviert Gp96 gleichzeitig APCs wie DCs *in vitro* (Singh-Jasuja et al., 2000a; Basu et al., 2000) und *in vivo* (Binder et al., 2000a), was zu einer Hochregulation der kostimulatorischen Aktivität und der Freisetzung von pro-inflammatorischen Zytokinen sowie auch NO (Panjwani et al., 2002) führt. Erst kürzlich wurde gezeigt, dass diese Reifung von DCs TLR2- und TLR4-abhängig ist (Vabulas et al., 2002).

Zudem fungiert GP96 als lokales Gefahrensignal als Antwort auf zellulären Stress. Es wird freigesetzt durch Nekrose z.B. im Rahmen von Virusinfektionen, nicht aber durch Apoptose (Basu et al., 2000; Berwin et al., 2001). Nekrotische Lysate von primären Tumorzellen konnten DCs aktivieren, waren angereichert an HSPs, und die Menge an HSPs korrelierte mit der Fähigkeit, DCs zu aktivieren (Somersan et al., 2001). Zugleich können Thrombozyten Gp96 binden, was eine Neutralisation ihrer Fähigkeit zur DC-Reifung zur Folge hat, ein möglicher Mechanismus, die Aktivität von Gp96 auf das lokale Gewebe zu beschränken (Hilf et al., 2002).

Ausgangspunkt dieser Arbeit war die Beobachtung im Rahmen von *in vitro* Proliferationsassays mit allogenen T-Zellen, dass DCs durch Gp96 aktiviert eine verstärkte CD8 T-Zell Immunantwort auslösen konnten (Singh-Jasuja et al., 2000a).

Bei der genaueren Untersuchung dieses Phänomens konnte in dieser Arbeit dargestellt werden, dass sowohl aus Monozyten hergestellte humane DCs als auch BMDCs nach einer Aktivierung durch Gp96 eine Präferenz für die Aktivierung von CD8⁺ zytotoxischen T-Zellen *in vitro* wie *in vivo* aufweisen. Im Gegensatz dazu führt eine

LPS-Aktivierung bevorzugt zu einer CD4 T-Zell vermittelten Immunantwort. Im Falle der humanen DCs korrelierte diese Beobachtung mit der Expression von MICA/B-Molekülen auf der Oberfläche von der mit Gp96 oder LPS stimulierten DCs.

Zusammenfassend wurde also in dieser Arbeit gezeigt, dass HSPs wie Gp96, aber auch Endotoxine - so z.B. LPS - geeignet sind, spezifisch die adaptive Immunantwort zu induzieren wie auch das Ergebnis zu beeinflussen. Signale in Zusammenhang mit extrazellulären Pathogenen wie LPS führen zu einer CD4 T-Zell abhängigen Antikörper-Immunantwort, während Signale, die mit intrazellulären Pathogenen assoziiert sind, so z.B. Gp96, eine CD8 T-Zell Antwort bevorzugen. Es werden also immer die Immunmechanismen bemüht, die gerade am geeignetsten sind, um das jeweilige Pathogen zu eliminieren.

5. Literaturverzeichnis

5.1 Lehrbücher

Charles Janeway, Paul Travers et al., Immunobiology, Fifth Edition, Garland Publishing, New York, 2001.

Janis Kuby, Immunology, Third Edition, W.H. Freeman & Co., New York, 1997

5.2 Original Publikationen und Reviews

Aderem,A. and Ulevitch,R.J. (2000). Toll-like receptors in the induction of the innate immune response. *Nature* 406, 782-787.

Aderem,A. and Underhill,D.M. (1999). Mechanisms of phagocytosis in macrophages. *Annu. Rev. Immunol.* 17, 593-623.

Albert,M.L., Jegathesan,M., and Darnell,R.B. (2001). Dendritic cell maturation is required for the cross-tolerization of CD8+ T cells. *Nat. Immunol.* 2, 1010-1017.

Albert,M.L., Pearce,S.F., Francisco,L.M., Sauter,B., Roy,P., Silverstein,R.L., and Bhardwaj,N. (1998a). Immature dendritic cells phagocytose apoptotic cells via alpha5beta1 and CD36, and cross-present antigens to cytotoxic T lymphocytes. *J. Exp. Med.* 188, 1359-1368.

Albert,M.L., Sauter,B., and Bhardwaj,N. (1998b). Dendritic cells acquire antigen from apoptotic cells and induce class I-restricted CTLs. *Nature* 392, 86-89.

Altmeyer,A., Maki,R.G., Feldweg,A.M., Heike,M., Protopopov,V.P., Masur,S.K., and Srivastava,P.K. (1996). Tumor-specific cell surface expression of the-KDEL containing, endoplasmic reticular heat shock protein gp96. *Int. J. Cancer* 69, 340-349.

Amigorena,S. (2002). Fc gamma receptors and cross-presentation in dendritic cells. *J. Exp. Med.* 195, F1-F3.

Arnold,D., Faath,S., Rammensee,H., and Schild,H. (1995). Cross-priming of minor histocompatibility antigen-specific cytotoxic T cells upon immunization with the heat shock protein gp96. *J. Exp. Med.* 182, 885-889.

- Arnold,D., Wahl,C., Faath,S., Rammensee,H.G., and Schild,H. (1997). Influences of transporter associated with antigen processing (TAP) on the repertoire of peptides associated with the endoplasmic reticulum-resident stress protein gp96. *J. Exp. Med.* *186*, 461-466.
- Arnold-Schild,D., Hanau,D., Spehner,D., Schmid,C., Rammensee,H.G., de la,S.H., and Schild,H. (1999). Cutting edge: receptor-mediated endocytosis of heat shock proteins by professional antigen-presenting cells. *J. Immunol.* *162*, 3757-3760.
- Arstila,T.P., Casrouge,A., Baron,V., Even,J., Kanellopoulos,J., and Kourilsky,P. (1999). A direct estimate of the human alphabeta T cell receptor diversity. *Science* *286*, 958-961.
- Asea,A., Rehli,M., Kabingu,E., Boch,J.A., Bare,O., Auron,P.E., Stevenson,M.A., and Calderwood,S.K. (2002). Novel signal transduction pathway utilized by extracellular HSP70: role of toll-like receptor (TLR) 2 and TLR4. *J. Biol. Chem.* *277*, 15028-15034.
- Baker-LePain,J.C., Sarzotti,M., Fields,T.A., Li,C.Y., and Nicchitta,C.V. (2002). GRP94 (gp96) and GRP94 N-terminal geldanamycin binding domain elicit tissue nonrestricted tumor suppression. *J. Exp. Med.* *196*, 1447-1459.
- Banchereau,J. and Steinman,R.M. (1998). Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* *392*, 245-252.
- Banerjee,P.P., Vinay,D.S., Mathew,A., Raje,M., Parekh,V., Prasad,D.V., Kumar,A., Mitra,D., and Mishra,G.C. (2002). Evidence that glycoprotein 96 (B2), a stress protein, functions as a Th2-specific costimulatory molecule. *J. Immunol.* *169*, 3507-3518.
- Barnden,M.J., Allison,J., Heath,W.R., and Carbone,F.R. (1998). Defective TCR expression in transgenic mice constructed using cDNA-based alpha- and beta-chain genes under the control of heterologous regulatory elements. *Immunol. Cell Biol.* *76*, 34-40.
- Basu,S., Binder,R.J., Suto,R., Anderson,K.M., and Srivastava,P.K. (2000). Necrotic but not apoptotic cell death releases heat shock proteins, which deliver a partial maturation signal to dendritic cells and activate the NF-kappa B pathway. *Int. Immunol.* *12*, 1539-1546.
- Basu,S. and Srivastava,P.K. (2000). Heat shock proteins: the fountainhead of innate and adaptive immune responses. *Cell Stress. Chaperones.* *5*, 443-451.
- Bauer,S., Groh,V., Wu,J., Steinle,A., Phillips,J.H., Lanier,L.L., and Spies,T. (1999). Activation of NK cells and T cells by NKG2D, a receptor for stress-inducible MICA. *Science* *285*, 727-729.
- Bellone,M., Iezzi,G., Rovere,P., Galati,G., Ronchetti,A., Protti,M.P., Davoust,J., Rugarli,C., and Manfredi,A.A. (1997). Processing of engulfed apoptotic bodies yields T cell epitopes. *J. Immunol.* *159*, 5391-5399.

- Bender,A., Sapp,M., Schuler,G., Steinman,R.M., and Bhardwaj,N. (1996). Improved methods for the generation of dendritic cells from nonproliferating progenitors in human blood. *J Immunol Methods* *196*, 121-135.
- Berwin,B., Hart,J.P., Pizzo,S.V., and Nicchitta,C.V. (2002). Cutting edge: CD91-independent cross-presentation of GRP94(gp96)-associated peptides. *J. Immunol.* *168*, 4282-4286.
- Berwin,B., Reed,R.C., and Nicchitta,C.V. (2001). Virally induced lytic cell death elicits the release of immunogenic GRP94/gp96. *J. Biol. Chem.* *276*, 21083-21088.
- Bevan,M.J. (1976a). Cross-priming for a secondary cytotoxic response to minor H antigens with H-2 congenic cells which do not cross-react in the cytotoxic assay. *J. Exp. Med.* *143*, 1283-1288.
- Bevan,M.J. (1976b). Minor H antigens introduced on H-2 different stimulating cells cross-react at the cytotoxic T cell level during in vivo priming. *J. Immunol.* *117*, 2233-2238.
- Binder,R.J., Anderson,K.M., Basu,S., and Srivastava,P.K. (2000a). Cutting edge: heat shock protein gp96 induces maturation and migration of CD11c+ cells in vivo. *J. Immunol.* *165*, 6029-6035.
- Binder,R.J., Blachere,N.E., and Srivastava,P.K. (2001). Heat shock protein-chaperoned peptides but not free peptides introduced into the cytosol are presented efficiently by major histocompatibility complex I molecules. *J. Biol. Chem.* *276*, 17163-17171.
- Binder,R.J., Han,D.K., and Srivastava,P.K. (2000b). CD91: a receptor for heat shock protein gp96. *Nat. Immunol.* *1*, 151-155.
- Blachere,N.E., Li,Z., Chandawarkar,R.Y., Suto,R., Jaikaria,N.S., Basu,S., Udono,H., and Srivastava,P.K. (1997). Heat shock protein-peptide complexes, reconstituted in vitro, elicit peptide-specific cytotoxic T lymphocyte response and tumor immunity. *J. Exp. Med.* *186*, 1315-1322.
- Blachere,N.E., Udono,H., Janetzki,S., Li,Z., Heike,M., and Srivastava,P.K. (1993). Heat shock protein vaccines against cancer. *J. Immunother.* *14*, 352-356.
- Brossart,P. and Bevan,M.J. (1997). Presentation of exogenous protein antigens on major histocompatibility complex class I molecules by dendritic cells: pathway of presentation and regulation by cytokines. *Blood* *90*, 1594-1599.
- Carbone,F.R. and Bevan,M.J. (1990). Class I-restricted processing and presentation of exogenous cell-associated antigen in vivo. *J. Exp. Med.* *171*, 377-387.
- Ciupitu,A.M., Petersson,M., O'Donnell,C.L., Williams,K., Jindal,S., Kiessling,R., and Welsh,R.M. (1998). Immunization with a lymphocytic choriomeningitis virus peptide mixed with heat shock protein 70 results in protective antiviral immunity and specific cytotoxic T lymphocytes. *J. Exp. Med.* *187*, 685-691.

- Das,H., Groh,V., Kuijl,C., Sugita,M., Morita,C.T., Spies,T., and Bukowski,J.F. (2001). MICA engagement by human Vgamma2Vdelta2 T cells enhances their antigen-dependent effector function. *Immunity*. *15*, 83-93.
- den Boer,A.T., Diehl,L., van Mierlo,G.J., van der Voort,E.I., Fransen,M.F., Krimpenfort,P., Melief,C.J., Offringa,R., and Toes,R.E. (2001). Longevity of antigen presentation and activation status of APC are decisive factors in the balance between CTL immunity versus tolerance. *J. Immunol.* *167*, 2522-2528.
- den Haan,J.M., Lehar,S.M., and Bevan,M.J. (2000). CD8(+) but not CD8(-) dendritic cells cross-prime cytotoxic T cells in vivo. *J. Exp. Med.* *192*, 1685-1696.
- Emmerich,N.P., Nussbaum,A.K., Stevanovic,S., Priemer,M., Toes,R.E., Rammensee,H.G., and Schild,H. (2000). The human 26 S and 20 S proteasomes generate overlapping but different sets of peptide fragments from a model protein substrate. *J. Biol. Chem.* *275*, 21140-21148.
- Fadok,V.A., Bratton,D.L., Rose,D.M., Pearson,A., Ezekewitz,R.A., and Henson,P.M. (2000). A receptor for phosphatidylserine-specific clearance of apoptotic cells. *Nature* *405*, 85-90.
- Falk,K., Rotzschke,O., Stevanovic,S., Jung,G., and Rammensee,H.G. (1991). Allele-specific motifs revealed by sequencing of self-peptides eluted from MHC molecules. *Nature* *351*, 290-296.
- Febbraio,M., Hajjar,D.P., and Silverstein,R.L. (2001). CD36: a class B scavenger receptor involved in angiogenesis, atherosclerosis, inflammation, and lipid metabolism. *J. Clin. Invest* *108*, 785-791.
- Fraser,I.P., Koziel,H., and Ezekowitz,R.A. (1998). The serum mannose-binding protein and the macrophage mannose receptor are pattern recognition molecules that link innate and adaptive immunity. *Semin. Immunol.* *10*, 363-372.
- Geijtenbeek,T.B., Kwon,D.S., Torensma,R., van Vliet,S.J., van Duijnhoven,G.C., Middel,J., Cornelissen,I.L., Nottet,H.S., KewalRamani,V.N., Littman,D.R., Figdor,C.G., and van Kooyk,Y. (2000a). DC-SIGN, a dendritic cell-specific HIV-1-binding protein that enhances trans-infection of T cells. *Cell* *100*, 587-597.
- Geijtenbeek,T.B., Torensma,R., van Vliet,S.J., van Duijnhoven,G.C., Adema,G.J., van Kooyk,Y., and Figdor,C.G. (2000b). Identification of DC-SIGN, a novel dendritic cell-specific ICAM-3 receptor that supports primary immune responses. *Cell* *100*, 575-585.
- Groh,V., Rhinehart,R., Randolph-Habecker,J., Topp,M.S., Riddell,S.R., and Spies,T. (2001). Costimulation of CD8alpha T cells by NKG2D via engagement by MIC induced on virus-infected cells. *Nat. Immunol.* *2*, 255-260.
- Gupta,R.S. (1995). Phylogenetic analysis of the 90 kD heat shock family of protein sequences and an examination of the relationship among animals, plants, and fungi species. *Mol. Biol. Evol.* *12*, 1063-1073.

- Heath,W.R. and Carbone,F.R. (1999). Cytotoxic T lymphocyte activation by cross-priming. *Curr. Opin. Immunol.* *11*, 314-318.
- Heikema,A., Agsteribbe,E., Wilschut,J., and Huckriede,A. (1997). Generation of heat shock protein-based vaccines by intracellular loading of gp96 with antigenic peptides. *Immunol. Lett.* *57*, 69-74.
- Hershko,A. and Ciechanover,A. (1998). The ubiquitin system. *Annu. Rev. Biochem.* *67*, 425-479.
- Herz,J. and Strickland,D.K. (2001). LRP: a multifunctional scavenger and signaling receptor. *J. Clin. Invest* *108*, 779-784.
- Hilf,N., Singh-Jasuja,H., Schwarzmaier,P., Gouttefangeas,C., Rammensee,H.G., and Schild,H. (2002). Human platelets express heat shock protein receptors and regulate dendritic cell maturation. *Blood* *99*, 3676-3682.
- Hoffmann,T.K., Meidenbauer,N., Muller-Berghaus,J., Storkus,W.J., and Whiteside,T.L. (2001). Proinflammatory Cytokines and CD40 Ligand Enhance Cross-Presentation and Cross-Priming Capability of Human Dendritic Cells Internalizing Apoptotic Cancer Cells. *J. Immunother.* *24*, 162-171.
- Hogquist,K.A., Jameson,S.C., Heath,W.R., Howard,J.L., Bevan,M.J., and Carbone,F.R. (1994). T cell receptor antagonist peptides induce positive selection. *Cell* *76*, 17-27.
- Hozumi,N. and Tonegawa,S. (1976). Evidence for somatic rearrangement of immunoglobulin genes coding for variable and constant regions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *73*, 3628-3632.
- Huang,A.Y., Bruce,A.T., Pardoll,D.M., and Levitsky,H.I. (1996). In vivo cross-priming of MHC class I-restricted antigens requires the TAP transporter. *Immunity.* *4*, 349-355.
- Huang,A.Y., Golumbek,P., Ahmadzadeh,M., Jaffee,E., Pardoll,D., and Levitsky,H. (1994). Role of bone marrow-derived cells in presenting MHC class I-restricted tumor antigens. *Science* *264*, 961-965.
- Inaba,K., Inaba,M., Romani,N., Aya,H., Deguchi,M., Ikehara,S., Muramatsu,S., and Steinman,R.M. (1992). Generation of large numbers of dendritic cells from mouse bone marrow cultures supplemented with granulocyte/macrophage colony-stimulating factor. *J Exp Med* *176*, 1693-1702.
- Jinushi,M., Takehara,T., Kanto,T., Tatsumi,T., Groh,V., Spies,T., Miyagi,T., Suzuki,T., Sasaki,Y., and Hayashi,N. (2003). Critical Role of MHC Class I-Related Chain A and B Expression on IFN-alpha-Stimulated Dendritic Cells in NK Cell Activation: Impairment in Chronic Hepatitis C Virus Infection. *J. Immunol.* *170*, 1249-1256.
- Jondal,M., Schirmbeck,R., and Reimann,J. (1996). MHC class I-restricted CTL responses to exogenous antigens. *Immunity.* *5*, 295-302.

- Kasahara,M., Watanabe,Y., Sumasu,M., and Nagata,T. (2002). A family of MHC class I-like genes located in the vicinity of the mouse leukocyte receptor complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 99, 13687-13692.
- Ke,Y. and Kapp,J.A. (1996). Exogenous antigens gain access to the major histocompatibility complex class I processing pathway in B cells by receptor-mediated uptake. *J. Exp. Med.* 184, 1179-1184.
- Klein,J. and Sato,A. (2000). The HLA system. First of two parts. *N. Engl. J. Med.* 343, 702-709.
- Kotera,Y., Shimizu,K., and Mule,J.J. (2001). Comparative analysis of necrotic and apoptotic tumor cells as a source of antigen(s) in dendritic cell-based immunization. *Cancer Res.* 61, 8105-8109.
- Kugler,A., Stuhler,G., Walden,P., Zoller,G., Zobywalski,A., Brossart,P., Trefzer,U., Ullrich,S., Muller,C.A., Becker,V., Gross,A.J., Hemmerlein,B., Kanz,L., Muller,G.A., and Ringert,R.H. (2000). Regression of human metastatic renal cell carcinoma after vaccination with tumor cell-dendritic cell hybrids. *Nat. Med.* 6, 332-336.
- Kurts,C., Cannarile,M., Klebba,I., and Brocker,T. (2001). Dendritic cells are sufficient to cross-present self-antigens to CD8 T cells in vivo. *J. Immunol.* 166, 1439-1442.
- Kurts,C., Heath,W.R., Carbone,F.R., Kosaka,H., and Miller,J.F. (1998a). Cross-presentation of self antigens to CD8+ T cells: the balance between tolerance and autoimmunity. *Novartis. Found. Symp.* 215, 172-181.
- Kurts,C., Heath,W.R., Kosaka,H., Miller,J.F., and Carbone,F.R. (1998b). The peripheral deletion of autoreactive CD8+ T cells induced by cross-presentation of self-antigens involves signaling through CD95 (Fas, Apo-1). *J. Exp. Med.* 188, 415-420.
- Kurts,C., Kosaka,H., Carbone,F.R., Miller,J.F., and Heath,W.R. (1997). Class I-restricted cross-presentation of exogenous self-antigens leads to deletion of autoreactive CD8(+) T cells. *J. Exp. Med.* 186, 239-245.
- Lammert,E., Arnold,D., Nijenhuis,M., Momburg,F., Hammerling,G.J., Brunner,J., Stevanovic,S., Rammensee,H.G., and Schild,H. (1997). The endoplasmic reticulum-resident stress protein gp96 binds peptides translocated by TAP. *Eur. J. Immunol.* 27, 923-927.
- Lammert,E., Arnold,D., Rammensee,H.G., and Schild,H. (1996). Expression levels of stress protein gp96 are not limiting for major histocompatibility complex class I-restricted antigen presentation. *Eur. J. Immunol.* 26, 875-879.
- Linderoth,N.A., Popowicz,A., and Sastry,S. (2000). Identification of the peptide-binding site in the heat shock chaperone/tumor rejection antigen gp96 (Grp94). *J. Biol. Chem.* 275, 5472-5477.
- McMurray,H.R., Nguyen,D., Westbrook,T.F., and McAnce,D.J. (2001). Biology of human papillomaviruses. *Int. J. Exp. Pathol.* 82, 15-33.

- Menoret,A., Li,Z., Niswonger,M.L., Altmeyer,A., and Srivastava,P.K. (2001). An endoplasmic reticulum protein implicated in chaperoning peptides to major histocompatibility of class I is an aminopeptidase. *J. Biol. Chem.* 276, 33313-33318.
- Montoya,M.C., Sancho,D., Bonello,G., Collette,Y., Langlet,C., He,H.T., Aparicio,P., Alcover,A., Olive,D., and Sanchez-Madrid,F. (2002). Role of ICAM-3 in the initial interaction of T lymphocytes and APCs. *Nat. Immunol.* 3, 159-168.
- Neefjes,J. (1999). CIIV, MIIC and other compartments for MHC class II loading. *Eur. J. Immunol.* 29, 1421-1425.
- Nieland,T.J., Tan,M.C., Monne-van Muijen,M., Koning,F., Kruisbeek,A.M., and van Bleek,G.M. (1996). Isolation of an immunodominant viral peptide that is endogenously bound to the stress protein GP96/GRP94. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 93, 6135-6139.
- Norbury,C.C., Chambers,B.J., Prescott,A.R., Ljunggren,H.G., and Watts,C. (1997). Constitutive macropinocytosis allows TAP-dependent major histocompatibility complex class I presentation of exogenous soluble antigen by bone marrow-derived dendritic cells. *Eur. J. Immunol.* 27, 280-288.
- Norbury,C.C., Hewlett,L.J., Prescott,A.R., Shastri,N., and Watts,C. (1995). Class I MHC presentation of exogenous soluble antigen via macropinocytosis in bone marrow macrophages. *Immunity.* 3, 783-791.
- Pamer,E. and Cresswell,P. (1998). Mechanisms of MHC class I--restricted antigen processing. *Annu. Rev. Immunol.* 16, 323-358.
- Panjwani,N.N., Popova,L., and Srivastava,P.K. (2002). Heat shock proteins gp96 and hsp70 activate the release of nitric oxide by APCs. *J. Immunol.* 168, 2997-3003.
- Pooley,J.L., Heath,W.R., and Shortman,K. (2001). Cutting edge: intravenous soluble antigen is presented to CD4 T cells by CD8- dendritic cells, but cross-presented to CD8 T cells by CD8+ dendritic cells. *J. Immunol.* 166, 5327-5330.
- Powis,S.J., Young,L.L., Joly,E., Barker,P.J., Richardson,L., Brandt,R.P., Melief,C.J., Howard,J.C., and Butcher,G.W. (1996). The rat cim effect: TAP allele-dependent changes in a class I MHC anchor motif and evidence against C-terminal trimming of peptides in the ER. *Immunity.* 4, 159-165.
- Prodromou,C., Roe,S.M., Piper,P.W., and Pearl,L.H. (1997). A molecular clamp in the crystal structure of the N-terminal domain of the yeast Hsp90 chaperone. *Nat. Struct. Biol.* 4, 477-482.
- Qu,D., Mazzarella,R.A., and Green,M. (1994). Analysis of the structure and synthesis of GRP94, an abundant stress protein of the endoplasmic reticulum. *DNA Cell Biol.* 13, 117-124.
- Radsak,M.P., Hilf,N., Singh-Jasuja,H., Braedel,S., Brossart,P., Rammensee,H.G., and Schild,H. (2003). The heat shock protein Gp96 binds to human neutrophils and monocytes and stimulates effector functions. *Blood* 101, 2810-2815.

Rammensee,H.G. (1995). Chemistry of peptides associated with MHC class I and class II molecules. *Curr. Opin. Immunol.* 7, 85-96.

Rammensee,H.G., Robinson,P.J., Crisanti,A., and Bevan,M.J. (1986). Restricted recognition of beta 2-microglobulin by cytotoxic T lymphocytes. *Nature* 319, 502-504.

Reits,E.A., Vos,J.C., Gromme,M., and Neefjes,J. (2000). The major substrates for TAP in vivo are derived from newly synthesized proteins. *Nature* 404, 774-778.

Ressing,M.E., Sette,A., Brandt,R.M., Ruppert,J., Wentworth,P.A., Hartman,M., Oseroff,C., Grey,H.M., Melief,C.J., and Kast,W.M. (1995). Human CTL epitopes encoded by human papillomavirus type 16 E6 and E7 identified through in vivo and in vitro immunogenicity studies of HLA-A*0201-binding peptides. *J. Immunol.* 154, 5934-5943.

Robert,J., Menoret,A., and Cohen,N. (1999). Cell surface expression of the endoplasmic reticular heat shock protein gp96 is phylogenetically conserved. *J. Immunol.* 163, 4133-4139.

Rock,K.L. (1996). A new foreign policy: MHC class I molecules monitor the outside world. *Immunol. Today* 17, 131-137.

Rock,K.L., Gamble,S., and Rothstein,L. (1990). Presentation of exogenous antigen with class I major histocompatibility complex molecules. *Science* 249, 918-921.

Rock,K.L. and Goldberg,A.L. (1999). Degradation of cell proteins and the generation of MHC class I-presented peptides. *Annu. Rev. Immunol.* 17, 739-779.

Rodriguez,A., Regnault,A., Kleijmeer,M., Ricciardi-Castagnoli,P., and Amigorena,S. (1999). Selective transport of internalized antigens to the cytosol for MHC class I presentation in dendritic cells. *Nat. Cell Biol.* 1, 362-368.

Russo,V., Tanzarella,S., Dalerba,P., Rigatti,D., Rovere,P., Villa,A., Bordignon,C., and Traversari,C. (2000). Dendritic cells acquire the MAGE-3 human tumor antigen from apoptotic cells and induce a class I-restricted T cell response. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 97, 2185-2190.

Salih,H.R., Rammensee,H.G., and Steinle,A. (2002). Cutting edge: down-regulation of MICA on human tumors by proteolytic shedding. *J. Immunol.* 169, 4098-4102.

Sauter,B., Albert,M.L., Francisco,L., Larsson,M., Somersan,S., and Bhardwaj,N. (2000). Consequences of cell death: exposure to necrotic tumor cells, but not primary tissue cells or apoptotic cells, induces the maturation of immunostimulatory dendritic cells. *J. Exp. Med.* 191, 423-434.

Schild,H., Arnold-Schild,D., Lammert,E., and Rammensee,H.G. (1999). Stress proteins and immunity mediated by cytotoxic T lymphocytes. *Curr Opin Immunol* 11, 109-113.

Schild,H. and Rammensee,H.G. (2000a). gp96--the immune system's Swiss army knife. *Nat. Immunol.* 1, 100-101.

- Schild,H. and Rammensee,H.G. (2000b). Perfect use of imperfection. *Nature* 404, 709-710.
- Schoenberger,S.P., Toes,R.E., van der Voort,E.I., Offringa,R., and Melief,C.J. (1998). T-cell help for cytotoxic T lymphocytes is mediated by CD40-CD40L interactions. *Nature* 393, 480-483.
- Schubert,U., Anton,L.C., Gibbs,J., Norbury,C.C., Yewdell,J.W., and Bennink,J.R. (2000). Rapid degradation of a large fraction of newly synthesized proteins by proteasomes. *Nature* 404, 770-774.
- Schwartz,J.C., Zhang,X., Nathenson,S.G., and Almo,S.C. (2002). Structural mechanisms of costimulation. *Nat. Immunol.* 3, 427-434.
- Sigal,L.J., Crotty,S., Andino,R., and Rock,K.L. (1999). Cytotoxic T-cell immunity to virus-infected non-haematopoietic cells requires presentation of exogenous antigen. *Nature* 398, 77-80.
- Singh-Jasuja,H., Hilf,N., Arnold-Schild,D., and Schild,H. (2001). The role of heat shock proteins and their receptors in the activation of the immune system. *Biol. Chem.* 382, 629-636.
- Singh-Jasuja,H., Scherer,H.U., Hilf,N., Arnold-Schild,D., Rammensee,H.G., Toes,R.E., and Schild,H. (2000a). The heat shock protein gp96 induces maturation of dendritic cells and down-regulation of its receptor. *Eur. J. Immunol.* 30, 2211-2215.
- Singh-Jasuja,H., Toes,R.E., Spee,P., Munz,C., Hilf,N., Schoenberger,S.P., Ricciardi-Castagnoli,P., Neefjes,J., Rammensee,H.G., Arnold-Schild,D., and Schild,H. (2000b). Cross-presentation of glycoprotein 96-associated antigens on major histocompatibility complex class I molecules requires receptor-mediated endocytosis. *J. Exp. Med.* 191, 1965-1974.
- Somersan,S., Larsson,M., Fonteneau,J.F., Basu,S., Srivastava,P., and Bhardwaj,N. (2001). Primary tumor tissue lysates are enriched in heat shock proteins and induce the maturation of human dendritic cells. *J. Immunol.* 167, 4844-4852.
- Spee,P. and Neefjes,J. (1997). TAP-translocated peptides specifically bind proteins in the endoplasmic reticulum, including gp96, protein disulfide isomerase and calreticulin. *Eur. J. Immunol.* 27, 2441-2449.
- Speiser,D.E., Zurcher,T., Ramseier,H., Hengartner,H., Staeheli,P., Haller,O., and Zinkernagel,R.M. (1990). Nuclear myxovirus-resistance protein Mx is a minor histocompatibility antigen. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 87, 2021-2025.
- Srivastava,P. (2002). Roles of heat-shock proteins in innate and adaptive immunity. *Nat. Rev. Immunol.* 2, 185-194.
- Srivastava,P.K. and Maki,R.G. (1991). Stress-induced proteins in immune response to cancer. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 167, 109-123.

- Srivastava,P.K., Menoret,A., Basu,S., Binder,R.J., and McQuade,K.L. (1998). Heat shock proteins come of age: primitive functions acquire new roles in an adaptive world. *Immunity* 8, 657-665.
- Srivastava,P.K., Udono,H., Blachere,N.E., and Li,Z. (1994). Heat shock proteins transfer peptides during antigen processing and CTL priming. *Immunogenetics* 39, 93-98.
- Staerz,U.D., Karasuyama,H., and Garner,A.M. (1987). Cytotoxic T lymphocytes against a soluble protein. *Nature* 329, 449-451.
- Steinle,A., Li,P., Morris,D.L., Groh,V., Lanier,L.L., Strong,R.K., and Spies,T. (2001). Interactions of human NKG2D with its ligands MICA, MICB, and homologs of the mouse RAE-1 protein family. *Immunogenetics* 53, 279-287.
- Steinman,R.M. (2000). DC-SIGN: a guide to some mysteries of dendritic cells. *Cell* 100, 491-494.
- Steinman,R.M., Lustig,D.S., and Cohn,Z.A. (1974). Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. 3. Functional properties in vivo. *J. Exp. Med.* 139, 1431-1445.
- Steinman,R.M., Turley,S., Mellman,I., and Inaba,K. (2000). The induction of tolerance by dendritic cells that have captured apoptotic cells. *J. Exp. Med.* 191, 411-416.
- Tamura,Y., Peng,P., Liu,K., Daou,M., and Srivastava,P.K. (1997). Immunotherapy of tumors with autologous tumor-derived heat shock protein preparations. *Science* 278, 117-120.
- Todryk,S., Melcher,A.A., Hardwick,N., Linardakis,E., Bateman,A., Colombo,M.P., Stoppacciaro,A., and Vile,R.G. (1999). Heat shock protein 70 induced during tumor cell killing induces Th1 cytokines and targets immature dendritic cell precursors to enhance antigen uptake. *J. Immunol.* 163, 1398-1408.
- Toes,R.E., Nussbaum,A.K., Degermann,S., Schirle,M., Emmerich,N.P., Kraft,M., Laplace,C., Zwinderman,A., Dick,T.P., Muller,J., Schonfisch,B., Schmid,C., Fehling,H.J., Stevanovic,S., Rammensee,H.G., and Schild,H. (2001). Discrete cleavage motifs of constitutive and immunoproteasomes revealed by quantitative analysis of cleavage products. *J. Exp. Med.* 194, 1-12.
- Udono,H., Levey,D.L., and Srivastava,P.K. (1994). Cellular requirements for tumor-specific immunity elicited by heat shock proteins: tumor rejection antigen gp96 primes CD8+ T cells in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 91, 3077-3081.
- Udono,H. and Srivastava,P.K. (1993). Heat shock protein 70-associated peptides elicit specific cancer immunity. *J. Exp. Med.* 178, 1391-1396.

Vabulas,R.M., Ahmad-Nejad,P., Da Costa,C., Miethke,T., Kirschning,C.J., Hacker,H., and Wagner,H. (2001). Endocytosed HSP60s use toll-like receptor 2 (TLR2) and TLR4 to activate the toll/interleukin-1 receptor signaling pathway in innate immune cells. *J. Biol. Chem.* 276, 31332-31339.

Vabulas,R.M., Ahmad-Nejad,P., Ghose,S., Kirschning,C.J., Issels,R.D., and Wagner,H. (2002a). HSP70 as endogenous stimulus of the Toll/interleukin-1 receptor signal pathway. *J. Biol. Chem.* 277, 15107-15112.

Vabulas,R.M., Braedel,S., Hilf,N., Singh-Jasuja,H., Herter,S., Ahmad-Nejad,P., Kirschning,C.J., Da Costa,C., Rammensee,H.G., Wagner,H., and Schild,H. (2002b). The endoplasmic reticulum-resident heat shock protein Gp96 activates dendritic cells via the Toll-like receptor 2/4 pathway. *J. Biol. Chem.* 277, 20847-20853.

Vabulas,R.M., Wagner,H., and Schild,H. (2002c). Heat shock proteins as ligands of toll-like receptors. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 270, 169-184.

Wagner,H. (2001). Toll meets bacterial CpG-DNA. *Immunity.* 14, 499-502.

Wallny,H.J. and Rammensee,H.G. (1990). Identification of classical minor histocompatibility antigen as cell-derived peptide. *Nature* 343, 275-278.

Wassenberg,J.J., Dezfulian,C., and Nicchitta,C.V. (1999). Receptor mediated and fluid phase pathways for internalization of the ER Hsp90 chaperone GRP94 in murine macrophages. *J Cell Sci* 112, 2167-2175.

Watts,C. (1997). Capture and processing of exogenous antigens for presentation on MHC molecules. *Annu. Rev. Immunol.* 15, 821-850.

Weston,S.A. and Parish,C.R. (1990). New fluorescent dyes for lymphocyte migration studies. Analysis by flow cytometry and fluorescence microscopy. *J. Immunol. Methods* 133, 87-97.

Zheng,H., Dai,J., Stoilova,D., and Li,Z. (2001). Cell surface targeting of heat shock protein gp96 induces dendritic cell maturation and antitumor immunity. *J. Immunol.* 167, 6731-6735.

6. Danksagung

Zunächst möchte ich meinem Doktorvater Prof. Dr. Rammensee danken, dass er mich in sein Institut aufgenommen hat und ein stets offenes Ohr für alle Fragen und Probleme hatte. Es hat sehr viel Freude gemacht, unter seiner Leitung zu arbeiten.

Danken möchte ich auch meinem Betreuer PD Dr. Hansjörg Schild, dem ich das Projekt verdanke. Ich wurde von ihm ausgezeichnet betreut, geduldig hat er immer alle meine Fragen beantwortet und für ein ausgezeichnetes Klima in seiner Arbeitsgruppe gesorgt.

Einer Person möchte ich besonders danken, nämlich Dr. Harpreet Singh-Jasuja; denn ohne ihn wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen. Ich durfte nicht nur von seinem hervorragenden Wissen profitieren, sondern er verstand es auch, in mir ein Interesse für wissenschaftliche Fragestellungen und ein Verständnis für wissenschaftliches Denken zu wecken. Ganz nebenbei hat es auch noch sehr großen Spaß gemacht, mit ihm zusammenzuarbeiten.

Mein Dank gilt auch Dr. Alexander Steinle für die gute Zusammenarbeit und seine unermüdliche Diskussionsbereitschaft.

Für das außergewöhnlich gute Arbeitsklima bin ich der ganzen Hitzeschockgruppe mit großem Dank verbunden. Es herrschte stets eine Bereitschaft zur Diskussion und Hilfestellung, das Verhältnis war immer kameradschaftlich. Dafür herzlichen Dank an Sibylla Braedel, Patrice Decker, Sylvia Herter, Norbert Hilf, Matthias Hofmann, Claudia Schmid und Petra Schwarzmeier. Besonders nennen möchte ich hierbei Matthias Hofmann für seine geduldige Hilfe beim Mäuse i.v. spritzen, auch wenn ich mich in der Zeit regelmäßig verschätzt habe.

Aber ich möchte mich auch bei der gesamten Arbeitsgruppe bedanken, beim Raum „3.010“ für das wohltuende Arbeitsklima, und besonders bei Beate Pömmerl, dem guten Geist des Hauses, die bei allen kleineren und größeren Problemen immer Hilfe wusste, sowie bei Claudia Falkenburger und Franziska Löwenstein.

6. Danksagung

Dank gilt auch dem Graduiertenkolleg „Zellbiologische Mechanismen immunassoziierter Prozesse“ und dem Sonderforschungsbereich 510 der Universität Tübingen für die finanzielle Unterstützung meiner Arbeit.

Ich hoffe, ich habe niemanden vergessen. Es war für mich eine sehr schöne, wichtige und auch sehr prägende Zeit.

Besonderer Dank gilt auch meinem Vater für das Korrekturlesen und sein Interesse an meiner Arbeit.

7. Lebenslauf

Nachname: Haager
Vornamen: Sabina Maria
Geburtsdatum: 20. Oktober 1975
Geburtsort: München
Familienstand: ledig

SCHULISCHE AUSBILDUNG

1982-1986 Grundschole, Ebersberg
1986-1995 Gerhardinger Gymnasium, München
Juni 1995 Abitur

UNIVERSITÄRE AUSBILDUNG

1995-1996 Jura-Studium, Ludwig-Maximilians-Universität, München
1996 Beginn des Medizinstudiums, Ludwig-Maximilians-Universität, München
1998 Ärztliche Vorprüfung
1998 Aufnahme in die Begabtenförderung des Cusanuswerks
1999 1. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
2000 1. Teil des amerikanischen Staatsexamens (USMLE Step 1)
2000 Forschungsarbeit in der Abteilung für klinische Pharmakologie, Medizinische Klinik, Ludwig-Maximilians-Universität, München
2001 Wechsel an die Eberhard Karls Universität, Tübingen

- 2001-2003 Dissertation am Interfakultären Institut für Zellbiologie, Abteilung Immunologie, Eberhard Karls Universität Tübingen, unter Prof. Dr. Hans-Georg Rammensee und PD Dr. Hansjörg Schild
Thema: “Aktivierung von T-Zellen durch Glykoprotein 96-gereifte Dendritische Zellen“
- 2002 Stipendiatin des Graduiertenkollegs „Zellbiologische Mechanismen immunassoziierter Prozesse“
- 2003 2. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
- 2004 3. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung, Abschluss des Medizinstudiums

Publikationen:

Haager S, Singh-Jasuja H, Warger T, Hofmann M, Braedel-Ruoff S, Hilf N, Wiemann K, Rammensee HG, Schild H. (2004)

Glycoprotein 96-activated dendritic cells induce a CD8-biased T-cell response

(zur Publikation eingereicht)

Decker P, Singh-Jasuja H, Haager S, Kötter I, Rammensee HG. (2004)

Nucleosomes, the main lupus autoantigen, induce dendritic cell activation via a MyD88-independent pathway and may favour inflammation in systemic lupus erythematosus

(zur Publikation eingereicht)