

Ich erkläre hiermit, dass ich die der Medizinischen Fakultät der Universität Tübingen zur Promotion eingereichte Arbeit mit dem Titel:

„Aufnahmemechanismus von Hitzeschockprotein:Antigen-Komplexen bei der MHC II-vermittelten T-Zellreaktion“

selbständig und ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der ausdrücklich bezeichneten Quellen und Hilfsmittel angefertigt habe. Wörtlich oder inhaltlich übernommene Stellen wurden als solche kenntlich gemacht.

Ich versichere an Eides statt, dass diese Angaben wahr sind und dass ich nichts verschwiegen habe. Mir ist bekannt, dass die falsche Abgabe einer Versicherung an Eides statt mit einer Freiheitsstrafe bis zu drei Jahren oder mit einer Geldstrafe bestraft wird.

Bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskriptes habe ich Unterstützungsleistungen von folgenden Personen erhalten:

1. Dr. med. Ursula Holzer, Universitäts-Kinderklinik Tübingen
2. Dr. rer.nat. Markus Haug

Die vorgelegte Dissertation wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form in einem anderen Promotionsverfahren vorgelegt. Bei einer anderen Hochschule wurde bislang kein Promotionsverfahren oder entsprechendes Prüfungsverfahren beantragt. Den Grad eines Dr. med. habe ich noch nicht erworben.

Mir ist bekannt, dass falsche oder unvollständige Angaben zur Folge haben können, dass die Fakultät ein Verfahren zur Entziehung eines eventuell verliehenen akademischen Titels einleitet.

Die Gelegenheit zum vorliegenden Promotionsverfahren wurde nicht kommerziell vermittelt, insbesondere habe ich keine Organisation eingeschalten, die gegen Entgelt Betreuer für die Anfertigung von Dissertationen sucht oder die für mich die mir obliegenden Pflichten hinsichtlich der Prüfungsleistungen ganz oder teilweise erledigt

Ich bestätige des Weiteren, dass mir die Rechtsfolge der Inanspruchnahme eines gewerblichen Promotionsvermittlers und die Rechtsfolge bei

Unwahrhaftigkeiten in dieser Erklärung (Ausschluss der Annahme als Doktorand, Ausschluss der Zulassung zum Promotionsverfahren, Abbruch des Promotionsverfahrens und Rücknahme des erlangten Grades wegen Täuschung gemäß § 13) bekannt sind.

Es laufen keinerlei Strafverfahren gegen mich.

Tübingen, den 17.02.2012

Irena Straub

Aus der Universitätsklinik für Kinder- und Jugendmedizin

Tübingen

Abteilung Kinderheilkunde I mit Poliklinik

**(Schwerpunkt: Allgemeine Pädiatrie, Hämatologie und
Onkologie)**

Ärztlicher Direktor: Professor Dr. Handgretinger

**Aufnahmemechanismus von
Hitzeschockprotein:Antigen-Komplexen bei der MHC II-
vermittelten T-Zellreaktion**

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

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

vorgelegt von

Irena Charlotte Straub

aus Göppingen

2012

Dekan: Professor Dr. I. B. Autenrieth

1. Berichterstatter: Professor Dr. G. E. Dannecker

2. Berichterstatter: Privatdozent Dr. W. Bethge

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	8
1 Einleitung.....	10
1.1 Die Immunantwort.....	10
1.2 Endozytose	12
1.2.1 Aufnahmemechanismen	12
1.3 Antigenpräsentation	14
1.3.1 Antigen-Präsentierende Zellen (APZs)	14
1.3.2 MHC-Moleküle	15
1.3.3 HLA-DR	17
1.3.4 HLA-DM.....	18
1.4 T-Zellen.....	18
1.4.1 T-Zellrezeptor (TZR)	19
1.4.2 Effektor-T-Zellen	20
1.5 Hitzeschockproteine.....	21
1.5.1 Hitzeschockproteine und Immunität.....	22
1.5.2 HSP70	23
1.5.3 Hitzeschockproteine und MHC-Moleküle	24
1.6 HSP-Rezeptoren.....	24
1.6.1 CD91.....	25
1.7 Ausgangspunkt und Zielsetzung	26
2. Material und Methoden.....	29
2.1 Material	29
2.1.2 Software.....	29
2.1.3 Verbrauchsmaterialien	30
2.1.4 Puffer	30
2.1.5 Reagenzien und Medien.....	31
2.1.6 Proteine	32
2.1.7 Peptide.....	32
2.1.8 Antikörper	32
2.1.8.1 Fluoreszenzmarkierte monoklonale Antikörper.....	32

2.1.9 Zelllinien.....	33
2.2.1 Isolierung mononukleärer Zellen.....	33
2.2.2 Isolierung von CD4 ⁺ T-Zellen.....	34
2.2.4 Zellkultur	35
2.2.5 Gewinnung von humanem Serum.....	35
2.2.6 Generierung dendritischer Zellen.....	36
2.2.7 Bestimmung von Zellzahl und Zellvitalität	36
2.2.8 T-Zellproliferationsversuche.....	37
2.2.9 Herstellung der antigenen Peptide.....	38
2.2.9.1 Herstellung der Hsp70:Peptid-Komplexe	38
2.2.10 Färbungen.....	39
2.2.10.1 CFSE-Färbung.....	39
2.2.10.2 Färbung mit fluoreszierenden Antikörpern	40
2.2.10.3 HLA-DR-Tetramere.....	41
2.2.11 Durchflusszytometrie.....	42
2.2.12 Fluoreszenzmikroskopie	43
3 Ergebnisse	45
3.1 Detektion spezifischer T-Zellproliferation in einem humanen System..	45
3.1.2 Einfluss von Hsp70 auf die T-Zellproliferation	48
3.2 Hsp70 verstärkt die CD4 ⁺ T-Zellstimulation mit ganzem Tetanusprotein	50
3.3.2 Endozytoseuntersuchung bei verschiedenen Temperaturen	58
3.4 chemische Endozytoseinhibitoren.....	60
3.4.1 Zellmembranfixierung durch Paraformaldehyd	61
3.4.2 Inhibition von Zellteilung und zytoskelettalem Rearrangement	62
3.5 Hemmung tyrosinabhängiger Proteinkinasen und der endosomalen Proteolyse	64
3.5.1 Tyrosinkinaseinhibition durch Genistein.....	64
3.5.2 Prozessierungshemmung mittels Chloroquine.....	64
3.5.3 Cytochalasin D.....	67
3.6 Blockade des potentiellen Hsp70-Rezeptors CD91 durch anti-CD91	69
3.7 HLA-DM	71
4 Diskussion	73
4.1 Einfluss von Hsp auf die CD4 ⁺ T-Zellproliferation	73

4.2 Proliferationsversuche mit ganzem Protein.....	74
4.4 Untersuchung des Endozytosemechanismus mit FITC-Peptiden	75
4.6 Untersuchung des möglichen Aufnahmerezeptors	78
4.7 Kann Hsp70 die Funktion von HLA-DM übernehmen?	80
4.8 Gesamtbeurteilung und zusammenfassender Ausblick	81
Zusammenfassung.....	83
5 Literaturverzeichnis	85

Abkürzungsverzeichnis

Abb	Abbildung
Ag	Antigen
Ak	Antikörper
APZ	Antigen präsentierende Zelle
ATP	Adenosin-Triphosphat
B-LCL	B-lymphoblastoid cell line
BSA	bovine serum albumine
CD	cluster of differentiation
CFSE	5(6)-Carboxyfluorescein di-acetate N-succinimidyl ester
CLIP	class II associated invariant chain peptide
CMV	Cytomegalievirus
cps	counts per second
CytD	Cytochalasin D
DC	Dendritische Zelle
DMSO	Dimethylsulfoxid
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EBV	Epstein-Barr Virus
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ER	Endoplasmatisches Retikulum
FACS	fluorescence-activated cell scanning
FCS	fetales Kälberserum
FSC	forward-scatter (Vorwärtsstreulicht im Durchflußzytometer)
GM-CSF	Colony-stimulating Factor
HA	Hämagglutinin
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl) 1-piperacinehansulfonsäure
HLA	human leukocyte antigen
HSA	humanes Serumalbumin
Hsc 70	konstitutiv exprimiertes, zytosolisches HSP70-Molekül
HSP	Hitzeschockprotein
Hsp70	cytosolisches Hsp-Molekül der 70kDa HSP-Familie
Ig	Immunglobulin

IHW	international histocompatibility workshop
IL	Interleukin
JIA	Juvenile idiopathische Arthritis
kDa	Kilodalton
Ii	invariant chain
LPS	Lipopolysaccharid
M	Molar
MACS	Magnetic cell sorting
mAk	monoklonaler Antikörper
MHC	major histocompatibility complex
PBMC	peripheral blood mononuclear cells
PBS	phosphate-buffered saline
PE	Phycoerythrin
PHA	Phytohämagglutinin
PHS	pooled human serum
RT	Raumtemperatur
SA	Streptavidin
SSC	side-scatter (Seitwärtsstreulicht im Durchflußzytometer)
Tab	Tabelle
TAP	transporter associated with antigen processing
TZR	T-Zellrezeptor
Th-Zellen	T-Helferzellen
TLR	Toll-like Rezeptor
TT	Tetanus-Toxin

1 Einleitung

1.1 Die Immunantwort

Zum Schutz vor Infektionen mit Bakterien, Viren, Pilzen, Proteinen oder Parasiten, aber auch dem unkontrollierten Wachstum körpereigener Zellen wirken in unserem Körper zelluläre und humorale Komponenten eng zusammen. Die im Blut und lymphatischen System zirkulierenden Leukozyten ebenso wie die in diesen Flüssigkeiten gelösten Moleküle wie Antikörper, Cytokin und Chemokine oder die Enzyme des Komplementsystems bilden ein angeborenes natürliches Abwehrsystem sowie ein ergänzendes, im Laufe des Lebens erworbenes adaptives Immunsystem. Diese Systeme unterscheiden infektiöse, nicht-körpereigene bzw. körpereigene, entartete Zellen von nicht-infektiösen, körpereigenen Zellen anhand antigener Strukturen und lösen gegebenenfalls eine Immunantwort aus.

Zur angeborenen Immunität zählt man die entwicklungsgeschichtlich älteren, universellen Abwehrmechanismen wie z. B. die Oberflächenepithelien des Körpers oder, nach Eindringen eines Erregers, die Phagozytose durch Makrophagen und neutrophile Granulozyten sowie Einleitung der Apoptose infizierter Körperzellen durch Natürliche Killer (NK)-Zellen (1). Dieses System der ersten, schnellen Abwehr besitzt keine Gedächtnisfunktion, bietet also keinen Schutz vor Reinfektionen.

Kann durch die bisher beschriebenen Mechanismen eine Infektion nicht suffizient bekämpft werden, setzt bei Vertebraten das adaptive Immunsystem ein. Dies zeichnet sich durch eine große Spezifität mittels Generierung variabler Rezeptoren aus, was ein spezifisches Erkennen von Fremdantigenen und eine variable Reaktion auf diese ermöglicht, sowie ein immunologisches Gedächtnis. Die klonale Selektion von im Knochenmark gereiften B-Lymphozyten mit hochspezifischen Immunglobulinmolekülen als Rezeptoren bietet die Möglichkeit, nahezu jedes fremde Antigen anhand von Details molekularer Strukturen als solches zu erkennen (2, 3). Der genetische Mechanismus der somatischen Rekombination reguliert hierbei Entstehung und klonale Verteilung

des Rezeptorrepertoires und durch die Anwesenheit mehrerer Millionen unterschiedlicher Lymphozyten wird eine hohe Diversität gewährt.

Nach ihrer Aktivierung durch ein aufgenommenes Antigen prozessieren die B-Zellen dieses und präsentieren es als Peptidfragmente an im Thymus gereifte T-Zellen. Die Interaktion am T-Zellrezeptor (TZR) führt zur klonalen Expansion. Die B-Lymphozyten können dabei zu Gedächtniszellen oder Plasmazellen differenzieren. Letztere sezernieren als humorale Komponente ergänzend zum auch hier wirkenden Komplementsystem und Chemokinen (4, 5) spezifische, gegen das extrazelluläre Antigen gerichtete Immunglobuline, die als Antikörper (Ak) bezeichnet werden.

Durch Präsentation antigener Peptidfragmente durch die professionellen Antigen präsentierenden Zellen (APZs) an naive T-Lymphozyten kommt es im Thymus zum Priming und es erfolgt eine Aktivierung und Differenzierung zu $CD4^+$ und $CD8^+$ T-Effektorzellen (6). $CD4^+$ T-Zellen differenzieren zu Leukozyten-aktivierenden $CD4^+$ T-Helferzellen (Th-Zellen), $CD8^+$ T-Zellen zu zytotoxischen T-Zellen, die infizierte Zielzellen abtöten. Ein kleinerer Teil differenziert außerdem zu Gedächtniszellen (wie auch ein Teil aktivierter B-Lymphozyten), die bei einem weiteren Kontakt mit diesem Antigen eine schnellere und verstärkte Immunantwort auslösen und den Organismus so vor der wiederholten Infektion schützen.

Eine besondere Herausforderung an die Natur ist bei alledem die Ausgewogenheit zwischen adäquater Abwehr fremder Eindringlinge und der Akzeptanz der körpereigenen Zellen und Moleküle, so dass gegen diese keine Immunreaktion erfolgt. Diese immunologische Selbsttoleranz wird durch komplexe Regulations- und Selektionsmechanismen (7) geleistet. Dennoch kommen immer wieder Fehlregulierungen vor, besonders beim adaptiven Immunsystem in der Selbst-, Nichtselbstdiskriminierung. So kann eine verminderte Aktivität in einer Infektanfälligkeit oder einem Tumorwachstum resultieren, wohingegen bei einer überschießenden Immunreaktion die Abwehrmechanismen gegen harmlose Strukturen oder körpereigene Bestandteile (Autoantigene) gerichtet werden. Dies kann dann zu Allergien oder Autoimmunkrankheiten führen. Die oben beschriebenen Mechanismen der

schützenden Immunität führen dann, wie auch bei Abstoßung eines Transplantates, zu einer Gewebeschädigung (8).

1.2 Endozytose

Der entscheidende Schritt zur Auslösung einer Immunreaktion ist die Präsentation potentiell gefährlicher Strukturen, der Antigene, an der Zelloberfläche von APZs.

Da die aus Phospholipiden bestehende Biomembran jedoch nur für Gase und sehr kleine hydrophobe Moleküle durchlässig ist, müssen extrazelluläre Antigene, die geladen und somit hydrophil sind, auf anderem Weg in die APZ gelangen. Dies geschieht vorzugsweise durch einen endozytotischen Prozess. Eine Ausnahme stellen hier die Viren dar, welche mittels Injektion ins Zytosol gelangen und deren Antigene dann über das Proteasom und den TAP-Transporter dem MHC I-Präsentationsweg zugeführt werden.

Bezüglich der Mechanismen zur Endozytose extrazellulärer Antigene werden (Makro-) Pinozytose, Phagozytose und rezeptorvermittelte Endozytose unterschieden. Bei der Pinozytose werden kleinere Flüssigkeitsmengen und darin gelöste Stoffen aus dem Umgebungsmedium einer Zelle aufgenommen wohingegen bei der Phagozytose feste Bestandteile aufgenommen werden. Die Antigenaufnahme endet stets im Endosom bzw. Phagolysosom. Hier werden die endozytierten, inzwischen durch die im sauren pH des Phagolysosoms aktiven Proteasen aufgespaltenen Moleküle dann auf MHC II-Moleküle geladen und durch diese anschließend an CD4⁺ T-Zellen präsentiert (9).

Der Transport durch die Zellmembran kann dabei sowohl passiv, quasi als spezialisierte Diffusion mit Hilfe von Ionenkanälen oder Transportmolekülen (Carriern), als auch aktiv erfolgen.

1.2.1 Aufnahmemechanismen

Aktiver Transport verbraucht Energie in Form von ATP, kann jedoch auch gegen ein Konzentrationsgefälle stattfinden. Neben der spontanen gibt es auch die Möglichkeit der rezeptorvermittelten Endozytose, wobei die aufzunehmenden Substanzen zunächst an der Zelloberfläche von speziellen

Rezeptoren erkannt werden und erst dadurch der Einstülpungsvorgang aktiviert wird.

Dieser Mechanismus der Endozytose beginnt damit, dass sich die Zellmembran nach innen einstülpt und dabei ein Stück des Extrazellulärraums umschließt. Dabei wird ein Vesikel von bis zu 150 nm Durchmesser gebildet und ins Zellinnere abgeschnürt, bzw. abgestoßen (10, 11). Als Brücke zwischen Aktin und Clathrin wirken die bei den Säugern vorkommenden Homologen zu Sla2, Hip1 und Hip1R, die in sich überlappender, jedoch nicht identischer Weise mit den beiden Proteinen in der Endozytose interagieren (12).

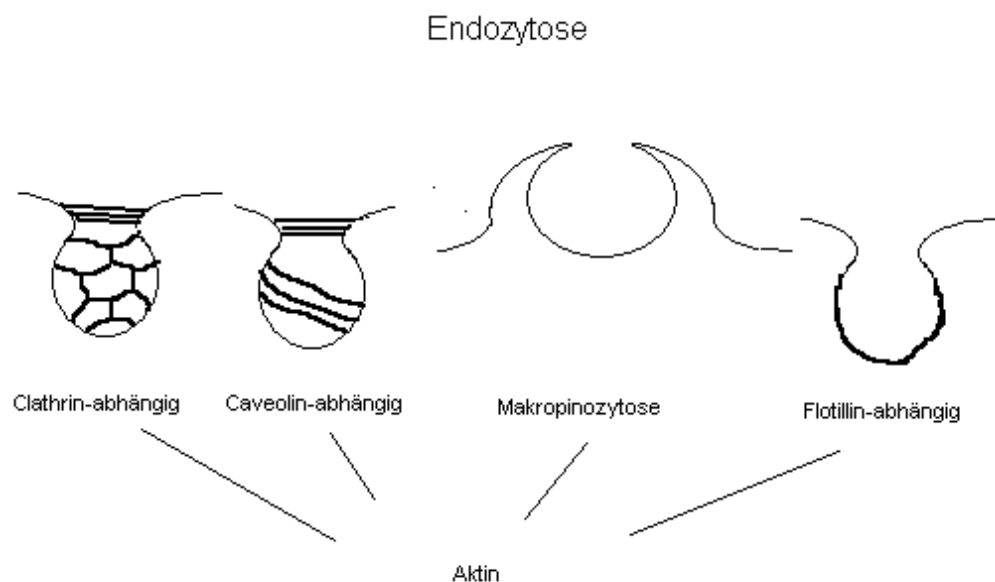


Abb. 1: Endozytose

Schematisch sind unterschiedliche Endozytosemechanismen aufgezeigt. Phagozytose wie Makropinozytose scheinen von einem großstreckigen aktinvermittelten Remodeling der Plasmamembran getriggert und abhängig zu sein. Meist geschieht die Internalisierung vesikulär (Clathrin oder Caveolin vermittelte Vesikel. Eine andere Möglichkeit ist die tubuläre Endozytose (Clathrin und Caveolin unabhängige Carrier CLICs) (13).

Als klassisches Kennzeichen für clathrinunabhängige Eintrittsrouten gilt die Anwesenheit von Lipid-Rafts. Dies sind sehr Cholesterin-, Glycolipid- und Sphingolipid-reiche Mikrodomänen der Zellmembran, die sich dort als flüssigkristalline Phase anordnen. Die Phagozytose als sehr spezialisierte Form der Proteinrekrutierung mittels endozytotischer Internalisierung kann also durch

Lipid Remodeling und die resultierenden Änderungen der Membranoberfläche reguliert werden (14).

Zytosolisch verschmelzen die Endozytosevesikel meist mit Lysosomen und es entsteht als spezielles Kompartiment des endozytotischen Prozessierungsweges das Phagolysosom. In dessen saurem pH fragmentieren Proteasen den Inhalt, woraufhin die entstandenen Peptidfragmente, ob körpereigenen oder exogenen Ursprungs durch Infektionen, an MHC-Moleküle gebunden werden (s. 1.3).

Dieser Aufnahmeweg ist höchst plastisch, was die Tatsache zeigt, dass er nicht nur zum Transport extrazellulärer Moleküle oder Proteine genutzt wird, sondern auch die Aufnahme bestimmter Toxine, Viren und Bakterien vermittelt (15).

1.3 Antigenpräsentation

Nach Aufnahme und Prozessierung werden körpereigene wie körperfremde Moleküle von APZs an Haupthistokompatibilitätsmoleküle (MHC, s. 1.3.2) gebunden, die dann als Antigene an T-Zellen, welche den TZR sowie den Erkennungsrezeptor CD4 bzw. CD8 tragen, präsentiert werden (s. 1.4) (16).

1.3.1 Antigen-Präsentierende Zellen (APZs)

Die Präsentation antigener Peptidfragmente an T-Zellen geschieht durch APZs, besonders durch die professionellen APZs, die Makrophagen, neutrophile Granulozyten, B-Lymphozyten und Dendritische Zellen beinhalten. Nur diese haben die Fähigkeit, naive T-Zellen durch MHC-Präsentation sowie kostimulatorische Signale zu aktivieren.

1.3.1.1 Dendritische Zellen

Dendritische Zellen (DCs) sind eine sehr heterogene Zellpopulation die aus pluripotenten CD34⁺ Stammzellen im Knochenmark entstehen und nach ihrem charakteristischen mikroskopischen Erscheinungsbild während mancher Entwicklungsstadien mit zahlreichen astartigen Ausläufern benannt sind. Diese Ausläufer stellen eine sehr große Kontaktfläche zur Umgebung her. Allen gemeinsam sind bestimmte Oberflächenmarker sowie eine starke Potenz zur Antigenpräsentation durch Expression einer großen Zahl von MHC I- und II-

Molekülen, weswegen sie auch als Torwächter bezeichnet werden (17). Mittels rezeptorunabhängiger Makropinozytose nehmen DCs zu Beginn ihrer Entwicklung stetig sie umgebendes Material auf und suchen über Muster-Erkennungs-Rezeptoren (Pattern recognition receptors, PRRs) ihre Umgebung nach Pathogenen ab. Infektiöse Bestandteile aktivieren sie und veranlassen sie zur Zytokinfreisetzung. Die DC zieht daraufhin ihre Cytoplasmaausläufer ein und differenziert aus, wodurch die Expression von CD80, CD86 und chemotaktischen Protein Rezeptoren (CCR1, 5 und 6) stark hochreguliert wird (18). Die Zelle wandert daraufhin in lymphatisches Gewebe, prozessiert auf dem Weg dorthin das aufgenommene antigene Material und entwickelt eine zunehmende T-Zell-Interaktionsfähigkeit (19).

1.3.2 MHC-Moleküle

Es gibt zwei Arten der MHCs, die beim Menschen auch als HLA (Humanes Leukozyten Antigen)-Moleküle bezeichnet werden und der Bindung antigenen Peptide und deren Präsentation dienen (20). Diese Immunglobuline weisen eine hohe genetische Variabilität auf (21) und sind zusammen mit den Genen für andere an der Antigenpräsentation beteiligte Strukturen wie Proteasen, Peptidtransportern, Zytokinen und Hitzeschockproteinen auf Chromosom 6 codiert.

MHC-Klasse I-Moleküle werden von allen kernhaltigen Zellen exprimiert, sie dienen der Präsentation zytosolischer, in Proteasomen zerlegter Protein-Fragmente an CD8⁺ T-Zellen (s. 2.). Die MHC I Isotypen sind HLA-A, HLA-B und HLA-C.

Die komplex regulierte Expression des MHC II-Moleküls findet sich hingegen nur bei APZs, konstitutiv nur bei den professionellen APZs (22, 23). Sie präsentieren während der Selektion im Thymus und der peripheren Aktivierung antigene Peptide. MHC-Klasse II-Moleküle bestehen aus je einer α - und β -Kette, die in der Zellmembran verankert sind. Die von der α 1- und β 1-Domäne geformte Peptidbindungsgrube, ist an beiden Enden offen, das antigene Peptid wird durch Ausbildung mehrerer Wasserstoffbrückenbindungen entlang der Spalte fixiert, so dass die Endstücke frei aus der Spalte ragen. Peptide, die 12-24 Aminosäuren umfassen und damit etwa doppelt so viele wie in der des MHC

I-Moleküls, können in dieser Bindungsspalte an $CD4^+$ T-Zellen präsentiert werden (24, 25).

Nach der Synthese im ER ist die Bindungsspalte zunächst durch ein Protein namens invariant chain Ii blockiert. Auf seinem Weg durch die Zelle an die Oberfläche verschmilzt der MHC II enthaltende Vesikel des trans-Golgi-Apparats mit einem Phagolysosom, wodurch ein MHC II-Beladungskompartiment (MIIC) entsteht, ein spezielles Kompartiment des endozytotischen Prozessierungswegs (26). Durch Proteasen wird die Ii bis auf ein Fragment, das so genannte CLIP-Peptid in der Bindungsspalte der Klasse II-Moleküle, abgebaut. Der saure pH der MIIC ermöglicht dann letztendlich den Austausch dieses CLIP-Peptids durch das aufgenommene und prozessierte antigene Peptid. HLA-DM stabilisiert dabei die Klasse II-Moleküle und katalysiert die Freisetzung des CLIP-Peptids (27). Die so präsentierten Antigene (meist bakterielle Antigene von extrazellulären Infektionen nach Endozytose, s. 2.1) stimulieren dann eine $CD4^+$ T-Zellantwort, die vor allem dazu dient, andere Immunzellen wie B-Zellen und Makrophagen zu aktivieren. Diese Zellen werden als $CD4^+$ T-Helferzellen bezeichnet (s. 4.2), sie interagieren dabei mit Antigenrezeptoren auf der Zelloberfläche pathogen-spezifischer T-Zellen. Dies stimuliert die Bildung eines Interface, bekannt als die immunologische Synapse, und involviert die Umverteilung anderer T-Zelloberflächenkomponenten zur Synapse wie etwa Korezeptormoleküle, Integrine und Zytokinrezeptoren (28).

Die MHC II Isotypen sind HLA-DM, HLA-DO, HLA-DP, HLA-DQ und HLA-DR.

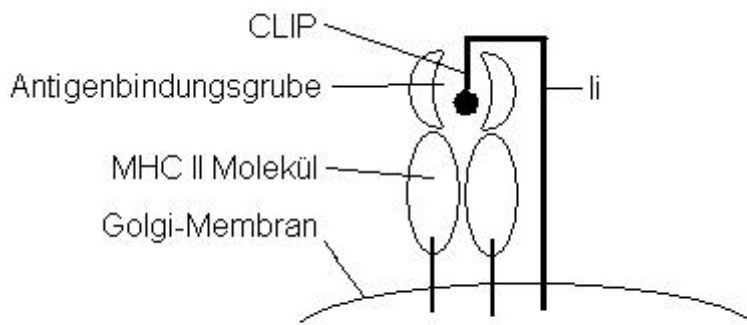


Abb. 2: MHC II mit Ii

Gezeigt ist schematisch ein intrazelluläres MHC II-Molekül. Die $\alpha 1$ - und $\beta 1$ -Domänen sind an der Ausbildung der Peptidbindungsspalte beteiligt, welche hier intrazellulär noch durch das CLIP-Peptid belegt ist. Das dargestellte Trimer mit Ii im Lumen des ER wird über den Golgi-Apparat in die MHC transportiert, wo das CLIP durch das Antigen ausgetauscht wird und das MHC II daraufhin an die Zelloberfläche gelangt.

Eigenschaften beider Präsentationswege werden bei der sog. Kreuzpräsentation (cross-presentation) kombiniert, so dass auch extrazelluläre Proteine nach Aufspaltung auf MHC I-Komplexen unter Mitarbeit des TAP-Transporters präsentiert werden können. Dies wird besonders bei Dendritischen Zellen beobachtet (29) und endet in einer zytotoxischen $CD8^+$ T-Zellantwort, ist im Detail jedoch noch nicht erforscht.

Prinzipiell involviert eine konventionelle Antigen-Erkennung stets spezifische Interaktionen zwischen Peptid und MHC-Molekül (30).

1.3.3 HLA-DR

Die am komplexesten kodierte Subregion der HLA-Klasse II-Moleküle ist diejenige für das HLA-DR Molekül. Allein für die β -Kette sind neun verschiedene Gene (DRB1 –DRB9) und für die Proteine der β -Kette mehr als 320 verschiedene Allele bekannt (31, 32) wohingegen für die α -Kette nur zwei nicht polymorphe Allele existieren.

Der hohe Polymorphismus dieses Moleküls wird ausschließlich durch Nukleotidsubstitutionen der β -Kette hervorgerufen, welche sich jedoch hauptsächlich auf die so genannten hypervariablen Regionen beschränken; wenige Bereiche in den Exons für die $\beta 1$ -Domäne (33).

1.3.4 HLA-DM

Dieses Molekül spielt beim MHC II-Präsentationsweg eine entscheidende Rolle, da es beim Austausch der CLIP-Peptide durch das antigene Peptid das MHC II-Molekül (HLA-DR und -DQ) stabilisiert (36, 37).

Die Ii wird schrittweise von Aspartylproteasen und Cathepsinen (38) zerlegt, was die Peptide 81-104, also die CLIP Peptide, in die Antigenbindungsgrube freisetzt. Diese dissoziieren dann entweder spontan oder durch HLA-DM unterstützt und können zur Zelloberfläche gelangen.

1.4 T-Zellen

T-Zellen können ihr spezifisches Antigen im dargebotenen Komplex aus antigenem Peptid und MHC-Molekül auf der Oberfläche aktivierter APZs erkennen. Sowohl Eigen- wie auch Fremdpeptide werden dabei gleichermaßen von den MHC-Molekülen präsentiert.

Die T-Vorläuferzellen dringen nach Verlassen des Knochenmarks zunächst in den Thymus ein, wo sie initial in unreife T-Zellen differenzieren und nach erfolgreichem Rearrangement des T-Zellrezeptors (TZR) die Expression der CD4 und CD8 Ko-Rezeptor-Moleküle hochregulieren. Diese doppelt positiven Zellen exprimieren nun den reifen TZR auf ihrer Oberfläche. Dieser versucht mit Komplexen aus Eigenpeptid und thymischem MHC-Molekül zu interagieren. Geschieht dies mit einer adäquaten Affinität, wird ein Überlebenssignal transmittiert (Positiv-Selektion), woraufhin die Thymozyten fortfahren sich zu differenzieren und ein begrenztes T-Zell Repertoire bilden, das mit einem (oder mehreren) der exprimierten MHC-Allele interagieren kann (39). Bei den so ausgewählten Zellen greift evtl. simultan beginnend der Prozess der Negativ-Selektion. Dabei werden T-Zellen, die eine hohe Affinität und/oder Kreuzreaktivität für Eigenpeptid gebunden an Eigen-MHC-Moleküle aufweisen, eliminiert (40). Die Negativ-Selektion betrifft also potentiell autoimmune T-Zellen, die durch Eigenpeptide oder durch die MHC-Moleküle selbst aktiviert werden könnten (41).

Nach dieser Entwicklung im Thymus wandern die nun reifen T-Zellen in die Peripherie, wo die peptid-spezifische Erkennung von Komplexen aus Fremdpeptid und Eigen-MHC die konventionelle Immunantwort initiiert und die Selbsttoleranz pathologische Antworten verhindert.

1.4.1 T-Zellrezeptor (TZR)

Der TZR auf der T-Zelloberfläche ähnelt in seiner Entstehung und Struktur dem Fab-Segment eines Antikörpers. Den beiden Ketten des TZR, meist α/β , seltener γ/δ , mit je einer konstanten (C) und einer variablen (V) Domäne schließen sich zwei kurze zytoplasmatische Abschnitte (C-Terminus) an. Das Genom enthält mehrere Kopien für diese einzelnen Elemente, größtmögliche Diversität wird durch zufällige Genanordnung gewährleistet, sowie auch durch die so genannte V(D)J –Rekombination und zufällige Zugabe oder Deletion von Aminosäure (AS)-Resten in unmittelbarer Nachbarschaft der Rekombination (somatische Hypermutation) (42).

TZR erkennen antigene, in der Bindungsspalte von MHC-Molekülen präsentierte Strukturen im Kontext mit bestimmten MHC-Molekülen. Ein zu dem TZR passendes präsentierte Antigen wird nach dem Schlüssel-Schloss-Prinzip durch sechs Schleifen, die so genannten CDRs (komplementaritätsbestimmende Regionen) an der Bindungsseite gebunden. Wird ein TZR an seinen spezifischen Liganden gemeinsam mit einem seiner Korezeptoren CD4 oder CD8 gebunden, wird ein erstes Signal ins Zellinnere gesendet. CD4 ist in die Zellmembran von T-Helferzellen, Monozyten und Makrophagen integriert. Dieser Corezeptor erkennt wie auch CD8 gemeinsam mit dem T-Zellrezeptor das durch das MHC-Molekül präsentierte Antigen auf anderen Körperzellen, wodurch die Immunantwort ausgelöst werden kann. Wenn die als B7.1 (CD80) und B7.2 (CD86) bezeichneten Mitglieder der Immunglobulin-Superfamilie B7, welche nur auf professionellen APZs exprimiert werden, mit CD28-Molekülen auf T-Zellen interagieren, wird ein zweites Signal freigesetzt (42). Erst dieses kostimulatorische Signal erlaubt es der T-Zelle, in die Phase der klonalen Vermehrung einzutreten und regt sie zu Proliferation und Differenzierung an.

Erkennt der TZR jedoch ein mikrobielles Peptid, das strukturell einem Peptid des eigenen Organismus ähnelt (molekulares Mimikry), richtet sich die initial gegen das Fremdpeptid gerichtete Immunantwort gegen das kreuzreaktive Eigenpeptid und es kann zur Entstehung von Autoimmunkrankheiten kommen.

1.4.2 Effektor-T-Zellen

Nach der ersten Stimulierung durch das Antigen differenzieren die naiven T-Zellen (im Thymus) zu funktionell unterschiedlichen Effektorzellen. $CD4^+$ T-Zellen werden zu T-Helferzellen, $CD8^+$ Zellen zu zytotoxischen T-Zellen. Die verschiedenen Untertypen entstehen dabei je nach Antigenaffinität, Kostimulation an der immunologischen Synapse und Zytokinmilieu (43).

Die T-Helferzellen werden noch in Th1 und Th2 unterteilt. Welche dieser beiden Untertypen jeweils ausgebildet wird ist auch hier vom Zytokinmilieu abhängig. Erstere sezernieren vor allem $IFN-\gamma$ und kontrollieren durch Makrophagenaktivierung intrazelluläre Infektionen, Th2-Zellen hingegen sezernieren IL-4, IL-5, IL-10 und TGF- β , haben vor allem B-Zellaktivierung und damit Antikörperproduktion als Ziel und schützen so vor extrazellulären (parasitären) Infektionen (44, 45). Während Th1-Zellen überdies bei Autoimmunprozessen eine Rolle spielen, sind Th2-Zellen beim Hervorrufen allergischer Reaktionen beteiligt.

$CD4^+$ T-Zellen die zusätzlich $CD25^+$ (die α -Kette des IL-2-Rezeptors) sowie den Transkriptionsfaktor FoxP3 exprimieren, können als regulatorische T-Zellen eine immunregulatorische Funktion erfüllen (46). Die Existenz dieser regulatorischen Zellen kann Autoimmunkrankheiten verhindern, wahrscheinlich indem sie über Zytokine andere Lymphozyten hemmen (47). Relativ neu ist die Entdeckung eines weiteren $CD4^+$ T-Effektor-Zelltyps, den proinflammatorischen, Interleukin-17 produzierenden sog. Th17-Zellen, die vermutlich eine wichtige Rolle in der Entstehung von Autoimmunerkrankungen spielen (48).

1.5 Hitzeschockproteine

Hitzeschockproteine (HSPs) sind ubiquitär (d.h. in Eukaryoten, Eubakterien und vielen Archaeen) vorkommende, evolutionär einzigartig hochkonservierte Proteine (49). Sie erfüllen multiple Funktionen im Stoffwechsel der Zelle, welche hauptsächlich dem Schutz der Zelle dienen. HSPs können mit einem breiten Spektrum an Proteinen und Peptiden interagieren und sind insbesondere an deren Faltung, Entfaltung und Reifung aber auch Transport beteiligt.

Vermeehrt aktiviert werden die transkriptionellen (bei Eukaryoten z.B. die Hitzeschocktranskriptionsfaktoren (HSFs)) und post-transkriptionellen Regulationsmechanismen, wenn auf das jeweilige zelluläre System Stress (z.B. Hitze, Sauerstoffmangel, Ultraviolettstrahlung, Ethanol) einwirkt. Eventuell aktiviert letztlich auch eine Inaktivierung oder Überladung des Ubiquitinsystems die HSP-Antwort (50). In solchen Situationen schützen HSPs die zellulären Proteine vor Denaturierung, indem sie deren Sekundärstruktur stabilisieren oder den Abbau nicht mehr funktionsfähiger Proteine über das Proteasom beschleunigen (51).

Andere Formen der HSPs werden hingegen auch konstitutiv exprimiert (51). Sie wirken bei der Erfüllung zahlreicher „housekeeping functions“ einer Zelle mit und können beispielsweise inkorrekt gefaltete, unspezifische oder entartete Proteinstrukturen und -aggregationen erkennen und diese dann entweder entfalten oder der Proteolyse zuführen (52, 53). In dieser Funktion als Wächter in physiologischen Situationen werden HSPs auch als „Chaperone“ bezeichnet (54).

Die bislang bekannten HSPs werden nach ihrem ungefähren Molekulargewicht in zehn Familien mit jeweils bis zu fünf Mitgliedern eingeteilt und benannt. Es gibt eher kleine Hitzeschockproteine (z. B. Hsp27) mit einer Masse von 27 kDa, die hauptsächlich im Nukleus verschiedenster Zellsysteme zu finden sind, Hsp40 und Hsp60, die Chaperonine, bis hin zu den in allen bislang untersuchten Organismen im ER, den Mitochondrien oder Chloroplasten als Reaktion auf Hitze produzierten Hsp70 /Hsp90.

1.5.1 Hitzeschockproteine und Immunität

Verwandt mit ihrer Schutzfunktion ist auch die immunologische Rolle der HSPs. Sie nehmen sowohl in der angeborenen (innate) als auch der erworbenen (adaptive) Immunität Funktionen wahr (s. 1.1) (55, 56). Unter anderem bei nekrotischem Zelltod können HSPs auch in den Extrazellulärraum gelangen (57) und dort beispielsweise mit APZs in Wechselwirkung treten (58, 59).

Da HSPs mit sehr vielen Peptiden interagieren, können sie dies auch mit (Auto-) Antigenen. Mit aus Tumorzellen gewonnenem Hsp konnte eine Immunreaktion gegen diesen Tumor ausgelöst werden (60). Voraussetzung für ihre Funktion in der adaptiven Immunität ist die Bildung von Komplexen zwischen HSP und Peptid, wozu HSP70- und HSP90-Moleküle in der Lage sind. Extrazelluläre HSP:Peptid-Komplexe können über einen der beschriebenen Mechanismen (s. 1.2) in die APZs aufgenommen werden und so in den Antigenpräsentations-Pfad gelangen. Wenn mit HSP komplexierte Peptide von APZs etwa rezeptorvermittelt aufgenommen werden, können sie eine antigenspezifische Reaktion des adaptiven Immunsystems über Präsentation der antigenen Peptide über MHC I- beziehungsweise II-Moleküle (61) hervorrufen.

Neben dem Transport antigener Peptide (Funktion im adaptiven Immunsystem) wurden jedoch noch weitere immunologische HSP-Funktionen beschrieben. Besonders für die HSP Subfamilien der 60, 70 und 90 kDa-Klasse wird eine Beteiligung in der Immunabwehr diskutiert. Mitglieder dieser Familien wurden als Ziel der Immunantwort bei mikrobiellen Infektionen identifiziert, sind also selbst immunodominantes Antigen (62). Es wurde außerdem eine Interaktion von Hsc 70, dem konstitutiv exprimierten, zytosolischen HSP70, mit der „invariant chain“ gezeigt (63), das HSP ist hier bei Beladung bzw. Auswahl des Peptids beteiligt, was einen weiteren Aufgabenbereich erschließt.

Es wird ihnen des Weiteren eine interzelluläre Signalfunktion zugeschrieben. In der angeborenen Immunität bedeutet dies, dass extrazelluläre HSP-Moleküle an Signalrezeptoren binden und so NKs und professionelle APZs direkt aktivieren (z.B. Gp96 DCs (64), HSP70 Monozyten (65)) oder über eine zelluläre Signalkaskade eine verstärkte Transkription von Zytokinen, kostimulatorischen- und MHC-Molekülen vermitteln. Letztendlich führt dies zu

einer Reifung Dendritischer Zellen mit einer erhöhten Expression kostimulatorischer Moleküle und Reifungsmarker (MHC II-Moleküle, CD86, CD83 und CD40) und ihrer Wanderung zu den Lymphknoten (66, 67).

Durch die große Homologie vieler HSPs, so auch mikrobieller und humaner, wird eine Kreuzreaktivität zu mikrobiellen HSPs heute als Teil der Entwicklung von Autoimmunkrankheiten vermutet und diskutiert (68, 69), die Datenlage ist jedoch nicht eindeutig. Darüber hinaus kann die Induktion von Eigen-HSPs Autoimmunität und Transplantatabstoßung attenuieren. Auch können HSPs von Tumoren und Pathogenen spezifische, protektive Immunität hervorrufen.

1.5.2 HSP70

Es soll nun noch näher auf die für diese Arbeit relevanten HSPs der 70-kDa Klasse eingegangen werden. Die HSP70-Moleküle sind die am höchsten konservierte HSP-Familie mit in den humanen Zellen 11 bekannten Mitgliedern im Zytosol, den Mitochondrien und im Lumen des ER.

Sie ähneln in ihrer Struktur den Hsp der 90-kDa Klasse. Bei beiden Familien stehen am Carboxy-Ende dieselben vier Aminosäuren. Alle HSP70 bestehen aminoterminal aus einer hochkonservierten, schwach ATPase-aktiven Domäne (44 kDa) und carboxyterminal einer Peptidbindedomäne (18 kDa), worüber eine konformationsvariable Subdomäne (10 kDa) gelegt ist. Mit dem in der Sekundärstruktur sehr ähnlichen N-terminalen Bereich binden sie mit hoher Affinität ATP und sind darüber an der Faltung von Polypeptidketten beteiligt, wobei ATP-Hydrolyse zu einer stabileren Substratinteraktion führt. Die Substratinteraktion über ATP und Kofaktoren (am besten untersucht für das aus dem ER stammende DnaK (70, 71)) findet bevorzugt mit hydrophoben AS-Sequenzen linearer Peptidsegmente statt. Durch ATP-Hydrolyse bei Substratbindung schließt sich der α -helikale, die Substratbindungsdomäne deckelnde Teil mittels Konformationsänderung (72).

Hsp70 ist -auch unter Bildung hochaktiver Komplexe- in wichtige zelluläre Prozesse, wie den Transport von Proteinen über Membranen, die Disassemblierung Clathrin-umhüllter Vesikel und die Regulation der Hitzeschockantwort involviert.

1.5.3 Hitzeschockproteine und MHC-Moleküle

Über MHC I-Moleküle können Antigene aus Komplexen zwischen HSP und Peptid nach rezeptorvermittelter Aufnahme -im Gegensatz zu unspezifischer Endozytose- von professionellen APZs an CD8⁺ T-Zellen präsentiert und eine zytotoxische T-Zellantwort ausgelöst werden (74, 75, 76). Es handelt sich hierbei um den schon beschriebenen Mechanismus der Kreuzpräsentation (s 1.3.2).

Jedoch wurde auch für die MHC II-vermittelte Antigenprozessierung und -präsentation eine verstärkte Aktivierung von CD4⁺ T-Zellen durch HSP70-Moleküle gezeigt (77). Eine Überexpression von Hsc70 in Makrophagen führt zu einer verstärkten Präsentation exogenen Antigens über MHC II (78), dennoch sind der genaue Aufnahmemechanismus, die dabei eventuell verwendeten Rezeptoren und auch der Präsentationsweg bislang unklar.

In unserem Labor beobachteten wir als immunogene Effekte dieser Komplexe in einem humanen, antigenspezifischen System bei niedrigen Antigen-Dosierungen und mit niedriger APZ:T-Zell-Ratio eine gesteigerte Proliferation von CD4⁺ T-Zellen (77). Außerdem entdeckten wir Hinweise, dass Hsp70-Moleküle spezifisch mit HLA-DR-Molekülen interagieren, was bei der Entstehung von Autoimmunkrankheiten (z.B. der JIA) zum Tragen kommen kann (79, 80).

1.6 HSP-Rezeptoren

Verschiedene Rezeptoren für HSPs wurden auf APZs beschrieben, jedoch weist die Literatur auf diesem Gebiet noch viele Unklarheiten auf. Offen ist die Frage, ob vor allem Signal- oder eher Endozytoserezeptoren für die Wirkungen der HSPs verantwortlich sind. Da diese Rezeptoren auf völlig unterschiedliche Weise in das zelluläre Geschehen eingreifen, jedoch zu ähnlichen Wirkungen führen können, ist die Unterscheidung zum Verständnis essentiell (80). Am Besten untersucht sind Endozytoserezeptoren, hier vor allem Scavenger-Rezeptoren wie LOX-1, CD36 und CD91. Letzterer wurde als HSP-Rezeptor identifiziert (81). Die Tatsache, dass verschiedene Rezeptorentypen existieren,

kann die unterschiedlichen Wirkungen der HSPs, wie einerseits die Signalwirkung und andererseits auch die Präsentation chaperonierter Peptide erklären (82). Auch die HSP70 Rezeptoren sind bislang noch nicht eindeutig identifiziert. Im Folgenden soll auf die möglichen Kandidaten näher eingegangen werden.

CD40 gehört zur TNF-Rezeptorfamilie. Es werden ihm vor allem signalgebende Funktionen zugeschrieben (83, 84), allerdings wurde auch eine Peptidaufnahme über CD40 bei APZs gezeigt, welche von Hsp70 erleichtert wird (85). Dieselben Autoren schrieben CD40 für murines Hsp70 außerdem eine Endozytosefunktion zu. Für Säuger-HSP steht der Nachweis einer Bedeutung dieses Rezeptors noch aus.

TLRs hingegen scheinen wieder ausschließlich signalgebende Funktionen für HSPs zu haben (86), sind also nicht direkt an der Präsentation von an HSPs chaperonierte Antigene beteiligt. Sie spielen jedoch eine Rolle bei der Signaltransduktion und Aktivierung von APZs durch HSPs, wie etwa TLR-2 und TLR-4 unter Beteiligung von CD14 bei Bindung von rekombinantem Hsp70 (87). Alle Arbeiten zu diesen Rezeptoren müssen jedoch unter dem Gesichtspunkt der eventuellen Kontamination mit bakteriellen Lipopolysacchariden (LPS), für die TLRs Liganden sind, betrachtet werden.

Unter diesem Gesichtspunkt der eventuellen Kontamination mit LPS müssen also auch die Daten betrachtet werden die zeigen, dass der SR-A (Scavenger Rezeptor der Klasse A) Ligand Fucoidin die gp96 Bindung an Makrophagen inhibieren kann (88).

1.6.1 CD91

Für die beobachteten Effekte des HSP im adaptiven Immunsystem wird verstärkt eine über CD91 vermittelte Aufnahme verantwortlich gemacht (89). CD91, auch als LRP (low-density lipoprotein receptor-related protein), LRP1 oder $\alpha 2$ Macroglobulin ($\alpha 2$ M) (90) Rezeptor bezeichnet, wurde als erster HSP-Rezeptor identifiziert. Es handelt sich hierbei um ein multifunktionelles, 600 kDa großes Membranprotein. Neben den Aufgaben im Lipoproteinstoffwechsel (91, 92) wirkt er auch bei der Aktivierung lysosomaler Enzyme, der Homöostase von Proteinase und Proteinaseinhibitoren, der zellulären Aufnahme von Viren und

Toxinen, allerdings auch der Neurotransmission und der zellulären Signaltransduktion mit (93).

Die außerordentlichen Bindungsmöglichkeiten liegen in 31 Komplement-ähnlichen Wiederholungssequenzen begründet (complement-type cysteine-rich repeats, (CR)-domains), die sich in den vier Clustern der extrazellulären α -Untereinheit (515 kDa) befinden (94). Einige Liganden erkennen nur Wiederholungssequenzen bestimmter Cluster, andere verschiedene Wiederholungssequenzen in Kombination.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass eine Vielzahl an strukturellen, funktionellen und genetischen Studien, von denen die meisten unabhängig voneinander angestellt wurden, die Funktion von CD91 als HSP-Rezeptor bestätigen. Die Aufnahme von Hsp70:Peptid-Komplexen über CD91 und anschließende verstärkte Präsentation Hsp70-gebundener Peptide über MHC I gilt als belegt. Ungeklärt war zum Zeitpunkt des Beginns dieser Dissertation der Mechanismus der verstärkten Präsentation Hsp70-gebundener Peptide über MHC II-Moleküle.

1.7 Ausgangspunkt und Zielsetzung

Da HSPs neben vielfältigen Funktionen im Zellstoffwechsel auch wichtige Aufgaben im Bereich der angeborenen und erworbenen Immunität erfüllen, erscheint es von Interesse, diese Vorgänge näher aufzuklären, wozu diese Arbeit beitragen soll. Ausgangspunkt ist die verstärkte Aktivierung und Proliferation antigenspezifischer T-Zellen durch Hsp70-gebundene antigene Peptide (95). Für die MHC I-vermittelte CD8⁺ T-Zellaktivierung ist dies relativ gut untersucht, für MHC II und CD4⁺ T-Zellen bislang wenig.

Die verstärkte antigenspezifische CD4⁺ T-Zellaktivierung konnte in unserem Labor erstmals in einem humanen System nachgewiesen werden (77). Die dabei proliferierten T-Zellen sind antigenspezifisch und die Komplexbildung an Hsp70 Voraussetzung für den Effekt. Des Weiteren wurden Indizien für eine direkte Interaktion von HSP70-Molekülen mit MHC II-Molekülen und Peptidfragmenten in vitro gefunden (96, 97).

Würden diese HSP70:Peptid-Komplexe dabei über einen der beschriebenen Mechanismen (s.2) in die professionellen APZs aufgenommen und so in den MHC I und II-Präsentationsweg gelangen wäre es möglich, dass extrazelluläres HSP70 (z. B. durch Nekrose infolge Tumor, Entzündung, Infektion) als Scanner (durch Affinität für bestimmte Peptidsequenzen) und Carrier für antigene Peptide dient. Eine direkte Interaktion von HSPs mit MHC II-Molekülen könnte bei der Übertragung in die Bindungsstelle der MHC II-Moleküle eine Rolle spielen.

Im Folgenden soll nun der Mechanismus dieser Immunreaktionsverstärkung von CD4⁺ T-Zellen durch Hsp70 *in vitro* (77) weiter untersucht und charakterisiert werden. Dies soll in einem humanen, antigenspezifischen Modell mit allo-/ autoantigenen Peptidsequenzen geschehen. Es wurden dabei Zellen von HLA-typisierten und immunisierten (Tetanus, Influenza) Donoren verwendet. Die Detektion antigenspezifischer T-Zellen nach Stimulation ist mit peptidbeladenen HLA-DR Tetramer-Molekülen möglich, eine Proliferation kann mittels Verdünnung des Farbstoffes CFSE in sich teilenden Zellen gezeigt werden.

Insbesondere soll von Interesse sein, wie die immunogenen Komplexe in die APZs aufgenommen werden, ob ein Hsp:Peptid-Komplex über Makropinozytose, Phagozytose oder rezeptorvermittelte Endozytose in die APZs gelangt und falls ja, welches der Rezeptor ist, der in die Hsp70-verstärkte MHC II-vermittelten Antigenpräsentation involviert ist. Zunächst soll untersucht werden, ob eine Endozytosefähigkeit der Zellen für diesen Effekt überhaupt benötigt wird und eine Peptidinternalisierung Voraussetzung für eine verstärkte Präsentation ist (98). Ergänzend sollen spezielle Aufnahmemechanismen oder intrazelluläre Transportmechanismen der antigenpräsentierenden Zellen auch durch Chemikalien geblockt werden.

Des Weiteren gilt es, die Interaktion des HSP mit möglichen Rezeptoren auf der Oberfläche antigenpräsentierender Zellen zu untersuchen und so zu klären, ob eine rezeptorvermittelte Endozytose beteiligt ist. Insbesondere da bei humanen Zellen für die MHC II-vermittelte Antigenpräsentation die entscheidenden

Rezeptoren unklar sind. Durch Blockade der möglichen Rezeptoren mittels Antikörpern soll auch die Rolle der Rezeptoren innerhalb der HSP-vermittelten Immunantwort untersucht werden.

Noch nicht bewiesen wurde bislang auch die Aufnahme in endosomale Vesikel für den MHC II-Präsentationsweg. Unter Verwendung einer für das HLA-DM Molekül negativen B-Zelllinie als antigenpräsentierende Zellen soll der Beitrag von zytosolischem Hsp70-Molekül zu Auswahl (Scanner-Funktion) und Beladung (Carrier-Funktion) von HLA-DR-Molekülen mit antigenen Peptiden untersucht werden.

Die Erkenntnisse darüber, ob und welche Aufnahmemechanismen von Hsp70:Antigen-Komplexen in eine Zelle bei der verstärkten CD4⁺ T-Zellaktivierung eine Rolle spielen, könnten wesentlich zum Verständnis des MHC II-Präsentationsweges und der Rolle von Hsp70 beitragen. So könnten die Ergebnisse zu einer besseren Kenntnis der CD4⁺ T-Zellaktivierung durch Allo-, Auto- und Tumorantigene führen, welche uns in der Medizin auf vielerlei Ebenen vor Probleme stellen.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte

Brutschrank	HERA cell Heraeus
Cytospin 3	Shandon
Durchflußzytometer	FACS-Calibur Becton Dickinson
Fluoreszenzmikroskop	BX60 Olympus
Inversmikroskop	LM IX50 Olympus
Kamera	U-TV1 X Olympus
Neubauer Zählkammer	La Fontaine International
Pipetten	LABMATE ABIMED
Pipettierhilfe	SWIFTPET ABIMED
Schüttler	Polymax 1040 Heidolph
Sterile Werkbank	HERA safe Heraeus
Ultrazentrifuge	Rotixa 50RS Hettich
Vario MACS Separator	Miltenyi Biotec
Vortexer Titramax 100	Heidolph
Wärmebad	Gesellschaft für Labortechnik Burgwedel
Zellbestrahlungsgerät	Gammacell 1000 Elite MDS Nordion
Zellzählgerät	Cobas Micros Roche
Zentrifuge	5415 C Eppendorf

2.1.2 Software

BD CellQuest™ Pro	Version 4.0.2 BD Biosciences
cell^F Imaging	Olympus
CellQuest™.	Version 3.3 Becton Dickinson
GraphPad Prism	Version 4.01 GraphPad Software Inc
WinMDI	Version 2.9 Joseph Trotter

2.1.3 Verbrauchsmaterialien

Chamber Slide 2-Loch Glasobjektträger	Nunc
Deckgläser 22 x 22 mm	Menzel Gläser
EQUIBIO Einmalpipetten	Peqlab Biotechnologie
5 ml FACS-Röhrchen	BD
15 ml Falcon-Röhrchen	Greiner Bio-One
50 ml Falcon-Röhrchen	BD
6-Loch Flachbodenzellkulturplatten	MultiwellTM, BD
12-Loch Flachbodenzellkulturplatten	Costar, Corning Incorporated
24-Loch Flachbodenzellkulturplatten	MultiwellTM, BD
96-Loch Flachbodenzellkulturplatten	Costar, Corning Incorporated
Glaspasteurpipetten 230 mm	WU
MACS Säulen	Miltenyi Biotec
96-Loch Rundbodenzellkulturplatten	Greiner Bio-One
75cm ² Zellkulturflasche	Costar, Corning Incorporated
162cm ² Zellkulturflasche	Costar, Corning Incorporated
Pipettenspitzen	Greiner Bio-One
Zellschaber	Corning Incorporated, NY, USA (3010)

2.1.4 Puffer

MACS

MACS Puffer I: PBS, 2 % BSA, 2 mM EDTA

MACS Puffer II: PBS, 2 mM EDTA, 0.09 % Natrium-Azid

Zellkultur/Mikroskopieren

PBS-Lösung (Dulbecco) ohne Ca/Mg

Biochrom

Hanks

Biochrom

2.1.5 Reagenzien und Medien

Ampuwa Wasser	Fresenius Kabi
CFSE	Molecular Probes
DMSO	Merck
EDTA	Sigma Chemical Co.
FACS Clean; Flow; Rinse	Becton Dickinson
FCS	Biochrom
Ficoll Separating Solution	Biochrom
GM-CSF	R&D Systems
Glycin	Roth
HEPES (1M)	Biochrom
L-Glutamin (200mM)	Biochrom
LPS aus <i>E.coli</i>	Stamm 026:B6 Sigma
MACS CD4+ T Cell Isolation Kit II human	Miltenyi Biotec
NaN3	Roth
Opti-MEM I Reduced Serum Medium	Invitrogen
Penicillin/Streptomycin(10TIE/100Tug/ml)	Biochrom
PHA	Sigma
Propidiumjodid	BD Biosciences
VLE-RPMI 1640 mit 2g/l NaHCO ₃	Biochrom
Streptavidin-APC	BD Biosciences
Trypanblau	Sigma Aldrich
Trypsin/EDTA-Lösung ohne Ca/Mg	Biochrom
Tween 20	Roth
VLE-RPMI 1640 mit 2g/l NaHCO ₃	Biochrom
Chloroquine	Sigma Aldrich
Genistein	Sigma Aldrich
Paraformaldehyd	Sigma Aldrich

2.1.6 Proteine

Humanalbuminlösung 20 %	ZLB Behring
Humanes Hsp70	StressGen
Humanes Hsp70 low endotoxin	StressGen
ATPase-Fragment von Hsc70 (ATPf)	StressGen
Tetanusprotein	Sigma Aldrich

2.1.7 Peptide

TT1: TT₈₃₀₋₈₄₄ (QYIKANSFKIGITEL)

TT2: TT₉₄₇₋₉₆₆ (FNNFTVSFWLRVPKVSASHL)

TT4: TT₁₂₉₇₋₁₃₁₅ (KILGCDWYFVPTDEGWTND)

HA: HA₃₀₇₋₃₁₉ (PKYVKQNTLKLAT)

GAD: GAD₅₅₅₋₆₅₇ (NFFRMVISNPAAT)

2.1.8 Antikörper

anti-CD91 PROGEN, BD Biosciences (Klon 8G1)

Isotypkontrolle BD Biosciences

2.1.8.1 Fluoreszenzmarkierte monoklonale Antikörper

alle BD Biosciences

Maus-antihuman CD 3:	FITC	Isotyp IgG1 κ	Klon UCHT1
Maus-antihuman CD 4:	APC-Cy	Isotyp IgG1, κ	Klon MOPC-21
	PE	Isotyp IgG1, κ	Klon RPA-T4
Maus-antihuman CD14:	APC	Isotyp IgG _{2a} κ	Klon M5E2
	FITC	Isotyp IgG _{2b} κ	Klon M ϕ P9
Maus-antihuman CD19:	FITC	Isotyp IgG ₁ κ	Klon HIB19
	PE	Isotyp IgG1	Klon HIB19
Maus-antihuman HLA-DM:	FITC	Isotyp IgG ₁ κ	Klon MaP.DM1
Maus-antihuman HLA-DR:	FITC	Isotyp IgG2a	Klon L243
Maus-antihuman IgG1:	FITC	Isotyp IgG1	Klon X40

2.1.9 Zelllinien

HLA-DRB1-Allel 0401 exprimierende B-LCL

William W. Kwok

(Benaroya Research Institute at Virginia Mason, Seattle)

2.2 Methoden

2.2.1 Isolierung mononukleärer Zellen

Mittels diskontinuierlicher Dichtegradientenzentrifugation (Ficoll-Hypaque) können periphere mononukleäre Blutzellen (PBMCs, also B-Zellen, T-Zellen, Monozyten) aus Blut oder Blutkonzentraten isoliert werden.

Als Donoren dienten freiwillige, HLA-typisierte Probanden nach Aufklärung und schriftlichem Einverständnis der Teilnahme oder selten Buffy-Coats, ein leukozyten- und thrombozytenreiches Nebenprodukt der Verarbeitung von Blutspenden. Die gesamte HLA-Typisierung mittels PCR sowie die Bereitstellung der Buffy-Coats übernahm freundlicherweise Frau Prof. Dr. Wernet, Transfusionsmedizin Tübingen. Die gesunden Spender waren gegen Tetanus bzw. Influenza immunisiert und die gewonnenen Zellen wurden in den Versuchen entweder mit antigenen Peptiden alleine oder Hsp70:Peptid Komplexen stimuliert (s. 2.2.8).

Die Spenderhaplotypen waren HLA-DRB1*0101 (1 Donor), *0401 (13 Donoren), *0402 (2 Donoren), *1101 (3 Donoren), *1501 (2 Donoren). Ein Ethikvotum der Ethik-Kommission der Universität Tübingen liegt vor.

Das Blut oder Konzentrat (Buffy Coats) der gesunden Donoren wurde hierzu zunächst im Verhältnis 1:2 mit PBS verdünnt. In einem 50 ml Röhrchen wurde dann Ficoll-Trennlösung (Biocoll separation solution), ein neutrales und stark verzweigtes synthetisches Polysaccharid, mit der doppelten Menge dieses verdünnten Blutes überschichtet. Die Dichte der Ficoll-Lösung liegt mit 1.077 g/ml zwischen der Dichte der Erythrozyten und der der PBMCs. Durch 20 min Zentrifugation bei 2020 rpm ohne Bremse können dadurch Erythrozyten und die meisten Granulozyten aufgrund ihrer hohen Dichte die Ficoll-Schicht durchdringen und die weniger dichten PBMCs sich als dünne Schicht an der Grenze zwischen Ficoll und Überstand (verdünntes Blutplasma und Thrombozyten) ansammeln. Granulozyten und die durch die Ficoll-Lösung

beschleunigt sedimentierten Erythrozyten pelletieren am Röhrchenboden Nach Absaugen des Plasmas wurden die PBMCs mit einer Pipette vorsichtig abgenommen, 1 x mit PBS (10 min, 2020 rpm) und zweimal mit PBS 2 % FCS (4 min, 1300 rpm) gewaschen, schließlich gezählt und in das Kulturmedium aufgenommen.

2.2.2 Isolierung von CD4⁺ T-Zellen

Mittels MACS (magnetic cell sorting) wurden aus den PBMCs CD4⁺ T-Zellen mit dem CD4⁺ „negativ“ T-Zell-Isolations-Kit nach der dem Kit beiliegenden Anleitung isoliert. Das Kit hat den Vorteil, dass „unberührte“, d.h. nach der Isolation nicht mit Antikörpern markierte CD4⁺ T-Zellen gewonnen werden können, so dass kein möglicher Einfluss der Isolation auf den weiteren Versuch besteht. Bei diesem Verfahren werden die PBMCs zunächst mit einer Mischung Biotin-markierter mAk (anti-CD8, -CD14, -CD16, -CD19, -CD36, -CD56, -CD123, -TZRy/δ und -Glycophorin A) inkubiert. Bis auf die CD4⁺ T-Zellen wurden dadurch alle in den PBMCs enthaltenen Zelltypen mit biotinylierten Antikörpern markiert und schließlich nach Zugabe anti-Biotin-konjugierter MicroBeads mittels der MACS-Technologie (VarioMACS Separator, LS-Säule) von den unmarkierten CD4⁺ T-Zellen separiert. Die mit den ferromagnetischen MicroBeads markierten CD4⁻ T-Zellen werden hierbei im Magnetfeld des Separators gebunden, während die unmarkierten CD4⁺ T-Zellen ungehindert passieren. Nach mehrmaligem Spülen der Säule mit Puffer, wobei die CD4⁺ T-Zellen in einem Röhrchen aufgefangen wurden, wurde die Säule aus dem Magnetfeld genommen und die dadurch nicht mehr magnetisch gebundenen „Nicht-CD4⁺ T-Zellen“ unter Druck eluiert. Dann wurden beide Zellfraktionen einmal mit Puffer gewaschen, gezählt und in Kultiviermedium aufgenommen.

Der Anteil lebender CD4⁺ T-Zellen in der CD4⁺ Fraktion wurde nach jeder Isolierung durchflusszytometrisch durch Färbung mit anti-CD4 mAK (monoklonaler Antikörper), anti-CD3mAK und Propidium-Iodid bestimmt und betrug meist >90 % bei <0.3 % Verunreinigungen einzelner anderer Zelltypen. Diese wurde mittels Färbung mit anti-CD8, -CD14 und -CD19 Antikörper untersucht. Für die Fraktion der CD4⁻ Zellen wurden dieselben Parameter bestimmt, um diese im weiteren Versuchsverlauf als APZs zu verwenden.

2.2.3 Zelllinie B-LCL

Für die Proliferationsversuche mit B-Zellen (s. 3.7) wurde eine durch Transfektion mit EBV-Überstand immortalisierte B-Lymphoblastoid-Zelllinie (B-LCL) humanen Ursprungs verwendet, bezogen vom 12th International Histocompatibility Workshop (IHW) Cell Panel. Die kultivierte Zelllinie exprimiert homozygot das HLA-DRB1-Allel 0401, die HLA-DR Expression wurde mit dem fluoreszenzmarkierten monoklonalen anti-HLA-DR Antikörper L-243 überprüft.

Die genaue Bezeichnung der Zelllinie lautet SAVC (IHW 9036).

Sie wurde uns freundlicherweise von William W. Kwok (Benaroya Research Institute at Virginia Mason, Seattle) zur Verfügung gestellt.

2.2.4 Zellkultur

Alle in dieser Arbeit verwendeten Zellen waren humanen Ursprungs. Die Zellkulturen wurden im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert.

Die von gesunden, HLA-typisierten Donoren isolierten PBMCs (s. 3.1.2) wurden in mit 10 % (Volume to Volume, V/V) gepooltem humanem Serum (PHS), Glutamin (2 mM), Streptomycin (0.1 mg/ml) Penicillin (0.06 mg/ml), und HEPES-Puffer (10 mM) supplementiertem VLE-RPMI 1640 kultiviert.

B-LCLs wurden in Suspension kultiviert, das VLE-RPMI 1640 Medium war hierbei mit 10 % (V/V) fötalem Kälberserum (fetal bovine serum, FBS), Glutamin (2 mM), Streptomycin (0.1 mg/ml), Penicillin (0.06 mg/ml), und HEPES-Puffer (10 mM) supplementiert.

2.2.5 Gewinnung von humanem Serum

Zur Gewinnung des gepoolten humanem Serums (PHS) für das Kultiviermedium der T-Zellen wurde von ca. 10 gesunden Spendern (zu gleichen Teilen männlich und weiblich) nach schriftlicher Einverständniserklärung jeweils 100 ml peripheres Blut abgenommen und 1h bei 37 °C inkubiert. Das nach dieser Zeit geronnene Blut wurde 10 min bei 3250 rpm zentrifugiert wonach das Serum mit einer Pipette abgenommen und gepoolt werden konnte. Nach Hitzeinaktivierung durch Inkubation im Wasserbad für 30 min bei 56 °C erfolgte die Aufbewahrung bei -20 °C für maximal 6 Monate.

Dieses gepoolte Serum löst das Problem, für jeden Donor ein eigenes Medium bereithalten zu müssen, was durchaus zu sehr unterschiedlichen Versuchsbedingungen zwischen den einzelnen Donoren führen kann. Zusätzlich kann durch diese Methode das Problem der Gerinnungsproteine umgangen werden, die im ansonsten zur Vermeidung der Abnahme von zu großen Blutmengen als „Serum“ verwendeten Ficoll-Überstand enthalten sind. Da das 10 %-ige PHS-Medium in Versuchen zur T-Zellproliferation verwendet wird und diese keine Blutgruppenantigene aufweisen (Erythrozyten wurden durch Ficoll-Graduierung eliminiert) besteht keine Indikation, nur AB-Serum zu verwenden.

2.2.6 Generierung dendritischer Zellen

Zur Generierung unreifer dendritischer Zellen wurden zunächst am Boden einer 75 cm² Zellkulturflasche Monozyten aus PBMCs mittels Kunststoff-Adsorption angereichert. Dabei wurden je 8 ml der isolierten PBMCs in Zellkulturflaschen ausgesät und 90 min. bei 37 ° C und 5 % CO₂ im Brutschrank inkubiert. Nicht-adhärenzte Zellen wurden anschließend mit dem Medium abgenommen und die Reinheit der Monozyten durch horizontales Schwenken der Zellkulturflasche erhöht. Durch Zugabe von 500 U/ml IL-4 und 1000 U/ml GM-CSF in das Zellkulturmedium an Tag 1, 3 und 5 differenzieren die über Kunststoff-Adsorption angereicherten Monozyten zu unreifen dendritischen Zellen (HLA-DR+, CD86+, CD14-, CD83-).

2.2.7 Bestimmung von Zellzahl und Zellvitalität

Zur Bestimmung von Anzahl und Vitalität der Zellen wurden 20 µl der jeweiligen Zellsuspension mit dem Farbstoff Trypanblau im Verhältnis 1:1 in einer 96-well U-Bodenplatte resuspendiert. Das saure Trypanblau dringt durch defekte Zellmembranen toter Zellen in das Zytosol, bindet dort mit seinem Anion Zellproteine und färbt diese Zellen dadurch sichtbar an. In einer Neubauer Zählkammer wurden stets vier Großquadrate ausgezählt und die Zellzahl vitaler Zellen pro Milliliter der untersuchten Zellsuspension bestimmt (Multiplikation des Mittelwertes der ausgezählten vier Großquadraten mit Verdünnungsfaktor und Kammerfaktors 10⁴).

Teilweise wurden auch Zählungen mit dem automatischen Zellzählgerät Cobas Micros Roche durchgeführt.

2.2.8 T-Zellproliferationsversuche

Für die T-Zellproliferationsexperimente wurden die mit CFSE (5(6)-Carboxyfluorescein di-acetate N-succinimidylester) markierten (s. 2.2.10.1) CD4⁺ Zellen mit autologen APZs (die Fraktion der CD4⁺ Zellen aus der T-Zellisolierung) bzw. B-LCLs in Kultur genommen. Vor ihrer Verwendung als APZs wurden diese mit einer Strahlungsdosis von 30 (T-Zellen) bzw. 120 Gy (B-LCLs) bestrahlt, um durch die dadurch verursachte DNA-Schädigung eine Proliferation der APZs zu verhindern. Für die mechanistischen Studien wurden die APZs während der Inkubation variierenden Konditionen wie etwa Temperaturen, pH-Wert oder Inkubationszeiten ausgesetzt, die Endozytosemechanismen durch Zugabe von Genistein, Cytochalasin oder Chloroquine 15 Minuten bei Raumtemperatur inhibiert und potentielle Hsp70 Rezeptoren (CD91, CD40) mit Antikörpern blockiert (s. 3.3).

Die gewünschte Zahl an APZs wurde für 2 Stunden bei 37 °C mit der gewünschten Konzentration (0.01 - 10 µg/ml bei den antigenen Peptiden und 3-10 µg/ml bei Verwendung des antigenen Proteins) vorinkubierter antigenen Peptide bzw. Hsp:Peptid-Komplexen inkubiert. Die Kultivierung erfolgte schließlich zusammen mit 2×10^5 CD4⁺ T-Zellen in 200 µl Kulturmedium in 96-Loch Flachbodenplatten für 10 Tage im Brutschrank. An Tag 10 wurden die Zellen aus der Platte entnommen, in FACS-Röhrchen überführt und mit Fluoreszenzmarkiertem anti-CD4 mAk bzw. HLA-DR-Tetrameren gefärbt (s. 2.2.10).

Die Proliferation wurde anhand der Dilution fluoreszierenden CFSEs in proliferierenden CD4⁺ T Zellen, die Antigenpezifität der generierten T-Zellen mit Hilfe peptidbeladener Tetramere mittels Durchflusszytometrie (s. 2.2.11) gemessen. Stets wurden hierbei Dreifachwerte bestimmt, d. h. T-Zellen in drei verschiedenen Löchern jeweils mit derselben Antigenkonzentration stimuliert, als Negativkontrollen dienten unstimulierte bzw. mit Hsp70 Proteinen stimulierte Proben und als Positivkontrolle eine mit 2 µg/ml SEB (Staphylococcal Enterotoxin B) oder PHA (Phytohämagglutinin) stimulierte Probe. SEB kann als

Superantigen aus *S.aureus* einen großen Teil der T-Zellen unabhängig ihrer Antigen-spezifität stimulieren und zur Mitose anregen. Bei durchflusszytometrischer Analyse SEB-stimulierter und CFSE-gefärbter T-Zellen kann die Anzahl der stattgefundenen Zellteilungen durch ein Histogramm mit definierten Peaks ermittelt werden.

2.2.9 Herstellung der antigenen Peptide

Zur Stimulation der T-Zellen wurden Epitope des Tetanustoxin C-Fragments (TT₉₄₄₋₉₆₆) und Influenza-Hämagglutinin (HA₃₀₇₋₃₁₉) benutzt.

Sie wurden durch Festphasenpeptidsynthese nach der Fmoc/TBTU-Methode im Batch-Verfahren mittels eines modifizierten multiplen Peptidsynthesizers synthetisiert (99). Dabei wurden Fmoc-Harze (9-Fluorenylmethoxycarbonylchlorid) verwendet, zur Fmoc-Abspaltung 20 % (V/V) Piperidin in Dimethylformamid (DMF) eingesetzt und die Fmoc-AS und das Kupplungsreagenz TBTU (O-(Benzotriazol-1-yl)-N,N,N',N'-tetramethyluronium tetrafluoroborate) in 4- bis 8-fachem molarem Überschuss relativ zur Harzbeladung eingesetzt. Die Abspaltung vom Harz und die Entfernung von Schutzgruppen funktioneller Aminosäurereste erfolgte schließlich bei Inkubation mit 90 % Trifluoressigsäure, 2.5 % 1.2-Ethandithiol, 2.5 % H₂O, 2.5 % Phenol (alles V/V) für 3-4 h bei Raumtemperatur.

Anschließend wurden die Peptide in kaltem Diethylether ausgefällt, abzentrifugiert, zwei Mal mit Ether gewaschen und schließlich in tertButanol/Wasser (4:1) aufgenommen und lyophilisiert. Die Reinigung erfolgte mit präparativer RP-HPLC (Umkehrphasen-Hochdruckflüssigkeitschromatographie, Säule: RP18-, 250 x 8 mm; 2 ml/min Fluss) auf über 95 % Reinheit was mittels ESI-MS (Elektrosprayionisations-Massenspektrometrie) überprüft wurde. Freundlicherweise wurde die Peptidsynthese für uns im Labor von Herrn Dr. Hubert Kalbacher durchgeführt.

2.2.9.1 Herstellung der Hsp70:Peptid-Komplexe

Zur Komplexierung der antigenen Peptide mit Hsp70 wurden diese über Nacht bei 37 °C gemeinsam inkubiert. Die Affinität der verwendeten antigenen Peptide zu Hsp70 wurde von Dr. Markus Haug im Europium-Fluoreszenz-Assay untersucht (99). Peptide und Proteine für die Stimulation von 1 ml

Zellsuspension wurden in einem Volumen von 50 µl vorinkubiert wodurch 5 µl der vorinkubierten Lösung in einem Volumen von 100 µl Zellsuspension die gewünschte Antigenkonzentration für das Experiment ergibt. Als Bindungspuffer wurde PBS verwendet.

Mit steigenden Peptidkonzentrationen liegt hierbei jedoch stets nur ein Teil der Peptide an Hsp70 komplexiert vor, zusätzlich zu einem immer größeren Anteil an freiem Peptid. Zur Demonstration, dass die an Hsp70 komplexierten Antigene eine verstärkte T-Zellreaktion bewirken, wurden die Versuche unter „Grenzbedingungen“ durchgeführt, bei denen das Peptid alleine nicht imstande ist, eine T-Zellantwort auszulösen (sehr niedrige Konzentrationen an antigenem Peptid oder erniedrigte Zahl an APZs). Die untersuchten molaren Hsp70:Peptid-Verhältnisse lagen bei etwa 10:1 bis 1:100. Die Peptide oder Proteine, Komplexe und Peptide mit den Kontrollproteinen wurden alle stets unter denselben Bedingungen vorinkubiert. Durch Einsetzen von freiem Peptid ohne Vorinkubation wurde auch gezeigt, dass die Vorinkubation keinen Effekt, wie etwa Zersetzung, auf das Peptid hat.

Die Inkubation antigener Peptide mit Kontrollproteinen wie humanem Serumalbumin (HSA), das wie Hsp70 an viele Moleküle reversibel binden kann, diente ebenfalls der Kontrolle. Um einen Effekt durch mikrobielle Verunreinigungen der Hsp70-Lösung (die bezogene Präparation wird mit „Low Endotoxin“ bezeichnet) auszuschließen, wurde auch eine Kontrolle mit Lipopolysaccharid (LPS), einem Bestandteil der Zellmembran gramnegativer Bakterien, mitgeführt.

2.2.10 Färbungen

Zur durchflusszytometrischen wie auch fluoreszenzmikroskopischen Analyse mussten die Zellen mit unterschiedlichen Färbemethoden vorbehandelt werden.

2.2.10.1 CFSE-Färbung

Für die T-Zellproliferationsexperimente wurden die CD4⁺-Zellen mit dem Fluoreszenzfarbstoff CFSE (5(6)-Carboxyfluorescein di-acetate N-succinimidylester) gefärbt, welcher sich bei jeder Zellteilung zu gleichen Teilen in der Mutter- und Tochterzellmembran verteilt und so die Proliferation während der gesamten Stimulation berücksichtigt. Die Analyse erfolgt dann per

Durchflusszytometrie (FACS; Fluorescence Activated Cell Scanning). Gegenüber dem [³H]-Thymidineinbau kann man mit dieser Methode die Zellen zusätzlich mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern färben und weitere Zell-Merkmale untersuchen. Durch Färbung mit anti-CD4 mAk und/oder peptidbeladenen MHC II-Tetrameren konnte die Auswertung ausschließlich auf CD4⁺ T-Zellen bzw. antigenspezifische T-Zellen beschränkt werden, was der Ergebnisexaktheit zuträglich ist.

Die Zellen wurden bei 37 °C in 2 ml PBS mit 0.8 µM CFSE inkubiert und nach 10 min. die Färbung durch Zugabe von 4 ml reinem FCS (2 min, RT), das überschüssigen Farbstoff bindet, gestoppt. Nach Zugabe von 6 ml serumfreiem Medium (RPMI 1640) wurden die Zellen abzentrifugiert, in wenig 10 % PHS-Medium aufgenommen, gezählt und auf die gewünschte Zellzahl verdünnt. Nach 6-10 Tagen wurde mittels Durchflusszytometrie die Verdünnung des CFSE-Farbstoffes und somit die Proliferation bestimmt.

2.2.10.2 Färbung mit fluoreszierenden Antikörpern

Zur direkten Markierung mit Antikörpern wurden die Zellen in Rundboden-Röhrchen überführt und mit je 2 ml PBS 2 % FCS gewaschen und abzentrifugiert (1300 rpm, 4 min). Nach schwingvollem Abkippen des Überstandes wurden die Zellen in der verbliebenen Flüssigkeit (ca. 50-100 µl resuspendiert) und 1-10 µl der gewünschten fluoreszenzmarkierten monoklonalen Antikörper zugegeben. Die Lösung wurde gut vermischt und nach Inkubation für 10-20 min auf Eis im Dunkeln wurden die Zellen mit 3 ml PBS 2 % FCS gewaschen, zentrifugiert, der Überstand abgeschüttet, die Zellen wieder resuspendiert und mittels FACS analysiert. Unmittelbar vor der Messung erfolgte meist noch die Zugabe von 1 µl Propidium-Iodid, um tote Zellen von der Analyse ausschließen zu können.

Unspezifische Wechselwirkungen zwischen Antikörper und Zelle hingegen konnten anhand von Vergleichsfärbungen mit Kontrollantikörpern gleichen Isotyps ausgeschlossen werden. Die verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe in dieser Arbeit waren CFSE, APC (Allophycocyanin), PerCP (Peridin-Chlorophyllprotein), FITC (Fluoreszeinisothiocyanat), PE (Phycoerythrin) und Propidium-Iodid.

2.2.10.3 HLA-DR-Tetramere

Dank einer Kooperation unserer Arbeitsgruppe mit W. W. Kwok vom Benaroya Research Institute (BRI) at Virginia Mason (Seattle, WA, USA) konnte in unserem Labor die Methode der Detektion antigenspezifischer CD4⁺ T-Zellen mittels fluoreszenzmarkierter HLA-DR-Tetramere etabliert werden, wobei antigenspezifische humane CD4⁺ T-Zellen direkt durchflusszytometrisch beobachtet werden können.

Durch Verwendung von MHC II-Tetrameren ist ein direktes Charakterisieren, Quantifizieren und Isolieren antigenspezifischer CD4⁺-Zellen möglich (100), da sie mit einer Sensitivität von 3 in 100000 (0.003 %) (101, 102) z. B. mittels Fluoreszenzmikroskopie oder Durchflusszytometrie dargestellt werden können. Die Methode erlaubt das Entdecken, Identifizieren und Analysieren antigenspezifischer T-Zellen mit äußerst großer Sensitivität. Anhand der Fluoreszenzintensität, hervorgerufen durch die Stärke der Bindung der MHC II-Tetramere, kann man sogar Rückschlüsse auf die Affinität des TZR zum präsentierten Peptid ziehen (103).

Die humanen MHC II-Tetramere sind lösliche, rekombinante Komplexe aus HLA-DR Molekül und verschiedenen antigenen Peptiden, welche den antigenspezifischen T-Zellrezeptor der für die T-Zellerkennung benutzt wird, binden. Durch Inkubation dieser biotinylierten MHC II-Peptid-Komplexe mit an Streptavidin gekoppelte Farbstoffe erfolgt die Tetramerisierung der α/β -Dimere und es entstehen fluoreszierende MHC II-Tetramere welche mit bis zu vier T-Zellrezeptoren humaner CD4⁺ T-Zellen interagieren können, vorausgesetzt, diese haben den passenden antigenspezifischen TZR.

Die Beladung der HLA-DR-Moleküle mit je einem antigenen Peptid sowie die anschließende Tetramerisierung wurden in unserem Labor durchgeführt. Die Peptid-Beladung der Biotin-markierten HLA-DR-Mono- bzw. Dimere erfolgte hierbei wie in der Literatur (104) beschrieben. Die HLA-DR-Monomere (1 $\mu\text{g/ml}$) wurden 1:1 mit 2-fach Phosphatpuffer (200 mM, pH 5.9), der 5 mg/ml n-Octyl β -DGlucopyranosid als Detergenz enthielt, gemischt und hierzu 500 $\mu\text{g/ml}$ antigenes Peptid sowie 1 mg/ml des Proteaseinhibitors Pefabloc SC zugegeben. Nach einer Inkubationsperiode von 72 h bei 37 °C im Eppendorf-

Tube waren die Monomere mit dem antigenen Peptid beladen und es wurde 1/5 des Gesamtvolumens an Streptavidin-Allophycocyanin (SA-APC) zugegeben. Dies entspricht ca. einem molaren Streptavidin:Monomer-Verhältnis von 1:8. Nach Inkubation über Nacht bei RT im Dunkeln war die Tetramerisierung abgeschlossen und die Tetramere wurden bis zur Verwendung bei 4 °C aufbewahrt.

Um DRB1*0401/HA₃₀₇₋₃₁₉ oder DRB1*0401/GAD₅₅₅₋₆₅₇ Tetramere herzustellen wurden die Peptide HA₃₀₇₋₃₁₉ bzw. GAD₅₅₅₋₆₅₇ benutzt, für DRB1*1101/TT₉₄₇₋₉₆₆ Tetramere das Peptid TT₉₄₇₋₉₆₆. Als Kontroll-Tetramere dienten jeweils „leere“, also nicht mit Peptiden beladene oder mit nicht zur Stimulation verwendeten Peptiden beladene Tetramere.

Die Färbung mit HLA-DR-Tetrameren wurde in speziellen 5 ml Rundboden-Röhrchen für die spätere FACS-Messung durchgeführt. Darin wurden die zu färbenden Zellen zunächst mit 10 % PHS-Medium gewaschen, dann abzentrifugiert und der Überstand abgeschüttet. Die Resuspension erfolgte in 50 µl 10 % PHS-Medium wozu 0.5 µl (entspricht einer Konzentration von ca. 4 µg/ml) des jeweiligen HLA-DR-Tetramers zugegeben wurden. Es folgte eine Inkubation im Brutschrank für 3 h bei 37 °C. Danach wurden die Zellen 10 min auf Eis und im Dunkeln mit anderen Antikörpern gefärbt (z.B. anti-CD4-PE oder anti-CD19-APC) und dann mit 3 ml PBS 2 % FCS gewaschen. Unmittelbar vor Analyse folgte die Zugabe von 1 µl Propidium-Iodid je Probe.

2.2.11 Durchflusszytometrie

Mittels eines Durchflusszytometers (FACS-Gerät) können die gefärbten Zellen detektiert und analysiert werden. Diese Analyse umfasst Lichtstreuungseigenschaften sowie verschiedene Fluoreszenzen wie z.B. CFSE, extra- oder intrazelluläre Fluoreszenzantikörper oder fluoreszenzmarkierte MHC II-Tetramere. Durch die unterschiedlichen Färbungen können dabei sowohl Proliferation als auch Vitalität und Expression bestimmter Oberflächenmoleküle dargestellt werden.

Die zu analysierenden Zellen werden in das Gerät gesaugt und dort in einem laminaren Strom an einem dualen Laserstrahl (Helium-Neon- und Argonlaser -

633 nm bzw. 488 nm Wellenlänge) vorbeigeleitet. Dessen Licht wird bei jeder einzelnen Zelle gestreut und zusätzlich regt der monochromatische Laserstrahl die Fluoreszenzfarbstoffe zur Emission höherwelligen Lichtes an, welches durch ein optisches Linsen-, Spiegel- und Filtersystem gebündelt und zerlegt wird. Spezifische Detektoren messen schließlich getrennt die charakteristische Wellenlänge der Fluoreszenzsignale, ihre relative Fluoreszenzintensität und das Streulicht.

Das in unserem Labor verwendete FACS-Gerät kann neben der Bestimmung von Größe und Granularität auch bis zu vier Fluoreszenzfarbstoffe unterschiedlicher Emissionsspektren gleichzeitig messen. Die Streulichtparameter sind dabei Vorwärtsstreulicht (Streuung entlang der Laserstrahlrichtung -FSC), welches Zellpopulationen aufgrund ihrer Größe definiert, und das Seitwärtsstreulicht (Streuung an Zellstrukturen im rechten Winkel zum Laserstrahl -SSC) als relatives Maß für die intrazelluläre Granulation der Zellen.

Durch manuelle Einstellung einfach gefärbter Zellen vor der Messung wurde eine Überlappung der einzelnen Emissionsspektren kompensiert. Die Verstärkerspannungen der verschiedenen Messkanäle wurden dabei anhand einer Kontrollfärbung so eingestellt, dass sich die Zellen im jeweiligen Kanal zwischen 100 und 101 der Fluoreszenzskala befanden. Bei Stimulation mit SEB oder PHA werden die meisten CD4⁺ T-Zellen unspezifisch aktiviert und das Histogramm zeigt definierte Maxima der Zellteilungen, die Stimulation mit antigenen Peptiden aktiviert nur einen kleinen Teil der T-Zellen spezifisch, so dass sich keine definierte Teilungsmaxima ergeben.

Die Erfassung und Auswertung der Fluoreszenz- und Streulichtemissionen von 10000 bis 50000 Zellen je Probe wurde mittels der Programme WinMDI und CellQuest bzw. CellQuest Pro durchgeführt. Jeder dargestellte Punkt entspricht dabei einer gemessenen Zelle.

2.2.12 Fluoreszenzmikroskopie

Um die Aufnahme fluoreszenzmarkierter antigener Peptide unter dem Mikroskop zu untersuchen, wurden im Falle der B-LCLs zunächst je 100 µl der Zellen, vorliegend in einer Suspension von ca. 2×10^5 Zellen/ml, für 5 min bei

300 rpm in der Zytocentrifuge auf einen Objektträger zentrifugiert. Daraufhin wurden sie umgehend mit Einbettmedium überschichtet, eingedeckelt, durch Umrandung der Deckgläschen mit Nagellack fixiert und schließlich unter Einsatz geeigneter Filter für Cy3 (Wüfeleinheit: U-MWG, Bandpass-(510-550 nm) Anregungsfilter, Langpass-(590 nm) Barrierefilter, dichroischer Spiegel: 570 nm) im Fluoreszenzmikroskop analysiert. Bildaufzeichnung mit einer Digitalkamera sowie die Bildverarbeitung erfolgte mittels der cell F[^]Imaging-Software.

Bei den Versuchen mit dendritischen Zellen wurden diese zunächst mit einem Zellschaber aus ihrer Zellkulturplatte abgelöst und je 0.5 ml ($2 - 10 \times 10^5$ Zellen) pro Kammer auf einen 4-Kammer-Objektträger gegeben. Zur Adhäsion der Zellen an den Objektträger wurden diese 3 h im Brutschrank inkubiert, danach das Medium abgenommen und die adhärennten Zellen einmal mit PBS gewaschen. Im Anschluss wurde der Kammeraufsatz vom Objektträger entfernt und die Zellen eingedeckelt.

3 Ergebnisse

Grundlage der Versuche war die in unserem Labor durchgeführte Arbeit von Dr. Markus Haug über die verstärkte Aktivierung humaner, antigenspezifischer T-Zellen durch Hsp70-gebundene Peptide (99). Diese Versuche sollten in dieser Arbeit fortgeführt werden und insbesondere auch weitere Informationen über den Mechanismus dieser Hsp70-verstärkten CD4⁺ T-Zellaktivierung gewonnen werden.

3.1 Detektion spezifischer T-Zellproliferation in einem humanen System

In dieser Arbeit wurde das bereits etablierte Setting der T-Zellproliferationsexperimente verwendet (s. 2.2.8). Die PBMCs gesunder Donoren bekannten HLA-DR-Haplotyps wurden, wie in der Methodik beschrieben (s. 2.2.1), isoliert. Die PBMCs wurden in RPMI 1640-Medium, das mit 10 % gepooltem humanem Serum versetzt war, kultiviert. Die Anzahl der APZs beeinflusst die T-Zellproliferation und den HSP-Effekt, sodass die CD4⁺ T-Zellen zunächst isoliert wurden um nach Stimulation entweder mit antigenem Peptid alleine oder Hsp70:Peptid-Komplexen mit einer definierten Anzahl APZs gemeinsam kultiviert zu werden.

Für die verschiedenen HLA-Typen sind unterschiedlich geeignete Peptide beschrieben, in dieser Arbeit wurden DRB1*1101-Donorzellen mit Tetanus-Peptid TT₉₄₇₋₉₆₆, DRB*0401 mit Hämagglutinin-Fragment HA₃₀₇₋₃₁₉ oder GAD₅₅₅₋₆₅₇ *in vitro* stimuliert. Die verwendeten Peptidsequenzen wurden in einem Epitop-Vorhersage-Algorithmus SYFPEITHI (105) als geeignete Liganden bzw. T-Zellepitope vorhergesagt und waren von Dr. Markus Haug mit einem Europium-Fluoreszenz-Assay auf ihre Hsp70-Affinität getestet worden. TT₉₄₇₋₉₆₆ aus dem Tetanustoxin gilt als relativ universelles CD4⁺ T-Zellepitop, wir verwendeten es für HLA-DR*11, HA₃₀₇₋₃₁₉ eignet sich als T-Zellepitop für HLA-DRB1*0101 und HLA-DRB1*0401. Zwar eignen sich etliche Peptidsequenzen aus dem Tetanustoxin prinzipiell zur *in vitro* T-Zell-Stimulation und von vier getesteten Sequenzen zeigten alle eine Affinität zu Hsp70 (79, 99). Für unsere

DRB*1101-Spender hatte sich in mehrfach durchgeführten Experimenten jedoch das TT₉₄₇₋₉₆₆ Fragment bewährt (Daten nicht gezeigt).

Peptid	AS-Sequenz	Ligand
TT ₉₄₇₋₉₆₆	FNNFTVSFWLRVPKVSASHL	DRB1*1101
HA ₃₀₇₋₃₁₉	PKYVKQNTLKLAT	DRB1*0401, *0101, *0402
GAD ₅₅₅₋₆₅₇	NFFRMVISNPAAT	DRB1*0401

Durch eine stattgehabte Immunisierung gegen Tetanus-Toxin bzw. Influenza sind spezifische CD4⁺ T-Gedächtnis-Zellen gegen diese Peptide im peripheren Blut der gesunden Donoren vorhanden und können nach MACS-Isolierung (s. 2.2.2) der CD4⁺ T-Zellen *in vitro* stimuliert werden. Die Isolation erfolgte aus peripherem Blut gesunder, HLA-typisierter Spender (DRB* 0401, DRB* 0101 und DRB*1101) oder Buffy-Coats von HLA-typisierten Blutbank-Spendern.

Als APZs wurde die CD4-negative und durch Bestrahlung inaktivierte Zellfraktion (s. 2.2.8) der PBMCs verwendet und mit dem Peptid bzw. Hsp70:Peptid-Komplexen für 3 Stunden inkubiert. Diese Zeitspanne hatte sich zuvor als für eine Antigenaufnahme ausreichend gezeigt, längere Inkubationszeiten erbrachten keinen Vorteil.

Die verwendete „low endotoxin“ Hsp70-Präparation stammt rekombinant aus *E.coli* Bakterien und weist laut Herstellerangaben ein Endotoxin-Level von <0.1 Units Endotoxin auf.

Wichtigste Methode war die Analyse der proliferierten Zellen 6-10 Tage nach der Stimulation mittels Durchflusszytometrie (s. 2.2.11). Die stattgehabte Proliferation wurde dabei anhand CFSE-Verdünnung gemessen, es wurden also entweder die Zahl proliferierter CD4⁺ T-Zellen (Färbung mit anti-CD4) oder der Anteil antigenspezifischer CD4⁺ T-Zellen analysiert. Letztere konnten mittels zusätzlicher Färbung mit fluoreszenzmarkierten HLA-DR-Tetrameren (s. 2.2.10.3) identifiziert werden.

In Abbildung (Abb) 1 ist beispielhaft das FACS-Bild der CD4⁺ T-Zellproliferation eines DRB1*1101-Individuums nach Stimulation mit antigenem Peptid als Punktediagramm dargestellt. Die untersuchten Zellen werden zunächst mittels

ihrer morphologischen Scattereigenschaften unterschieden. Die Verstärkerspannungen für FSC und SSC wurden so eingestellt, dass in der FSC- gegen SSC-Darstellung die übliche Verteilung zustande kam: Lymphozyten (T-Zellen, B-Zellen und NK-Zellen) sind klein und kaum granuliert und weisen dadurch in FSC und SSC niedrige Werte auf. Um diese Zielpopulation konnte nun, wie in Abb. 1A dargestellt, eine Region gesetzt werden: R1. In einem weiteren Diagramm (Abb. 1B) wurden nur noch diese Zellen dargestellt. Hinsichtlich ihrer Fluoreszenz wurde darin die Region R2 definiert, welche diejenigen Zellen aus R1 umschließt, die zusätzlich CD4-positiv sind (mit Antikörper gefärbt), also nur T-Helferzellen. Die im Folgenden dargestellten Ergebnisse, welche die proliferierten CD4-positiven Zellen analysieren, zeigen nur noch die Zellen aus R1 und R2.

Zur statistischen Auswertung kann im Punktediagramm ein Quadrant gesetzt werden, der es erlaubt, Zellen als doppelt negativ, einfach positiv oder doppelt positiv zu definieren. Die Software berechnet daraus die absoluten und relativen Häufigkeiten der verschiedenen Zellen. In den nachfolgenden Abbildungen wird im oberen linken Quadranten der Prozentsatz der gemessenen $CD4^{+high}$ CFSE^{low} T-Zellen ($CD4^{+}$ Zellen die durch Zellteilung den Farbstoff CFSE abgegeben haben) an der gemessenen Gesamtzellzahl als Anteil proliferierter Zellen dargestellt.

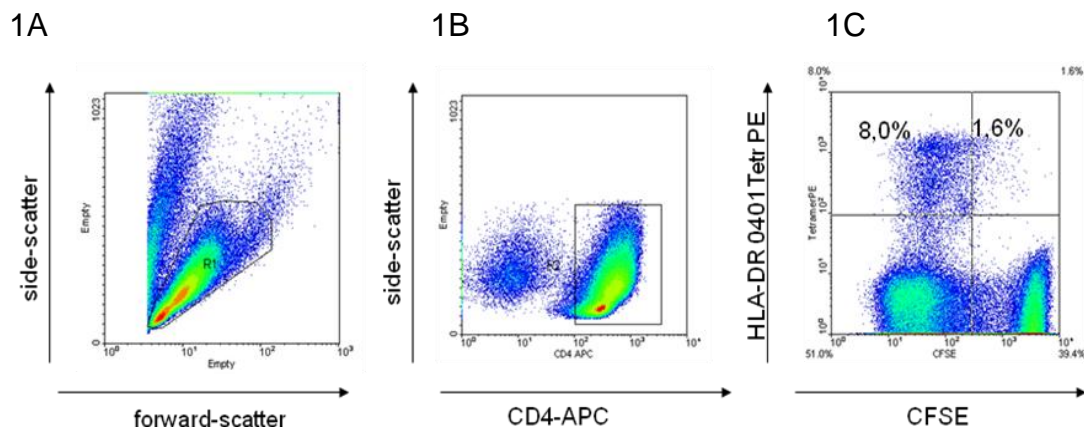


Abb. 1: Auswertung der CD4⁺ T-Zellen nach Proliferation

Isolierte CD4⁺ T-Zellen eines DRB-0401 Donors, der gegen Influenza immunisiert war, wurden mit HA₃₀₇₋₃₁₉-Peptid stimuliert und nach einer Woche durchflusszytometrisch analysiert.

1A: FSC/SSC-Dichteplot (FSC: x-Achse, SSC: y-Achse). Die Lymphozytenpopulation wird durch eine Region (R1) definiert.

1B: Die Zellen der definierten Region wurden im nächsten Dichteplot aufgrund ihrer Fluoreszenz weiter eingegrenzt (in diesem Fall x-Achse: CD4-APC).

1C: Die Zellen der Region 2 wurden anhand ihrer Fluoreszenz analysiert. Die antigenspezifischen CD4⁺ T-Zellen können mittels der HLA-DR-Tetramere analysiert werden. Die antigenspezifischen T-Zellen werden in der oberen Hälfte angezeigt (x- und y-Achse positiv). Die Prozentzahlen entsprechen dem Anteil für die jeweilige Fluoreszenz positiver Zellen innerhalb des jeweiligen Quadranten und der definierten Region. Antigen-spezifische proliferierte Zellen finden sich im linken oberen Quadranten.

Es wurde in den Experimenten in dieser Arbeit jeweils die Stimulation der CD4⁺ T-Helferzellen mit Antigen alleine mit der Stimulation durch Hsp:Antigen-Komplexe unter verschiedenen Bedingungen verglichen.

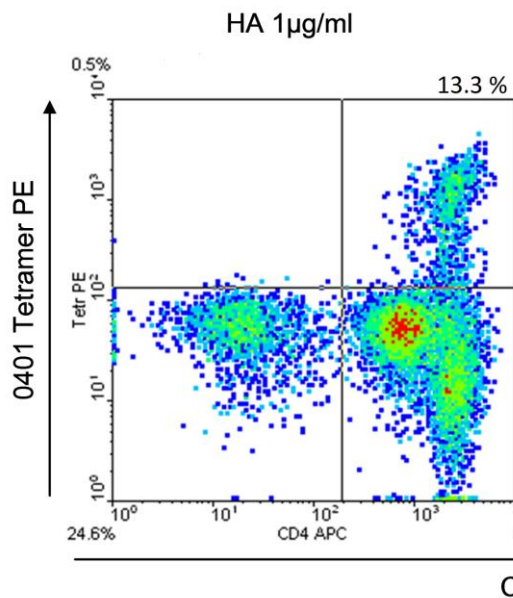
3.1.2 Einfluss von Hsp70 auf die T-Zellproliferation

Wie bereits beschrieben, stimulierten wir CD4⁺ T-Zellen mit oder ohne Komplexierung der antigenen Peptide an Hsp70, um dessen Einfluss auf die Aktivierung im Sinne einer Proliferationsverstärkung zu untersuchen. Abbildungen 2 und 3 zeigen die Detektion antigenspezifischer T-Zellen nach Stimulation von PBMCs gesunder Donoren mit antigenem Peptid. Beim Vergleich der CD4⁺ T-Zellstimulation von unkomplexiertem und an Hsp70 komplexiertem Peptid wurde mit komplexiertem Peptid eine erhöhte Anzahl

(Abb. 2) sowie eine verstärkte Proliferation (Abb. 3) antigenspezifischer CD4⁺ T-Zellen beobachtet.

Dieser Effekt ist sowohl bei unterschiedlichen Spendern gleichen HLA-Typs als auch unabhängig vom gewählten Antigen zu beobachten. Die Stimulation mit Hsp70 alleine führt zu keiner sichtbaren Proliferation (Abb. 3B). Werden Peptid und HSP nur gemeinsam beigegeben, ohne dass zuvor eine Komplexierung stattgefunden hat, so bleibt der verstärkende Effekt des HSP aus (Daten nicht gezeigt).

2A



2B

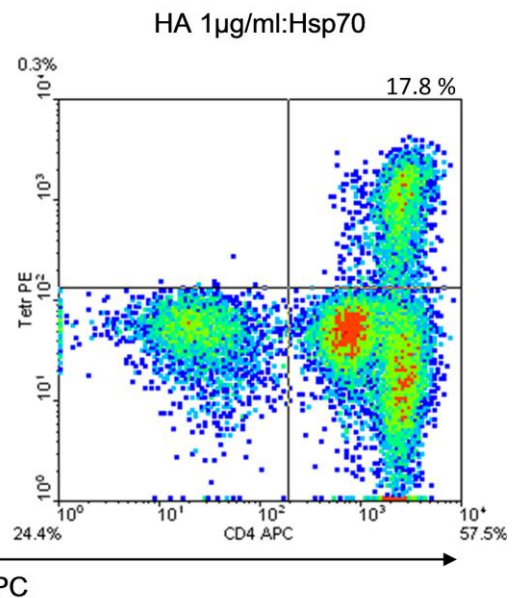


Abb. 2: Durch Hsp verstärkte Detektion antigenspezifischer CD4⁺ T-Zellen

Die Auswertung erfolgte analog zu Abbildung 1. Dargestellt ist ein Punktediagramm der durchflusszytometrischen Analyse der CD4⁺ T-Zellen eines DRB1*0401-Donors nach Stimulation mit 1 µg/ml HA-Peptid (Abb. 2A) bzw. diesem komplexiert an 1 µg/ml Hsp70 (Abb. 2B) und 6tägiger Kultur (37 °C, 5 % CO₂). Es wurde wie beschrieben eine Region um die Lymphozyten definiert und nur diese dann mit zwei Fluoreszenzen dargestellt. Die antigenspezifischen CD4⁺ T-Zellen finden sich im rechten oberen Quadranten (doppelt positiv).

Es ist eine Zunahme der antigenspezifischen CD4⁺ T-Zellen (13.3 % versus 17.8 %) nach Stimulation mit dem an Hsp70 komplexierten Peptid zu sehen.

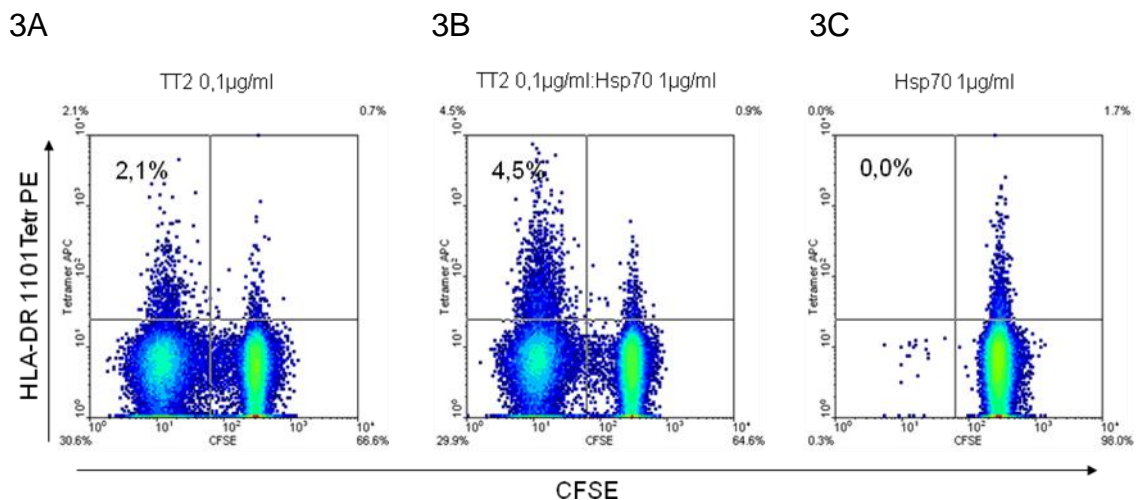


Abb. 3: HSP verstärkt die Proliferation antigenspezifischer T-Zellen

Die Abbildung zeigt die Proliferation antigenspezifischer T-Zellen eines DRB*1101 Donors nach Stimulation mit dem antigenen Peptid TT₉₄₇₉₆₆. Die Auswertebedingungen waren wie in Abbildung 1 dargestellt. Für die gemessenen Zellen wurde eine Region der CD4⁺ Zellen erstellt, welche dann letztendlich zur Abbildung kommen. Prolifizierte Zellen innerhalb dieser Region sind für den CFSE-Farbstoff (x-Achse) nur noch niedrig positiv, den Anteil proliferierter antigenspezifischer CD4⁺ T-Zellen findet man oben links. Spezifität ergibt sich durch die Färbung mit dem TZR-gebundenen Tetramer (y-Achse).

Die Stimulation erfolgte mit 1 µg/ml Peptid alleine (Abb. 3A) oder Peptid komplexiert an Hsp70 (Abb. 3B). Bei Stimulation mit Hsp alleine zeigen sich weder spezifische Zellen noch Proliferation (Abb. 3C).

Als zusätzliche Information ist im Vergleich zu Abbildung 2 hier noch die Proliferation enthalten. Die Stimulation führte zu einer Zellproliferation, wohingegen unstimulierte bzw. mit Hsp70 alleine stimulierte PBMCs keine signifikante Proliferation zeigten (Abb. 3C). Es kann also der verstärkende Effekt von Hsp70 gezeigt werden.

3.2 Hsp70 verstärkt die CD4⁺ T-Zellstimulation mit ganzem Tetanusprotein

Es stellte sich die Frage, ob eine durch Hsp70 verstärkte T-Zellaktivierung ausschließlich mit dem kurzen Peptidfragment (TT₉₄₇₋₉₆₆) gefunden wird, oder ob dies auch bei Stimulation mit ganzem, unprozessierten Tetanustoxin-Protein zutrifft.

Hsp70 wurde dazu mit TT analog zu den Versuchen mit dem Peptid über Nacht bei 37 °C und 5 % CO₂ vorinkubiert, um auch hier eine Interaktion im Sinne einer Komplexbildung zu erlauben. Anschließend wurden CD4⁺ T-Zellen des gegen Tetanus-Toxin (TT) immunisierten Donors (DRB*1101) mit dem ganzen antigenen TT-Protein alleine (Abb. 4a) oder Hsp:TT-Protein-Komplexen (Abb. 4b) stimuliert. Als Kontrolle wurden Hsp70 und TT, analog zu den Versuchen mit antigenem Peptid, ohne Vorinkubation zur Zellkultur gegeben (Abb. 4c und 4d). CD4⁺ T-Zellen sowie APZs wurden dabei jeweils zu gleichen Teilen für 6 Tage kultiviert, was die Teilungsaktivität für Proliferationsversuche in idealer Weise berücksichtigt.

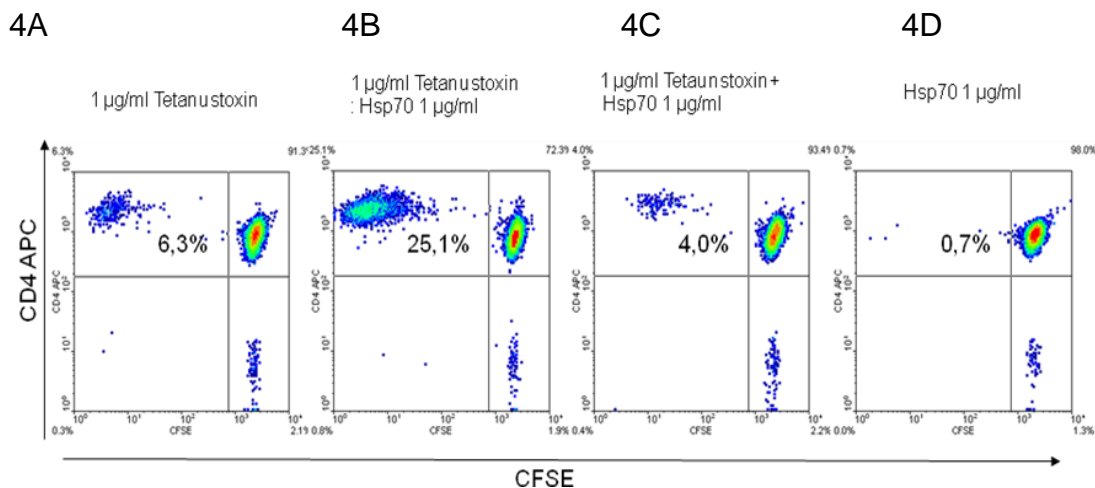


Abb. 4: Hsp-verstärkte antigenspezifische CD4⁺ T-Zellantwort bei Stimulation mit ganzem Tetanusprotein

Zur Stimulation wurden jeweils 200000 CFSE-gefärbte CD4⁺ T-Zellen in einem Loch mit 200 µl Gesamtvolumen einer 96-Loch Flachbodenplatte kultiviert. Es erfolgte die Zugabe 200000 autologer, bestrahlter APZs woran sich nach Stimulation mit dem Tetanustoxin eine 6-tägige Kultur anschloss. Detektiert wurde die Gesamtzahl proliferierter CD4⁺ T-Zellen, diese befinden sich im linken oberen Quadranten.

Die Abbildungen zeigen als Punktediagramm der FACS-Analyse die Proliferation der CD4⁺ T-Zellen eines DRB1*1101-Donors nach Stimulation mit 1 µg/ml ganzem Tetanustoxin (Abb. 4A) bzw. diesem komplexiert an Hsp70 (Abb. 4B). Die Abbildungen 4C und D zeigen die Kontrollen. Auf der x-Achse ist CFSE als Proliferationsmarker aufgetragen, entlang der y-Achse die CD4-Färbung.

Anhand der Auswertung der proliferierten Zellen, dem Prozentsatz an „CFSE^{low}CD4^{high}“ T-Zellen an der gemessenen Gesamtzellzahl ist die verstärkte Proliferation auch mit dem ganzen Protein im Komplex mit Hsp70 erkennbar, in dem gezeigten Experiment um mehr als das Vierfache (25.1 % CFSE^{low}CD4^{high} T-Zellen stimuliert mit Hsp:Protein-Komplexen versus 6.3 % CFSE^{low}CD4^{high} T-Zellen stimuliert mit Protein alleine). Dieser Effekt ist von der Komplexbildung zwischen Protein und Hsp abhängig, denn werden beide Komponenten getrennt beigegeben ist die Aktivierung vergleichbar der mit dem Protein alleine (Abb. 4C).

Bei diesem Setting bleibt jedoch unklar, ob dies eine Reaktion auf ein bestimmtes Peptid, wofür eine intrazelluläre Aufnahme und Prozessierung des Proteins nötig wäre, und/oder das gesamte Protein ist. Darum wurden die Zellen zusätzlich mit einem HLA-DRB1*1101 Tetramer gefärbt der an TT₉₄₇₋₉₆₆-peptidspezifische T-Zellen bindet (Abb. 5). Hierbei zeigte sich, dass auch bei Hsp70-Komplexierung von ganzem, intakten TT-Protein eine verstärkte Detektion TT₉₄₇₋₉₆₆-peptidspezifischer CD4⁺ T-Zellen gefunden wird (8 % mit Hsp:TT-Protein-Komplexen versus 1 % Tetramer-positive Zellen mit TT-Protein alleine).

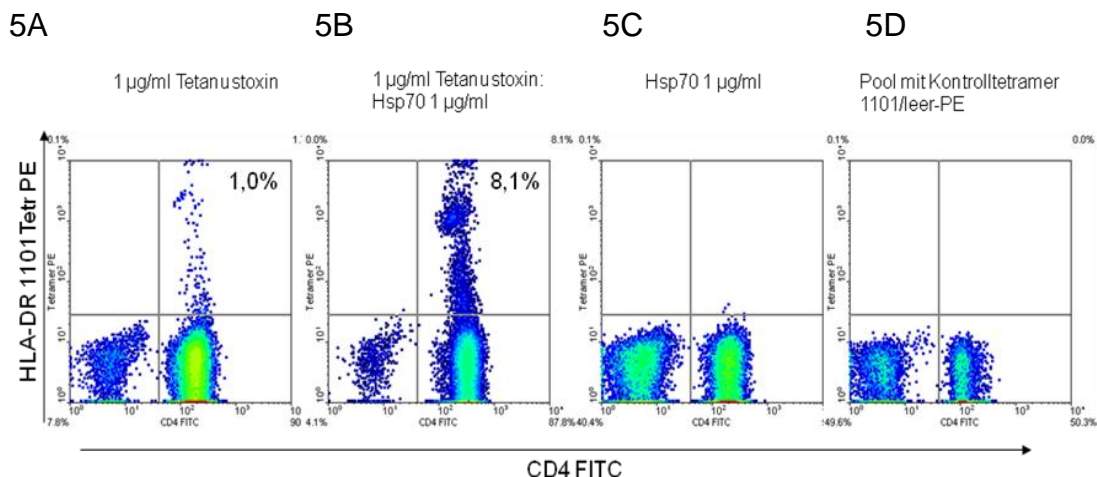


Abb. 5: Ganzes Tetanusprotein komplexiert an Hsp70 verstärkt die Aktivierung von $TT_{947-966}$ -spezifischen T-Zellen

Zusätzliche Färbung mit einem für das $TT_{947-966}$ -Peptid spezifischen PE-gebundenen Tetramer bei ansonsten identischem Setting zu Abbildung 4. Die verwendeten Zellen waren bereits eine Woche mit 1 $\mu\text{g/ml}$ ganzem Tetanusprotein TT inkubiert worden, um die Zahl der antigenspezifischen Zellen zu erhöhen und den Proliferationseffekt dadurch deutlicher darstellen zu können (Vorstimulation). Anschließend erfolgte die Stimulation mit 1 /ml Tetanustoxin (Abb. 5A), diesem komplexiert an Hsp70 (Abb. 5B) sowie mit Hsp70 alleine (Abb. 5C). Auf der x-Achse ist hier CD4 aufgetragen, entlang der y-Achse der HLA DR1101 Tetramer. Abbildung 5D zeigt die Färbung mit einem nicht epitopspezifischen, „leeren“ Kontrolltetramer.

Durch die durchgeführte zusätzliche Färbung kann gezeigt werden, dass die Stimulation mit Hsp:Protein-Komplexen genau die Proliferation der für dieses Antigen spezifischen Zellen steigert (1.0 % vs. 8.1 %). Da durch die Tetramer-Färbung epitopspezifische Zellen analysiert werden, ist diese Färbung ein Marker für die Prozessierung des Tetanusproteins in der APZ. Wird das $TT_{947-966}$ -Peptid präsentiert, kann es von den antigenspezifischen $CD4^+$ Zellen erkannt werden, welche aktiviert werden. Wie sich anhand dieser Abbildung zeigt geschieht dies verstärkt, wenn das Protein an Hsp komplexiert war (Abb. 5B). Die Färbung mit einem Kontrolltetramer ohne Antigen zeigt keine Spezifität (Abb. 5D). Abbildung 6 fasst die Ergebnisse der $CD4^+$ T-Zellproliferation durch Stimulation mit an Hsp70-komplexiertem, ganzem TT-Protein in verschiedenen, unabhängig voneinander stimulierten Proben zusammen, $n=3$. Als Kontrolle diente die Stimulation mit dem Adenosin-Triphosphat-Fragment von Hsc70 (ATPf), welches ähnlich hergestellt wird wie Hsp70, aber keine

Peptidbindungsdomäne besitzt, komplexiert an das Tetanusprotein. Des Weiteren erfolgte die Zugabe von Hsp70 und Protein ohne Vorinkubation und dadurch Komplexbildung jeweils in identischen Konzentrationen wie vorgängig beschrieben.

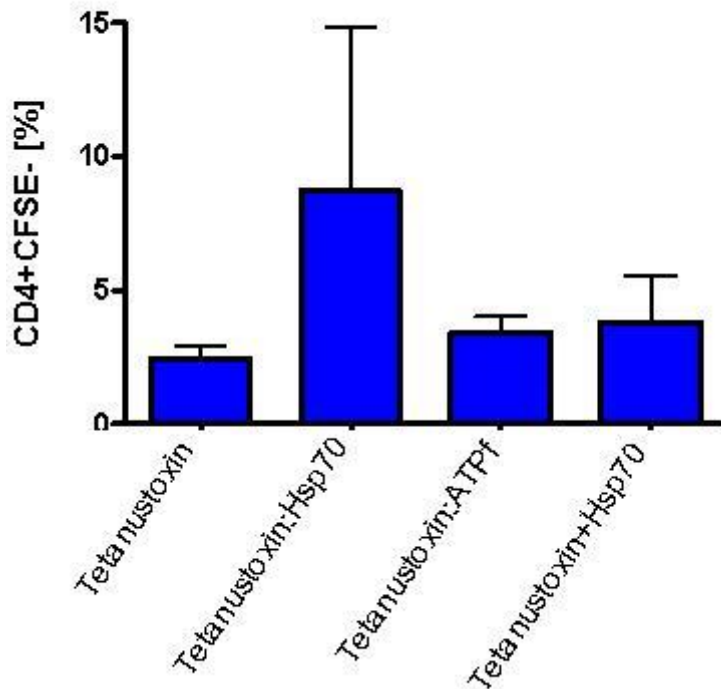


Abb. 6: Zusammenfassende Darstellung der Aktivierungsverstärkung von Hsp70

In diesem Balkendiagramm ist der Prozentsatz proliferierter $CD4^+$ T-Zellen ($\%CD4^+CFSE^{low}$, vgl. Abb.4) von 3 Versuchen, die wie bereits beschrieben durchgeführt wurden, zusammenfassend dargestellt. Die Vorinkubation mit den Kontrollen Hsc70-ATPf sowie Tetanustoxin und Hsp70 unkomplexiert erfolgte in gleicher Konzentration wie mit Hsp:TT-Komplexen. Es sind der Mittelwert sowie die Standardabweichung unabhängig voneinander stimulierter Proben dargestellt.

Eine Verstärkung bei Stimulation mit Hsp:Protein-Komplexen im Vergleich zu allein mit dem Protein stimulierten Zellen ist erkennbar.

Zusammenfassend konnte die schon bekannte Verstärkung antigenspezifischer $CD4^+$ T-Zellproliferation durch Hsp70 reproduziert werden. Dieser Effekt konnte nun auch für das ganze TT-Protein gezeigt werden. Der Einfluss besteht dabei auf die $CD4^+$ Zellproliferation allgemein als Gemisch TT-reaktiver T-Zellen

unterschiedlicher Peptidspezifitäten. Ebenso wird der Effekt auch für ein bestimmtes Epitop, hier gezeigt anhand TT₉₄₇₋₉₆₆-spezifischer HLA-DR-Tetramere, erzielt. Wie bei den Peptiden ist auch bei Stimulation mit ganzem Protein eine Komplexierung des Proteins an Hsp70 Voraussetzung für die verstärkte T-Zellaktivierung.

Die hier gefundene Hsp70 verstärkte T-Zellproliferation auch nach Stimulation mit ganzem TT-Protein ist daher ein wichtiges Indiz dafür, dass Hsp70-gebundene Proteine und Peptide vor der Peptidpräsentation in die APZs internalisiert und dort prozessiert werden. In den weiteren Versuchen dieser Arbeit sollten nun die Mechanismen zu Aufnahme und Prozessierung Hsp-gebundener Peptide/Proteine näher untersucht werden.

3.3 Untersuchung der Antigenpräsentation unter physikalischer Blockade der Endozytose

Da die Daten aus den bisherigen Proliferationsexperimenten ebenso wie aus der Literatur auf eine Aufnahme der Antigene durch APZs in der MHC II-vermittelten T-Zellpräsentation hinweisen, sollte dieser Mechanismus näher untersucht werden. Der Fokus richtete sich darauf, weitere Hinweise auf die Endozytose von Peptid- bzw. Hsp:Protein-Komplexen in APZs zu finden und die zugrundeliegenden Mechanismen durch Blockade bestimmter Aufnahmewege näher zu untersuchen.

3.3.1 Endozytoseuntersuchung mittels fluoreszenzmarkiertem antigenem Peptid

3.3.1.1 Durchflusszytometrischer Ansatz

Um zu bestätigen, dass eine Endozytose der antigenen Peptid und Hsp:Peptid-Komplexen in APZs stattfindet, wurden FITC-markierte Peptide (s. Material) verwendet. Als APZs dienten als potenteste Vertreter dieser Gruppe aus Peripherblut gesunder Spender isolierte Monozyten (Isolierung s. 2.2.1). Die Untersuchung der Aufnahme erfolgte durchflusszytometrisch sowie ergänzend fluoreszenzmikroskopisch.

Um die Detektion extrazellulärer Bindung von Fluoreszenzpeptid an der Zelloberfläche zu minimieren, wurden die Zellen nach Inkubation mit dem

Fluoreszenzpeptid 5 Minuten mit Trypanblau inkubiert, welches an der Oberfläche gebundene Fluoreszenzen neutralisiert. Nachdem dieses heruntergewaschen war, wurden die Zellen zusätzlich mit einem anti-CD14-Antikörper gefärbt, um die Auswertung spezifiziert auf Monozyten zu ermöglichen.

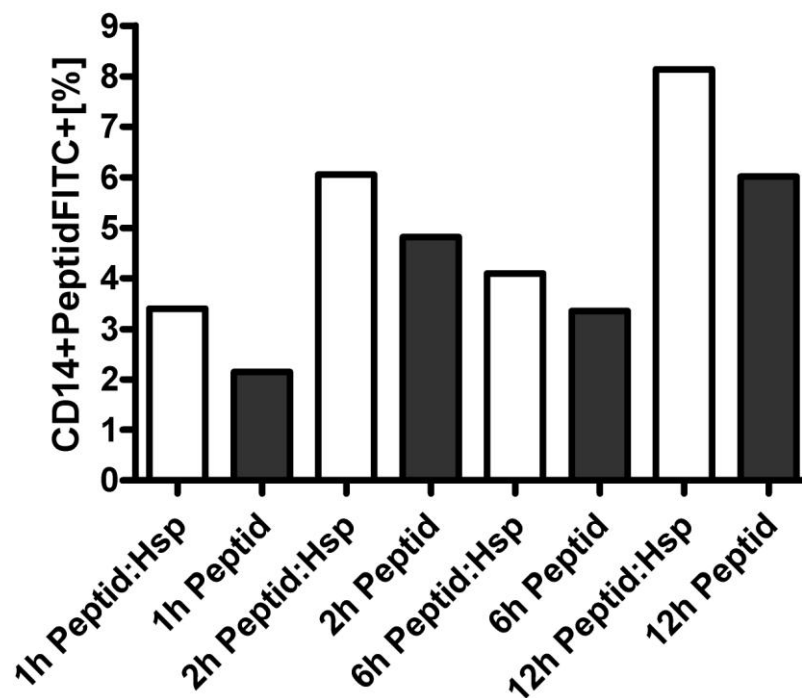


Abb. 7: Durchflusszytometrische Analyse von mit Fluoreszenzpeptid inkubierten Monozyten. Gezeigt ist eine numerische Zusammenstellung einer durchflusszytometrischen Analyse von Monozyten, die für verschiedene Zeitspannen (1-12 Stunden) mit direkt FITC-markiertem Peptid oder FITC-markiertem Peptid komplexiert an Hsp inkubiert wurden. Die verwendete Antigenkonzentration betrug 1 µg/ml., die Balken entsprechen dem Prozentsatz CD14+ Monozyten, die eine FITC-Fluoreszenz zeigen und somit das antigene Peptid aufgenommen haben (vgl. oberer rechter Quadrant CD14^{high}FITC^{high}).

In diesen Versuchen analysierten wir nach verschiedenen Inkubationszeiten der APZs mit fluoreszenzmarkiertem Peptid mittels FACS die FITC-Fluoreszenz und dadurch Peptidaufnahme. Der CD14-Antikörper erlaubt die Identifizierung der Monozyten. Es zeigt sich zum einen, dass die Anzahl fluoreszenzpositiver Monozyten, die das FITC-Peptid aufgenommen hatten, zu allen Zeitpunkten

höher war, wenn das Peptid im Komplex mit Hsp70 zugegeben wurde. Dieser Effekt war auch bei jeweils einer Zehnerpotenz höheren und niedrigeren Antigenkonzentration zu beobachten. Zum anderen scheint nach 12-stündiger Inkubation ein Maximum der Aufnahme sowohl des Peptids alleine als auch des an Hsp70-gebundenen Peptides erreicht zu sein, längere Inkubationszeiten führten zu keiner weiteren Verstärkung (Daten nicht gezeigt).

3.3.1.2 Fluoreszenzmikroskopie

Die Fluoreszenzmikroskopie erlaubt eine Betrachtung der Zellen selber, wodurch eine intrazelluläre Fluoreszenz und damit Peptidaufnahme visualisiert werden kann. Anhand der Verteilung der Fluoreszenz in der Zelle können Aussagen darüber getroffen werden, ob das Peptid im Zytosol (gleichmäßige Verteilung) oder in membranumschlossenen Kompartimenten (mehr punktuelle Verteilung) in der Zelle vorliegt. Daher sollten im Fluoreszenzmikroskop als weitere Methode die Aufnahme von FITC-Peptid mit und ohne Hsp70 in APZs untersucht werden, um die Ergebnisse aus der Durchflusszytometrie zu erhärten und zu ergänzen.

Abbildung 8 zeigt ein Beispiel für die fluoreszenzmikroskopische Aufnahme von FITC-markiertem Peptid bzw. Hsp:Peptid-Komplexen in Monozyten. Durch eine Überlagerung von Durchlicht- und Fluoreszenzaufnahme mittels der cell F⁴Imaging-Software entstanden Darstellungen wie in Abbildung 8.

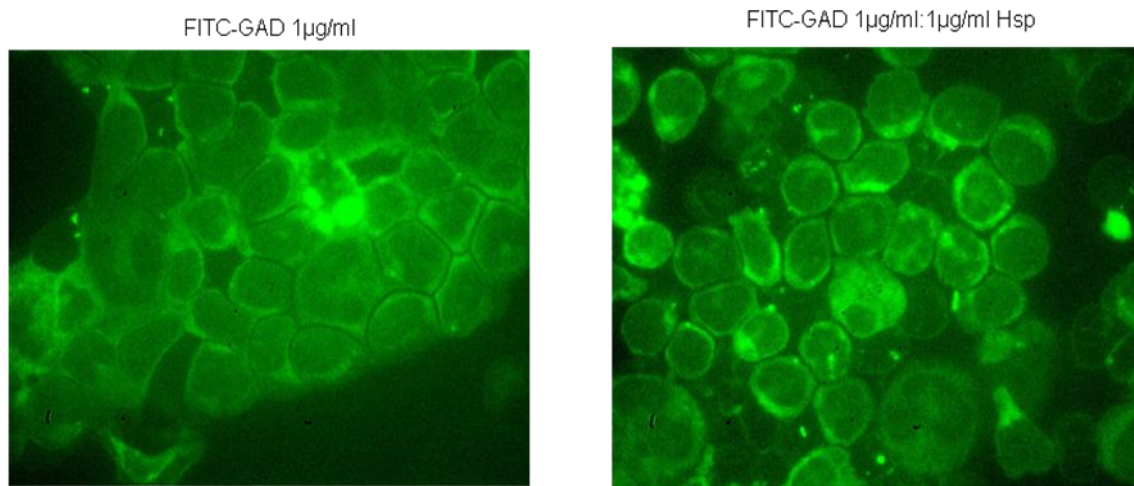


Abb. 8: Fluoreszenzmikroskopische Analyse der Peptidaufnahme

Isolierte Monozyten eines DRB*0101 Donors wurden mit fluoreszenzmarkiertem Peptid bzw. Hsp:Peptid-Komplexen für 4 Stunden inkubiert, anschließend auf Objektträger gebracht und unter dem Fluoreszenzmikroskop ausgewertet. Die Aufnahmen erfolgten mittels einer Olympus U-TV1 X Digitalkamera und dem Olympus BX60 Mikroskop, das 40 x Luftobjektiv (numerischen Apertur 0.75, UPlanFI 40x/0.75/0.17, Olympus) wurde mit Filtern kombiniert (Anregungsfilter; Langpass-(590 nm) Barrierefilter; dichroischer Spiegel: 570 nm). Identisch behandelte Kontrollzellen wurden ebenfalls mikroskopiert.

An dieser beispielhaften Abbildung des gewonnenen Bildmaterials ist zu erkennen, dass zwar die Zellen bei Inkubation mit Hsp:Peptid-Komplexen (hier das FITC-markierte GAD₅₅₅₋₆₅₇-Peptid) eine stärkere Fluoreszenz aufweisen, dass aber aufgrund der mikroskopisch nicht zu kompensierenden hohen Eigenfluoreszenz der Zellen die Beurteilung schwierig ist. Es scheint aber, dass bei den Hsp:Peptid-Komplexen mehr Fluoreszenz in Membrannähe gefunden wird. Ursprüngliches Ziel der Mikroskopie war ein im FACS gemessenes Fluoreszenzsignal von Eigenfluoreszenz bzw. an der Zelloberfläche lokalisierte Fluoreszenz von tatsächlich aufgenommenen Peptiden unterscheiden zu können, was nicht durchweg gelang.

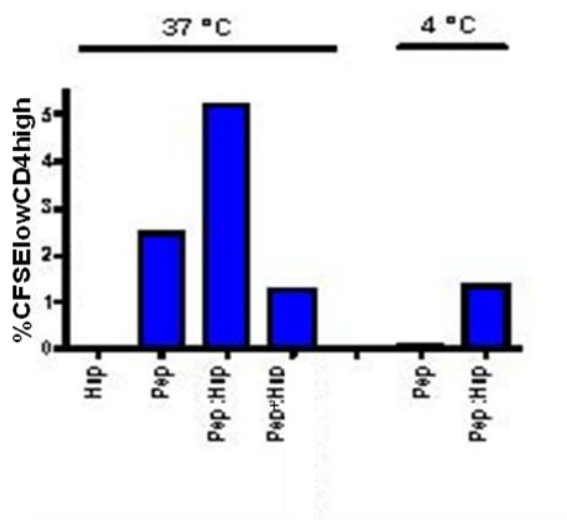
3.3.2 Endozytoseuntersuchung bei verschiedenen Temperaturen

Ergänzend wurden Zellproliferationsversuche bei unterschiedlichen Temperaturen durchgeführt. Bei erniedrigten Temperaturen können Endozytoseprozesse in APZs nicht mehr oder nur verlangsamt ablaufen. Für die folgenden Versuche wurden CD4⁺ T-Zellen mit APZs stimuliert, die den

antigenen Peptiden aus dem Tetanustoxin-C-Fragment (TT) bzw. dem Influenza-Protein Hämagglutinin (HA) bei einer Temperatur von 4 °C oder 37 °C ausgesetzt waren. Das übrige Setting war identisch zu den bisher durchgeführten Versuchen. Allerdings wurde bei dem 4 °C-Ansatz während der Inkubationszeit gekühltes Medium verwendet und die Proben auf Eis gelagert. Diese Temperaturen verhindern praktisch eine Endozytose und reduzieren andere zelluläre Stoffwechselfvorgänge. APZs, die daraufhin noch in der Lage sind CD4⁺ T-Zellen spezifisch zu stimulieren, können das Peptid lediglich an der Oberfläche gebunden haben. Die Antigene wurden nach der Inkubationszeit abgewaschen bzw. das Medium ausgetauscht und die APZs mit den CFSE gefärbten CD4⁺ T-Zellen in Kultur genommen.

Die Tatsache, dass die Antigene im Gegensatz zu den bisherigen Versuchen in diesem Setting heruntergewaschen wurden und nicht während der gesamten Kultur im Medium verblieben zeigte keinen Einfluss auf den Effekt von Hsp70. Dies war jedoch notwendig, um eine mögliche Endozytose der APZs bei im weiteren Versuchsverlauf 37 °C zu vermeiden. Die Analyse erfolgte wie bei den anderen Versuchen nach 6 Tagen Kultur, es folgte eine Färbung mit fluoreszenzmarkiertem anti-CD4 mAk und teilweise auch mit HLA-DR-Tetrameren vor der FACS-Analyse.

9A



9B

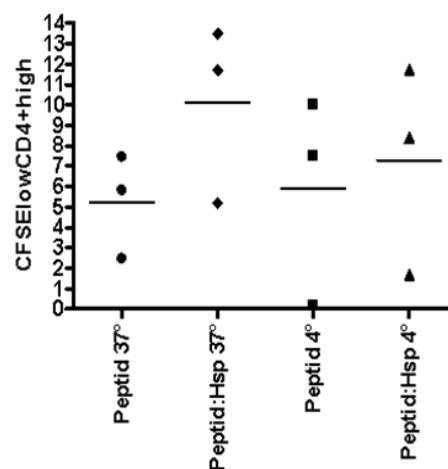


Abb. 9: Temperaturabhängigkeit der Hsp70-verstärkten CD4⁺ T-Zellproliferation

A: Dargestellt ist der Prozentsatz proliferierter CD4⁺ T-Zellen (CFSE^{low}CD4^{high}), die mit APZs stimuliert wurden, welche für jeweils 3 Stunden bei 37 °C und 4 °C Umgebungstemperatur mit dem Antigen in Kontakt kamen. Nach der Inkubationszeit wurden die APZs gewaschen und im Medium vorhandenes Antigen entfernt. Darauf folgte eine 6-tägige Kultur wie in den anderen Proliferationsexperimenten.

B: Die rechte Abbildung zeigt zusammenfassend einen Überblick 3 unabhängiger Versuche die mit unterschiedlichen Donoren/Peptiden durchgeführt wurden. Der Scatter Plot stellt den Prozentsatz proliferierter CD4⁺ T-Zellen mehrerer wie oben durchgeführter Versuche dar, wobei die dargestellten Daten nicht signifikant sind.

Auch die Ergebnisse der Versuche bei verschiedenen Temperaturen stützen die Theorie, dass eine intrazelluläre Aufnahme Bedingung für den verstärkenden Effekt von Hsp im Komplex mit einem Antigen ist. Beide Abbildungen zeigen, dass eine Inkubation bei 4 °C die Antigenpräsentation und CD4⁺ T-Zellproliferation sowohl von Peptid als auch Hsp:Peptid-Komplexen inhibiert.

3.4 chemische Endozytoseinhibitoren

Die bisher gezeigten Versuche sprechen alle dafür, dass Hsp:Peptid-Komplexe in APZs aufgenommen werden. Im Folgenden soll speziell der Mechanismus dieser Aufnahme näher untersucht werden. Von besonderem Interesse ist

dabei, auf welche Weise die immunogenen Komplexe in die APZs aufgenommen werden und ob Hsp:Peptid-Komplexe über Makropinozytose, Phagozytose oder rezeptorvermittelte Endozytose in die APZs gelangen (s. 1.2).

Spezielle Aufnahmemechanismen oder intrazelluläre Transportmechanismen der antigenpräsentierenden Zellen können durch spezielle Chemikalien geblockt werden. Es sollte herausgefunden werden, welche für die Hsp:Antigen-Komplexe eine Rolle spielen, z.B. ob eine intakte Funktion der Aktin-Polymerisierung, von Tyrosinkinasen oder der endosomalen Proteolyse für die Verstärkung der Immunreaktion eine Rolle spielen. Die aufgeführten Aufnahmemechanismen der APZs wurden durch Chemikalien geblockt. Das Vorgehen war dabei stets identisch: die APZs wurden nach Isolierung mit den Chemikalien für 15 Minuten inkubiert, danach abgewaschen um eine Zelltoxizität zu vermeiden und die gewaschenen Zellen in frischem Medium mit den Antigenen sowie mit den CFSE gefärbten CD4⁺ T-Zellen in Kultur genommen. Die FACS-Analyse erfolgte wie bei den anderen Versuchen nach 6 Tagen Kultur und Färbung mit fluoreszenzmarkiertem anti-CD4 mAk und zum Teil mit HLA-DR-Tetrameren.

3.4.1 Zellmembranfixierung durch Paraformaldehyd

Als relativ unselektiver Endozytoseblocker wurde zunächst Paraformaldehyd (PFA) in Konzentrationen von 0.5 %, 0.05 % und 0.005 % eingesetzt. PFA wirkt durch Quervernetzung von Proteinen hemmend auf den Endozytosemechanismus. Abbildung 10 zeigt, dass bei den höheren PFA-Konzentrationen keine Zellproliferation mehr zu beobachten ist, teilweise waren sie auch nicht mit dem Überleben der Zellen vereinbar. Die geringste Konzentration zeigte kaum Einfluss auf die CD4⁺ Proliferation und es konnte weiterhin eine Verstärkung mit Hsp70-gebundem Peptid beobachtet werden. 0.05 % PFA bewirkte eine relativ unspezifische Proliferationshemmung sowohl bei Inkubation mit Peptid als auch mit Hsp:Peptid-Komplexen.

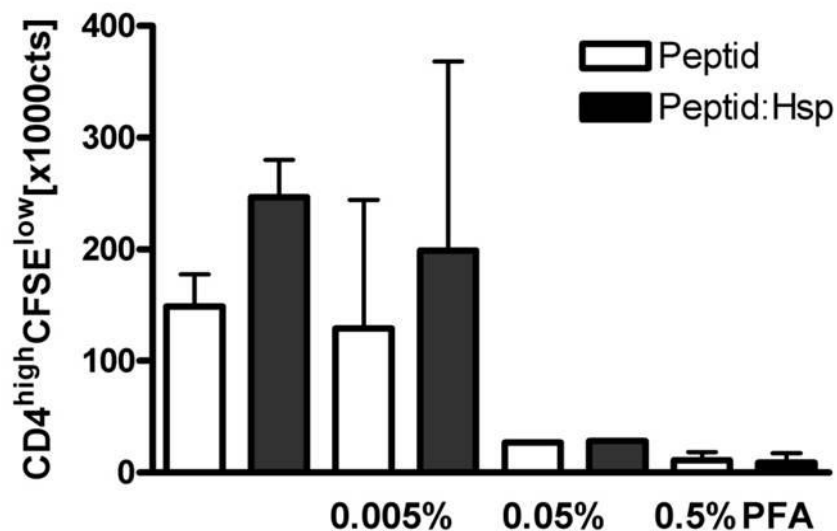


Abb. 10: Hemmung der Endozytose durch Paraformaldehyd

Die für diese Versuche verwendeten APZs wurden vor Antigenstimulation mit unterschiedlichen Konzentrationen PFA für jeweils 15 Minuten inkubiert. Daraufhin wurde dieses heruntergewaschen und in einem neuen Medium das Antigen bzw. der Hsp:Antigen-Komplex für 2 Stunden beigegeben. Danach wurden die so behandelten APZs zu einer gleichen Anzahl CD4⁺ T-Zellen des gleichen Donors gegeben.

Dargestellt sind 3 verschiedene Konzentrationen (0.5 %, 0.05 % und 0.005 % PFA) sowie APZs die nicht mit PFA behandelt wurden. Die Einheit auf der y-Achse sind hier die Anzahl detektierter CD4⁺ CFSE^{low} T-Zellen.

Dieser Versuch zeigt, dass Hsp in die APZ aufgenommen werden muss um seine immunogene Wirkung zu entfalten. Paraformaldehyd verhindert die T-Zellaktivierung mit und ohne Hsp-Komplexierung. Dies fügt sich in die Reihe der vorangegangenen Versuche.

3.4.2 Inhibition von Zellteilung und zytoskelettalem Rearrangement

Die spezifischere Hemmung der gezeigten notwendigen Endozytose wurde im Weiteren mittels Natrium-Azid (NaN₃) erreicht. Dieses interferiert unter anderem mit dem zytoskelettalen Rearrangement, indem es den Abbau aller Arten von Aktinstrukturen induziert (Aktinfilamente und Mikrofibrillen-Ummantelung *l*-Bündel (106)). Dadurch wird eine Endozytose zu einem etwas späteren Zeitpunkt, ohne eine komplette Membranfixierung zu verursachen, blockiert.

Die Versuche erfolgten unter Verwendung von mit NaN₃ behandelten APZs zur Stimulation.

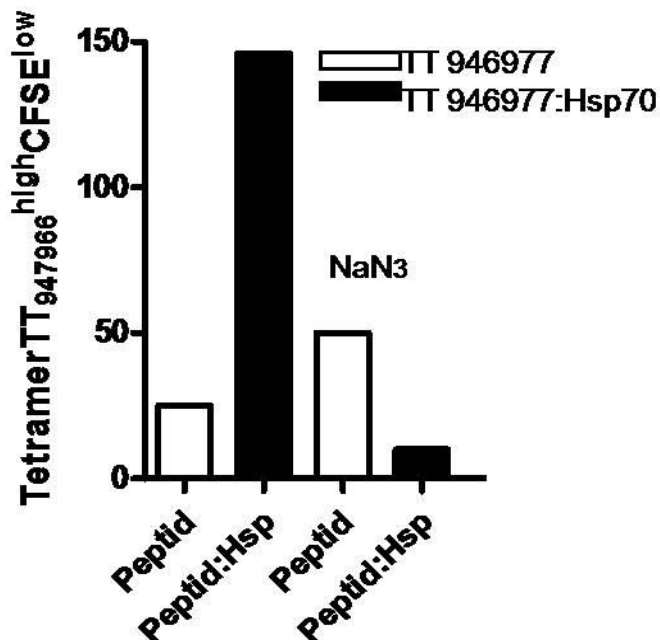


Abb. 11: Spezifische Hemmung des zytoskelettalen Rearrangements mit NaN₃

Experimentelle Bedingungen entsprechen den Versuchen mit PFA: Das Peptid wurde in PBS oder PBS mit Hsp70 oder dem Kontrollprotein HSA vorinkubiert, jeweils in der Konzentration von 1 µg/ml. Die APZs eines DRB1*1101-Donors wurden vor Inkubation mit dem Antigen für 15 Minuten mit 1 ml einer 30 mM NaN₃-Lösung behandelt und dann mit 1 µg/ml TT₉₄₇₋₉₆₆-Peptid inkubiert. Mit den so behandelten Zelle wurden die CD4⁺ T-Zellen desselben Donors stimuliert. Die y-Achse stellt die Anzahl proliferierter antigenspezifischer T-Zellen dar (CFSE^{low}DRB1*1101/TT2^{high}, Region auf CD4⁺).

NaN₃ führt zu einem Ausbleiben der proliferationsverstärkenden Wirkung von Hsp70. Mittels der zusätzlichen HLA-DR-Tetramer-Färbung können antigenspezifische Zellen analysiert werden. Eine Hemmung des zytoskelettalen Rearrangements durch Natriumazid hemmt die Proliferation antigenspezifischer CD4⁺ T-Zellen nach Stimulation mit Hsp:Peptid-Komplexen. Vergleichbare Ergebnisse konnten mit einem anderen Donor desselben HLA-DR-Typs gewonnen werden.

Ebenso sahen wir eine Hemmung des immunmodulatorischen Effektes von Hsp70, wenn die APZs mit 2-Deoxy-D-Glucose inkubiert gewesen waren

(Daten nicht gezeigt). Diese Substanz inhibiert die Zellteilung indem es die Glykolyse inhibiert, was besonders bei Krebszellen erforscht ist. Der letztendlich zytotoxische Effekt der Substanzen war allerdings der limitierende Faktor der Versuche.

3.5 Hemmung tyrosinabhängiger Proteinkinasen und der endosomalen Proteolyse

3.5.1 Tyrosinkinaseinhibition durch Genistein

Genistein ist ein Phytoöstrogen der Isoflavonoidgruppe das über die Nahrung (z.B. Sojaextrakte) aufgenommen wird und in menschlichem und tierischem Serum physiologisch nachweisbar ist. In der Literatur wird es auch als 5,7-Dihydroxy-3-(4-hydroxyphenyl) chromen-4-on oder 4',5,7-Trihydroxyisoflavin benannt. Es hemmt spezifisch Tyrosinkinasen (119), welche als Enzyme Phosphatgruppen bei Rezeptor-vermittelter Endozytose übertragen (s. 1.2), sodass bei verändertem Stimulationsmuster nach Genisteinbehandlung von APZs Rückschlüsse auf die Art einer Aufnahme gezogen werden können.

Zusätzlich hemmt Genistein auch Urokinase (uPA) und die onkologische Forschung untersucht derzeit eine durch diese Inhibitionen hervorgerufene positive Wirkung auf die durch FGF-2-induzierte Angiogenese und somit das Tumorwachstum. Bekannt ist auch die Eigenschaft, zu einer beschleunigten Kapazitation der Samenzellen im weiblichen Genitaltrakt zu führen.

In Abbildung 12B zeigt sich wie die Behandlung der APZs mit Genistein den proliferationsverstärkenden Effekt von Hsp70 zunichtemacht.

3.5.2 Prozessierungshemmung mittels Chloroquine

Chloroquine ist eine im Jahre 1934 erstmals synthetisierte, chemisch dem Chinin verwandte Substanz, die zur Malariatherapie und -prophylaxe sowie bei der Behandlung rheumatischer Erkrankungen wie der Rheumatoiden Arthritis, dem Lupus erythematodes und der Porphyria cutanea tarda eingesetzt wird. Dabei steht vor allem die gegen Plasmodien gerichtete Wirkung der Substanz im Vordergrund. Ein weiterer Einsatzort ist in der Zellkultur z.B. bei Transfektionen zur Erhöhung der Transfektionseffizienz durch Hemmung der

lysosomalen DNAsen. Dabei wird die Fähigkeit von Chloroquine den pH-Wert innerhalb der Vesikel zu neutralisieren genutzt. Dieser Effekt wurde bei den folgenden Versuchen ausgenutzt, um die Peptidprozessierung und Beladung von MHC II-Molekülen durch Neutralisierung des lysosomalen pHs zu stören.

Der in Abbildung 12C dargestellte Unterschied im Wachstumsmuster nach Behandlung der Zellen mit Chloroquine gibt einen weiteren Hinweis auf den stattfindenden Aufnahmemechanismus. Es zeigt sich eine stärkere T-Zellproliferation mit Hsp:Peptid-Komplexen, sowohl bei der totalen Anzahl CD4⁺ Zellen (linke Quadranten) als auch der antigenspezifischen T-Zellen (obere Quadranten). Dabei scheint eine Hemmung der lysosomalen Prozessierung der immunogenen Komplexe den proliferationsverstärkenden Effekt von Hsp70 aufzuheben.

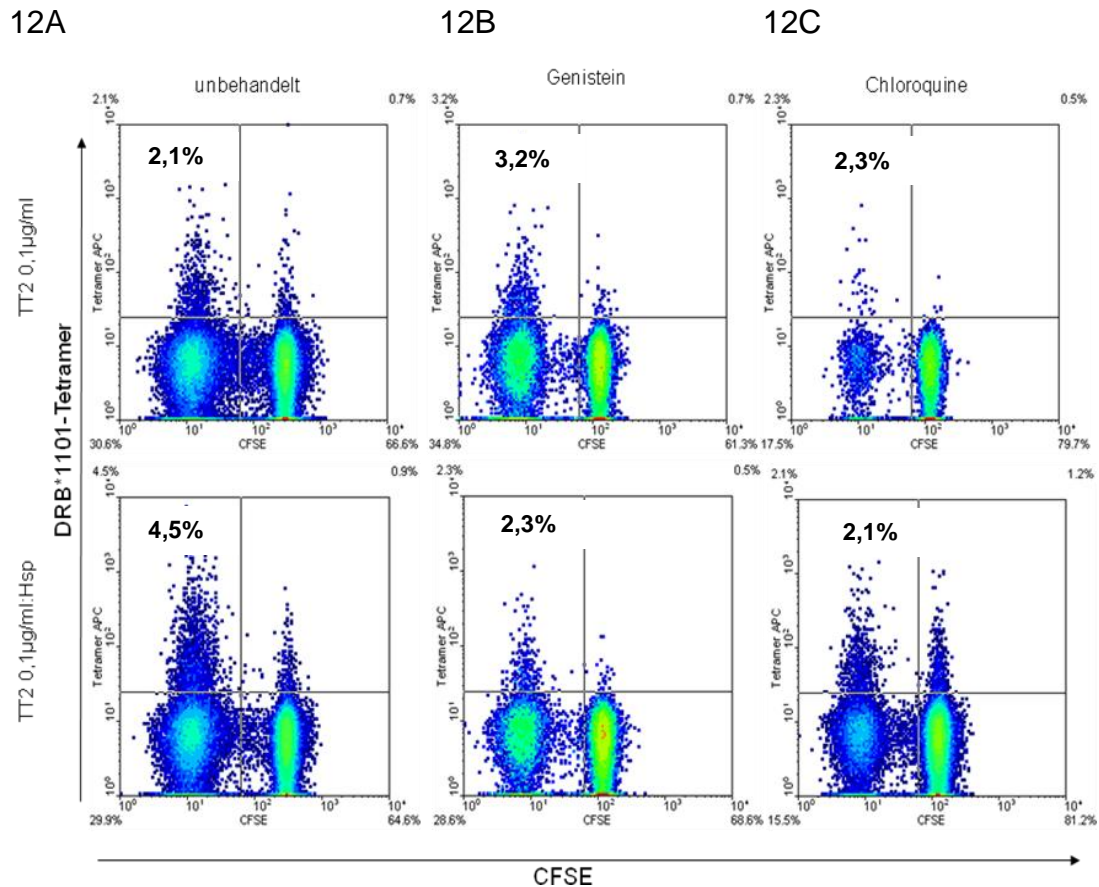


Abb. 12: Einfluss von Genistein und Chloroquine auf die Hsp70-verstärkte T-Zellproliferation PBMCs eines gesunden DRB1*1101-Spenders wurden nach Stimulation mit antigenem TT₉₄₇₋₉₆₆ Peptid (obere Diagramme) oder Hsp:Peptid-Komplex (untere Diagramme) stimuliert. Die APZs waren vor der Zugabe von Antigen entweder unbehandelt (Abb. 12A), oder wurden 15 Minuten vorbehandelt mit 25 µM Genistein (Abb. 12B) bzw. 100 µM Chloroquine (Abb. 12C). Die Analyse proliferierter CFSE^{low} T-Zellen erfolgte nach anti-CD4 und HLA-DR Tetramer-Färbung im FACS, die Prozentzahl im oberen linken Quadranten entspricht dabei dem Anteil antigenspezifischer, proliferierter CD4⁺ T-Zellen an der gesamten CD4⁺Zellpopulation. Negativkontrolle waren unstimulierte PBMCs, Positivkontrolle mit 1 µg/ml PHA stimulierte Zellen (nicht gezeigt). Als Kontrolle wurden die Zellen mit einem leeren dem jeweiligen HLA-Typ entsprechenden Tetramer gefärbt.

Dieses experimentelle Setting zur näheren Untersuchung der Notwendigkeit von Prozessierung und funktionierenden Tyrosinkinasen wurde für verschiedene Donoren mit den Haplotypen HLA-DRB1*1101 (3 Donoren), *0401 (2 Donoren) und *0101 (1 Donor) durchgeführt. Gezeigt ist in Abbildung 12 ein Stimulationsversuch mit CD4⁺ T-Zellen eines DRB1*1101-Spenders nach Vorbehandlung der APZs mit Chloroquine bzw. Genistein und

anschließender Stimulation mit Peptid oder Hsp:Peptid-Komplexen. Die Vorbehandlung mit Genistein und Chloroquine hebt den proliferationsverstärkenden Effekt von Hsp70 auf. Mit Chloroquine ergeben sich insgesamt weniger proliferierte CD4⁺ bzw. auch weniger Tetramer+ Zellen, sowohl für Peptid alleine als auch mit Hsp. Genistein scheint hier, zumindest auf das Peptid alleine, weniger Einfluss zu haben.

3.5.3 Cytochalasin D

Ähnlich dem NaN₃ wirkt Cytochalasin D (CytD) auf die Aktinfilamente. Es unterbricht das ständige Polymerisieren und Depolymerisieren der Filamente (120), welche aus vielen G-Aktin-Untereinheiten bestehen und das Ausbilden von Lamellipodien und Filopodien und schließlich die Fortbewegung von Wachstumskegeln oder der gesamten Zelle ermöglichen. Eine Hemmung der Aktin-Polymerisation blockiert einen wichtigen Baustein eines endozytotischen Vorgangs. Es wurde untersucht, ob Vorbehandlung von APZs mit CytD die T-Zellantwort auf Peptid und Hsp:Peptid-Komplexe beeinflusst (Abb. 13 und 14).

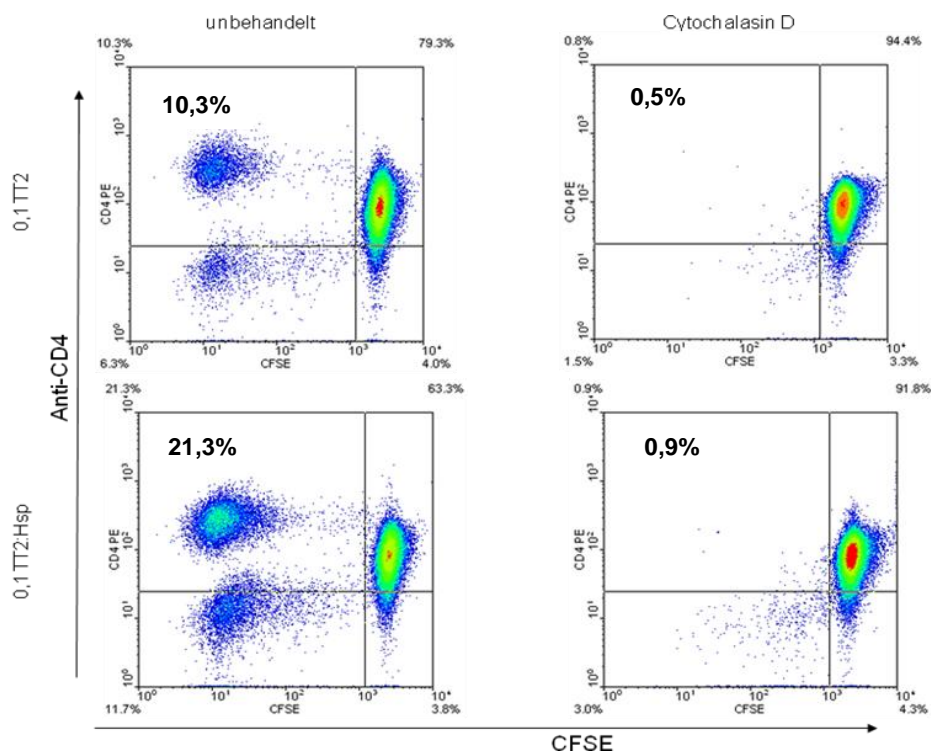


Abb. 13: Einfluss der Aktin-Polymerase-Inhibition durch Cytochalasin D auf die antigenspezifische Zellproliferation.

CD4⁺ T-Zellproliferation eines DRB1*1101-Donors nach Stimulation mit APZs mit (linke Diagramme) und ohne (rechte Diagramme) Vorbehandlung durch Cytochalasin D (10 µg/µl; für 15 min. bei Raumtemperatur inkubiert, dann Cytochalasin D heruntergewaschen und das Medium ausgetauscht).

Die so behandelten APZs wurden mit antigenem Peptid TT₉₄₇₋₉₆₆ (obere Reihe) und Hsp:Peptid-Komplexen (untere Reihe) stimuliert. Isolierte CD4⁺ T-Zellen desselben Donors wurden dazu gegeben. Eine FACS-Analyse auf CFSE-CD4⁺ Zellen erfolgte an Tag 6 wie in Abbildung 1 beschrieben. Prolifizierte CD4⁺ T-Zellen werden im oberen linken Quadranten der Diagramme gefunden (CFSE^{low}CD4^{high}). Diese Abbildung zeigt einen Versuch mit einem DRB*1101 Spender, ähnliche Ergebnisse erhielten wir mit den Zellen eines DRB* 0401-Spender.

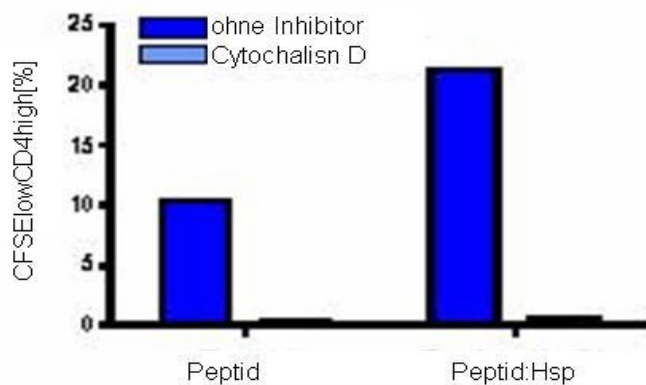


Abb. 14: Gezeigt ist eine weitere graphische Ausarbeitung des Versuchs aus Abbildung 13. 3 Proben wurden unabhängig voneinander unter gleichen Bedingungen stimuliert. Die Balken stellen den Prozentsatz proliferierter CD4⁺ T-Zellen der 3-fach-Bestimmung dar.

Die Vorbehandlung der APZs mit Cytochalasin D resultierte in einem hemmenden Effekt auf jegliche Form der Proliferation sowie deutlichem Rückgang in der Generierung spezifischer T-Zellen nach Stimulation, wie die Diagramme in Abbildung 13 und 14 zeigen. Das liefert einen wichtigen Hinweis auf die Notwendigkeit der Aktin-Polymerisation im MHC II-Antigenpräsentationsweg.

3.6 Blockade des potentiellen Hsp70-Rezeptors CD91 durch anti-CD91

Wie in der Einleitung beschrieben werden in der Literatur unterschiedliche Rezeptoren für Hsps postuliert. Wichtig ist dabei die Unterscheidung von Signal- und endozytotischen Rezeptoren. Diskutiert werden Scavenger Rezeptor, CD91, CD36 und Lox-1, die genauen Rezeptoren die in der MHC II-vermittelten Verstärkung der Immunreaktion durch Hsp eine Rolle spielen sind jedoch bislang unbekannt.

Durch Blockade eines möglichen Rezeptors mittels Antikörpern soll dessen Rolle innerhalb der HSP-vermittelten Immunantwort evaluiert werden. Da CD91 zumindest für die durch Hsp70 verstärkte MHC I T-Zellaktivierung eine wichtige

Rolle zu spielen scheint, wurde dieser durch einen aus der Literatur bereits mit dieser Eigenschaft beschriebenen Antikörper blockiert.

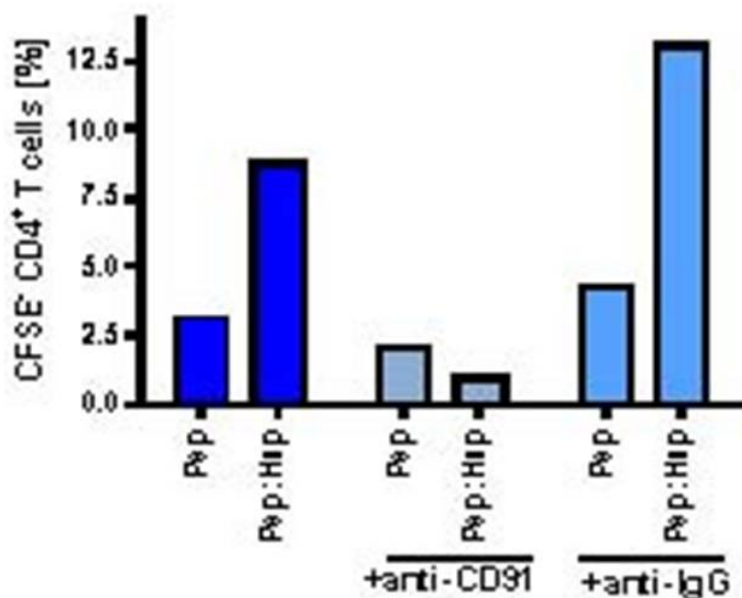


Abb. 15: Blockade des potentiellen Hsp-Rezeptors CD91 durch einen spezifischen Antikörper. Bestrahlte APZs eines DRB1*1101 Donors wurden unbehandelt (links), für 10 Minuten mit anti-CD91 Antikörper (Mitte) oder mit Isotyp-Antikörper (rechts) inkubiert in einem Stimulationsassay eingesetzt. Die APZs wurden mit 1 µg/ml Peptid alleine oder an Hsp70 komplexiert beladen und nach einer weiteren Stunde erfolgte die Zugabe von CFSE-gefärbten CD4⁺ DRB*1101 T-Zellen. Nach 10 Tagen wurde im FACS die Proliferation von CD4⁺ T-Zellen gemessen (CD4⁺CFSE-Zellen im oberen linken Quadrant entsprechend Auswertung in Abbildung 13). Die Balken in der Abbildung entsprechen dem Prozentsatz proliferierter CD4⁺ T-Zellen.

Eine Vorbehandlung der APZs mit anti-CD91 Antikörper führte in diesem Versuch zu einer Aufhebung des Hsp-Effektes, wurden die Zellen mit einem Isotyp vorbehandelt zeigte sich kein Einfluss (Abb. 15). Bei Wiederholungen dieses Versuches blieb dieser Effekt jedoch leider meistens aus und es kam zu Ergebnissen vergleichbar zu Abbildung 2. Daher kann die Frage, ob CD91 bei der Hsp70-verstärkten MHC II T-Zellproliferation beteiligt ist, mit diesen Versuchen leider nicht eindeutig geklärt werden. Weitere Versuche mit anderen Methoden wie spezifischem Rezeptor-knockdown mittels RNA-Interferenz sind nötig.

3.7 HLA-DM

HLA-DM ist an der Beladung der MHC II-Moleküle in den Beladungskompartimenten der APZs beteiligt (s. 1.3.4). Um den möglichen Mechanismus der Übertragung eines an Hsp70 gebundenen Peptids auf das präsentierende MHC II weiter zu erforschen, wurden Stimmulationsversuche mit einer für HLA-DM negativen B-Zelllinie als APZ im Vergleich zu HLA-DM-positiven Zellen durchgeführt. Ein unverändertes Wachstum würde bedeuten, dass Hsp die Rolle des HLA-DMs zumindest teilweise übernimmt. Dies wäre auch auf die Ätiologie der immunmodulatorischen Wirkung von Hsp hinweisend. Die HLA-DM⁺ wie auch HLA-DM⁻ APZs wurden mit Peptid oder Hsp:Peptid-Komplexen inkubiert und T-Zellen eines HLA-DR*0401 Donors dazugegeben. Nach 6 Tagen Proliferationsdauer wurde mittels FACS-Analyse evaluiert, ob durch Hsp70 das antigene Peptid auch ohne HLA-DM T-Zellen aktivieren kann (Abb. 16).

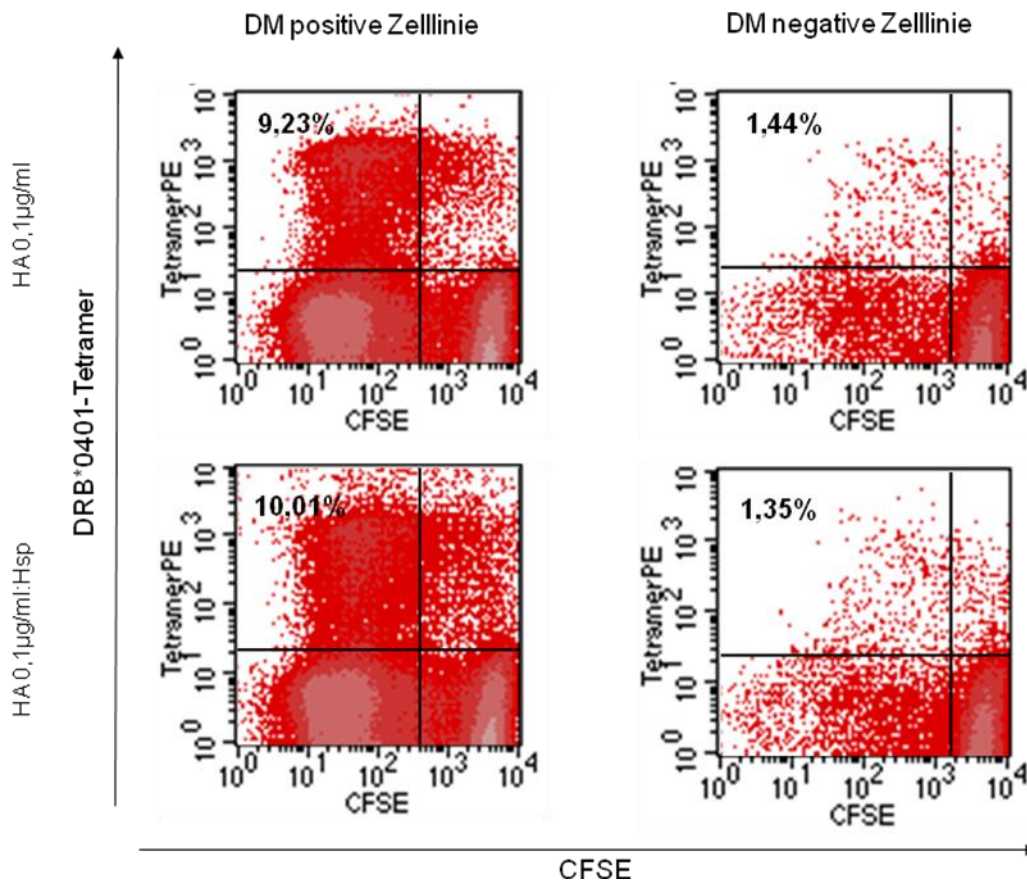


Abb.16: Stimulationsversuche mit und ohne HLA-DM

Zellen einer manipulierten DR0401 B-Zelllinie, mit (linke Diagramme) und ohne (rechte Diagramme) HLA-DM wurden mit HA (oben) bzw. Hsp:HA-Komplexen (unten) inkubiert und anschließend CFSE-gefärbte CD4⁺ T-Zellen eines DRB*0401 positiven Spenders zugegeben. Nach 6 Tagen in Kultur wurden die Zellen mittels FACS auf CD4-Expression und Antigenpezifität (HLA-DR Tetramer-Bindung) analysiert. In den Diagrammen dargestellt ist die Abnahme der CFSE-Intensität (x-Achse) und Antigenpezifität (HLA-DR Tetramer, y-Achse) lebender, auf CD4-Expression gegateter T-Zellen. Propidium-Iodid wurde zum Ausschluss toter Zellen verwendet, welche sich doppelt positiv im FL2/FL3-Diagramm darstellen.

Es zeigte sich, dass in Zellen ohne HLA-DM keine Proliferation antigenspezifischer T-Zellen sowohl mit Antigen allein als auch mit Hsp70-Komplexierung erreicht werden kann. HLA-DM ist zur Antigenpräsentation also zwingend notwendig. Seine Funktion kann nicht durch Hsp70 übernommen werden.

4 Diskussion

In einem humanen System können viele HSPs als Träger (auto-)antigener Peptide deren Präsentation beeinflussen, da sie in der Lage sind Peptide zu binden und mit ihnen hochimmunogene HSP:Peptid-Komplexe zu bilden. Bei Zellstress oder nekrotischem Zelltod werden sie in den Extrazellulärraum freigesetzt. Dort können sie mit antigenen Peptiden komplexieren und mit APZs interagieren bzw. über Endozytoserezeptoren internalisiert werden. So können die von HSP-Molekülen chaperonierten antigenen Peptide in die Beladungskompartimente der MHC I und II-Moleküle gelangen und von diesen anschließend bevorzugt präsentiert werden (77, 89). Die Frage ist, ob hierfür eine rezeptorvermittelte Aufnahme der Komplexe nötig ist und inwiefern CD91 auch bei der MHC II-vermittelten Antigenpräsentation beteiligt ist, nachdem die Rolle dieses Rezeptors für den MHC I-Weg bereits gezeigt wurde (75, 89, 114).

4.1 Einfluss von Hsp auf die CD4⁺ T-Zellproliferation

In dieser Arbeit wurden die Grundlagen der immunmodulatorischen Wirkung von Hsp70 näher untersucht. Zunächst wurde dabei der bekannte proliferationssteigernde Effekt auf die MHC II-vermittelte Antigenpräsentation (77) und damit auch die Proliferation antigenspezifischer CD4⁺ T-Helferzellen in Proliferationsexperimenten bestätigt. Bei allen Versuchen wurde die Stimulation von CD4⁺ T-Helferzellen mittels antigenen Peptiden, die im Kontext mit bestimmten HLA-DR-Allelen als Antigen beschrieben sind, alleine und durch Hsp:Peptid-Komplexe verglichen. Der proliferationssteigernde Effekt von HSP:Peptid-Komplexen konnte mit den Peptiden TT₉₄₇₋₉₆₆ und HA₃₀₇₋₃₁₉ sowohl in der CD4⁺ Zellpopulation als auch durch HLA-DR-Tetramer-Bindung als eine antigenspezifische Proliferationsverstärkung nachgewiesen werden. In dieser Arbeit sollte der Mechanismus dieses Effektes geklärt werden.

4.2 Proliferationsversuche mit ganzem Protein

Der Effekt einer Proliferationssteigerung der stimulierten CD4⁺ T-Zellen wurde auch unter Verwendung eines ganzen antigenen Proteins untersucht. Für die von Hsp70 hervorgerufene verstärkte T-Zellproliferation könnte das zur Stimulation verwendete Protein von den APZs vor der Präsentation an CD4⁺ Zellen internalisiert und prozessiert werden (10). Allerdings wurde auch die Möglichkeit postuliert, dass HSP ohne Internalisierung extrazellulär an der Oberfläche der APZ mit den MHC-Molekülen interagiert und so für eine vermehrte CD4⁺-Zellreaktion bei Stimulation mit an HSP komplexiertem Protein sorgt (115). Bei Proliferationsuntersuchungen mit komplettem Tetanus Toxin Protein, das an HSP komplexiert war, zeigten sich durch Färbung mit HLA-DR-Tetrameren etwa viermal mehr proliferierte T-Zellen, die einen für das TT C-Fragment (TT₉₄₇₋₉₆₆) spezifischen TZR exprimieren im Vergleich zu unkomplexiertem Protein (Abb. 5). Das von uns verwendete Tetanustoxin TT ist ein Protein von 150 kDa, woraus sehr viele T-Zellepitope generiert werden können. Wird das Protein von einer APZ aufgenommen, folgt der Endozytose eine Spaltung durch Proteasen im Phagolysosom und dann die Ladung der resultierenden Peptide auf die MHC II-Moleküle im Beladungskompartiment. Werden Peptide aus dem ganzen TT nach Komplexbildung des ganzen Proteins mit Hsp70 verstärkt präsentiert, bedeutet dies, dass sich das Protein innerhalb der APZ befand und kein Oberflächeneffekt zugrunde liegt. Hsp70 scheint folglich dabei zu helfen, das Antigen aus dem ganzen Protein verstärkt zu prozessieren bzw. letztendlich zu präsentieren

Es besteht durchaus die Möglichkeit, dass auch andere Epitope des Proteins präsentiert werden und nicht nur das untersuchte Peptid. Dies würde jedoch gleichfalls auf eine intrazelluläre Prozessierung des Proteins hinweisen, so dass eine Untersuchung diesbezüglich nicht relevant erscheint.

4.3 Untersuchung des Endozytosemechanismus bei unterschiedlichen Temperaturen

Eine Temperatur von 4 °C verhindert praktisch eine Endozytose. APZs, die daraufhin noch in der Lage sind, CD4⁺ T-Zellen spezifisch zu stimulieren

können das Peptid zuvor also lediglich an ihrer Oberfläche gebunden haben. Mit diesem experimentellen Ansatz sollte untersucht werden, ob eine Antigenkomplexierung an Hsp70 eine solche extrazelluläre Bindung des Peptides an MHC II ermöglicht (115, 116). Dies ist vor allem angesichts der beschriebenen vielfältigen Interaktionsmöglichkeiten der HSPs (63, 68) denkbar.

Wurden die APZs bei 4 °C mit dem antigenen Peptid bzw. dem Hsp:Peptid-Komplex inkubiert und anschließend gewaschen blieb in den meisten Versuchen eine Verstärkung der Proliferation durch Hsp aus. Allerdings zeigte sich bei einer Inkubationstemperatur von 4 °C mit dem unkomplexierten Antigen alleine bereits insgesamt weniger Proliferation als bei Raumtemperatur, sodass die Proliferationsergebnisse nach Stimulation mit an Hsp komplexiertem Antigen in diesem Kontext gesehen werden müssen. Zu Bedenken ist, dass diese unphysiologisch niedrigen Temperaturen nicht nur die Endozytose sondern praktisch den gesamten zellulären Stoffwechsel blockieren. Die Vitalität der Zellen wird also auch beeinflusst, so dass vielleicht schlussendlich gar nicht mehr alle Zellen in die Analyse eingehen konnten, was das Ergebnis zusätzlich beeinflusste.

Ergänzend wurde die Antigenpräsentation unter unterschiedlichen pH-Werten untersucht (Daten nicht gezeigt). Ein pH-Wert von 2, welcher durch Zugabe von pH2-Glycin im Überschuss erreicht wurde und eine sofortige Endozytose des Antigens unmöglich macht, verminderte die Verstärkung in der Aktivierung der antigenspezifischen Zellen. Die Beschränkungen in der Aussagekraft dieser Versuche sind jedoch ebenso wie bei der 4 °C Inkubation zu sehen. Vor allem die zytotoxische Wirkung des niedrigen pH-Wertes führte dazu, dass diese Versuche nicht weitergeführt wurden, da die geringe postexperimentelle Zellausbeute keine signifikanten Aussagen mehr zuließ.

4.4 Untersuchung des Endozytosemechanismus mit FITC-Peptiden

Es folgten im Rahmen des gewählten FACS-Analyseverfahrens Versuche mit fluoreszierenden Antigenen. Bei der postulierten Aufnahme sollten so die Zellen selber fluoreszieren. In der FACS-Analyse dieser Versuche konnte eine

durchgehende Verstärkung einer an das Antigen gebundenen Fluoreszenz, wenn dieses zuvor an Hsp komplexiert wurde, gezeigt werden. Dies ist auch in der Literatur beschrieben (107).

Die Ergebnisse unserer FACS-Analysen erlauben jedoch trotz Austausch des Kulturmediums vor der Messung, um eventuell noch darin enthaltene freie fluoreszierende Antigene zu eliminieren, keine sichere Aussage, ob sich die letztendlich detektierte Fluoreszenz intra- oder extrazellulär befindet. Zwar gaben wir den mit dem Fluoreszenzpeptid stimulierten Zellen noch jeweils für wenige Minuten Trypanblau bei, um eine eventuelle Fluoreszenz an der Zelloberfläche zu neutralisieren, doch kann eine extrazelluläre Restfluoreszenz von gegebenenfalls an der Oberfläche gebundenem Antigen nicht sicher ausgeschlossen werden. Die FACS Analyse kann also unter Umständen falsch positive Signale liefern wenn das fluoreszierende Peptid nicht in die Zelle aufgenommen worden ist, aber mit der Zellmembran assoziiert vorliegt.

Die Durchflusszytometrie erlaubt zwar quantitative Aussagen, da die absolute Fluoreszenz vieler Zellen analysiert wird, es fehlen jedoch Werte über die Verteilung der Fluoreszenz. Um dies zu umgehen und gleichzeitig zu kontrollieren, ob es sich tatsächlich um cytoplasmatische Fluoreszenz handelt, folgte eine fluoreszenzmikroskopische Auswertung der Zellen als ergänzende Methode. Allerdings können mikroskopisch nur kleinere Zellmengen ausgewertet werden. Auch bleibt die gesamte Analyse vom Betrachter abhängig, ist also nicht maschinell objektiv nachvollziehbar. Die Fluoreszenzmikroskopie erlaubt zwar im Gegensatz zur Durchflusszytometrie bessere Aussagen über die Aufnahme in das Zellinnere und die Peptidverteilung innerhalb der Zellen, allerdings ist es schwierig, dies zu quantifizieren. So war auch fluoreszenzmikroskopisch nicht eindeutig zu beurteilen, ob die markierten Antigene in die Zellen aufgenommen worden sind und so die Fluoreszenz innerhalb der Zellen ist. Zudem mussten die Zellen wenige Stunden nach Inkubation analysiert werden, da sonst die Fluoreszenz zu verblassen drohte. Nach einem endozytotischen Vorgang ist das Peptid jedoch vermutlich noch in der Nähe der Zellmembran lokalisiert und so eine intra- oder extrazelluläre Lokalisation der Fluoreszenz nicht sicher zu

evaluieren. Trotz der Einschränkungen in der Aussagekraft und Objektivität können die Ergebnisse dennoch gemeinsam mit der FACS-Analyse ergänzend zu den bisherigen Ergebnissen in Betracht gezogen werden. Obwohl sich keine signifikanten Aussagen ableiten lassen, liefern beide Methoden weitere Indizien für eine verstärkte und veränderte Aufnahme von Hsp70-gebundenen antigenen Peptiden in APZs. Die Kombination verschiedener methodischer und theoretischer Ansätze erlaubt den Schluss, dass eine Prozessierung der Antigene für die Proliferationsverstärkung durch HSP stattfindet. Mit Hsp:Peptid-Komplexen scheint sich zudem mehr Antigen innerhalb der Zellen zu befinden, ohne das mit den gewählten Methoden abschließend beweisen zu können.

4.5 Untersuchung des Endozytosemechanismus mittels chemischer Inhibitoren

In den weiteren Versuchen wurden die Mechanismen zu Aufnahme und Prozessierung Hsp-gebundener Peptide/Proteine näher untersucht.

PFA, welches hemmend auf die Quervernetzung von Proteinen wirkt, erzielt einen generellen Stopp des Membranflusses. Die isolierten APZs wurden vor Stimulation dieser Substanz ausgesetzt und nach Austausch des Mediums die T-Zellen hinzugegeben. Bei Einsatz von Konzentrationen ab 0.05 % ist in den durchgeführten Versuchen keine Zellproliferation mehr zu beobachten. Hier wurde eine Zellfixierung erreicht, wofür PFA herkömmlich auch eingesetzt wird. Die höheren eingesetzten Konzentrationen waren nicht mit dem Überleben der Zellen vereinbar. Die geringsten Konzentrationen zeigten keinen Einfluss. Eine Vorbehandlung der APZs mit 0.05 % PFA bewirkte ein Ausbleiben der verstärkten Stimulation von T-Zellen nach Zugabe von Hsp:Peptid-Komplexen. Vorbehandlung der APZs mit PFA in einer Konzentration von 0.05 % unterbindet lediglich den verstärkenden Effekt der Hsp:Antigen-Komplexe. Dies spricht für eine verstärkte intrazelluläre Prozessierung durch Komplexierung des Antigens an Hsp. Denkbar wäre, dass die Präsentation und dadurch Stimulation der CD4⁺ T-Zellen des Peptides alleine auch zu einem gewissen Teil an der Zelloberfläche stattfinden kann (115, 116). Hsp:Peptid-Komplexe

müssen jedoch anscheinend in die APZ aufgenommen werden um ihre immunogene Wirkung zu entfalten. Würden Hsp:Peptid-Komplexe direkt mit den T-Zellen interagieren oder auf der Oberfläche der APZs binden, müsste trotz der Membranfixierung noch ein Effekt zu sehen sein. Dieses Ergebnis fügt sich in die Reihe der vorangegangenen Versuche und stützt die Theorie der Endozytose zur immunmodulatorischen Wirkung von HSP:Antigen-Komplexen. Wenn man zusätzlich die Ergebnisse der Versuche mit Cytochalasin D, Genistein und Chloroquine beachtet, welche eine Hemmung des proliferationsverstärkenden Effektes von Hsp70 nach Vorbehandlung der APZs mit diesen Substanzen aufzeigen, kann die Aussage ausgeweitet werden. Demnach ist eine intakte Aktinpolymerisierung als Grundlage der Endozytose (12) Voraussetzung für den immunmodulatorischen Effekt von HSP. Ausserdem werden Tyrosinkinasen und die endosomalen Proteolyse für die Proliferationsverstärkung durch Hsp70 benötigt. In Zusammenschau der Versuche ergeben sich Hinweise, dass eine intakte Endozytosefähigkeit der APZs Voraussetzung für den verstärkenden Effekt von Hsp70 auf die CD4⁺ T-Zellproliferation ist. Außerdem gibt es deutliche Anhaltspunkte für eine Rezeptor-vermittelte Aufnahme die zu einer lysosomalen Prozessierung der Hsp:Antigen-Komplexe führt, wie dies auch mehrfach beschrieben wurde (83, 86, 89). Denkbar wäre jedoch durchaus auch eine rein Clathrin-vermittelte Endozytose, da bei den beschriebenen Versuchen ausser mit PFA dieser Aufnahmeweg nicht spezifisch ausgeschaltet wurde.

4.6 Untersuchung des möglichen Aufnahmerezeptors

Es ging im Weiteren um die Untersuchung des potenziellen Rezeptors CD91 für die Aufnahme von Hsp:Peptid-Komplexen und MHC II-vermittelte Präsentation des Antigen. In der Literatur wurde CD91 schon im Zusammenhang mit Hsp70 beschrieben und Bindungen identifiziert (108, 121). Postuliert wird eine Interaktion von HSP beziehungsweise Hsp:Peptid-Komplexen mit CD91 auch beim MHC II-Präsentationsweg. Dieser Rezeptor kann auf der Oberfläche von APZs mit einer Vielzahl von Proteinen und Peptiden interagieren.

CD91 wird neben LOX-1 als hauptsächlicher Endozytoserezeptor betrachtet (89), CD40 spielt eher als Signalrezeptor eine Rolle (s. 1.6) (84, 85). In den dargestellten Versuchen wurde versucht, diesen Rezeptor mittels eines monoklonalen anti-CD91 Antikörpers auf humanen, antigenpräsentierenden Zellen zu blockieren und damit für eine HSP-Bindung unzugänglich zu machen. Insbesondere die Untersuchung, ob eine Rezeptorblockade negativ auf die Präsentation HSP-gebundener Antigene beziehungsweise die Proliferation CD4⁺ T-Zellen wirkt, lieferte jedoch inkonstante Ergebnisse. Bei Wiederholungen des abgebildeten Versuches war entweder kein verstärkender Effekt durch Komplexierung an Hsp zu beobachten, oder der Antikörper zeigte keine Wirkung. Die Zellproliferation entsprach dann den unbehandelten Zellen. Dass ein Effekt des anti-CD91 Antikörpers nicht in allen Versuchen festgestellt werden konnte, kann allerdings auch durch eine unzureichende Blockade des Rezeptors durch den Antikörper erklärt werden. Es käme auch eine eventuelle Aktivierung der APZs durch den Antikörper selber bei manchen Zellen in Frage, so dass die eigentliche Wirkung und der Blockadeeffekt des Antikörpers nicht mehr beobachtet werden kann. Möglicherweise bestehen auch alternative Rezeptoren für Hsp:Peptid-Komplexe, so dass bei Blockade eines einzigen die anderen Rezeptoren diesen kompensieren. Dies würde in Einklang mit Daten der Literatur stehen, welche einerseits deutliche Hinweise für CD91 als Aufnahmerezeptor von Hsp:Peptid-Komplexen zeigt (89), jedoch auch andere Rezeptoren diskutiert (83, 85, 87)

In unserem Labor wurde parallel eine auf RNA-Interferenz basierende Methode etabliert, mit deren Hilfe die Expression potentieller HSP-Rezeptoren auf verschiedenen humanen, antigenpräsentierenden Zellen unterdrückt werden kann. Die Expression der potentiellen HSP-Rezeptoren CD91 und CD40 auf B-Zellen, Monozyten und DCs wurde analysiert (108) und mittels spezifischer siRNA einen Knockdown der Rezeptoren erreicht. Mittels FACS-Analyse konnte hier bereits ein übereinstimmendes Verteilungsmuster von CD91 und HSPs gezeigt werden und die Zugabe von anti-CD91 Antikörper rief eine titrierbare und spezifische Inhibition der Antigenpräsentation hervor. Ein weiterer HSP-Rezeptor-Kandidat CD40, welcher sich nicht nur auf Monozyten sondern auch

dendritischen und B-Zellen befindet, konnte mittels Antikörpern hingegen nicht ausreichend blockiert werden (Daten nicht gezeigt), möglicherweise ebenso aufgrund mangelhafter Antikörperqualität.

In Zusammenschau der Ergebnisse scheint bei der MHC II-vermittelten T-Zellantwort auf Hsp:Antigen-Komplexe eine Aufnahme von Hsp:Peptid-Komplexen in die APZs stattzufinden. Eine Inhibition der Endozytose an unterschiedlichen Punkten zeigte, dass Hsp:Antigen-Komplexe ihre Wirkung nicht an der Zelloberfläche entfalten können, sondern einen Aufnahmeweg nutzen. Hierfür muss die Zelle über ein flexibles Kollagengerüst verfügen und intrazellulär mittels Proteasen das Antigen zur Präsentation prozessieren. Hinsichtlich möglicher Rezeptoren können wir sagen, dass CD91 entscheidenden Anteil bei der von uns untersuchten immunogenen Wirkung der Hsp:Peptid-Komplexe zu haben scheint.

4.7 Kann Hsp70 die Funktion von HLA-DM übernehmen?

Es konnte gezeigt werden, dass Hsp70 direkt mit MHC II-Molekülen interagieren kann (96). Neben einer Funktion als Antigen-Träger könnten HSPs auch deren direkte Übertragung auf MHC II-Moleküle und so die Antigenpräsentation erleichtern. Eine direkte Interaktion von HSPs mit MHC II-Molekülen kann unabhängig von der Art der Aufnahme einen entscheidenden Schritt in der MHC II-vermittelten Antigenpräsentation und CD4⁺ T-Zellaktivierung durch Übertragung oder Vermittlung der Bindung von MHC II und HSP:Antigen-Komplexen spielen. Nachdem beim endozytotischen Prozessierungsprozess das MIIC gebildet wurde und das CLIP-Peptid durch das antigene Peptid ausgetauscht wurde, wird eine Lösung des präsentierten Antigens aus der Bindungstasche oder ein eventueller Austausch durch ein anderes Peptid an der Zelloberfläche durch die nichtkovalente Bindung von MHC und Peptid verhindert. Da ein MHC mit leerer Antigenbindungsgrube an der Zelloberfläche zerfällt ist eine Bindung zwischen diesem und den Hsp:Peptid-Komplexen an der Zelloberfläche sehr unwahrscheinlich, auch wenn es ein wichtiger Diskussionspunkt ist (116).

In dieser Arbeit waren die molekularen Mechanismen der HSP-verstärkten MHC II-Antigenpräsentation von Interesse. Dabei war eine Fragestellung, ob Hsp70 die stabilisierende Funktion von HLA-DM beim Austausch des CLIP-Peptids in der Bindungsspalte der MHC II-Moleküle und Katalyse der Freisetzung des CLIP-Peptids zur endgültigen Antigenpräsentation nach Endozytose übernehmen kann. Bei mittels EBV-Viren transformierten B-Zelllinien kann *in vitro* untersucht werden, wie aufgereinigtes HLA-DM CLIP und andere Peptide aus MHC II löst (109). Hierbei ist keine strukturelle Ähnlichkeit mit dem CLIP nötig, allerdings wird die Resistenz gegenüber HLA-DM mit steigender Peptidlänge und optimierter Passform in die spezifischen Taschen größer (110). Dieser Vorgang ist von der Anwesenheit von Prolin und Glycin abhängig (111), katalytisch (112) und involviert eine transiente Formierung von Komplexen zwischen HLA-DM und MHC II (113). Da gezeigt wurde, dass MHC II-Moleküle direkt mit Hsp70 interagieren können (96), wäre denkbar, dass Hsp70, antigenes Peptid und MHC II direkt miteinander interagieren. Durch diesen ternären Komplex könnte antigenes Peptid direkt von Hsp auf MHC II-Moleküle übertragen werden. HLA-DM wäre dann zur MHC II-Beladung eventuell nicht notwendig.

Es konnte gezeigt werden, dass bei Fehlen von HLA-DM ein Antigen in T-Zellproliferationsexperimenten sowohl mit als auch ohne Hsp-Komplexierung keine HLA-DR-Tetramer-positiven, also antigenspezifischen Zellen erzeugen kann. HLA-DM ist zur Antigenpräsentation also zwingend notwendig (36, 37). Seine Funktion kann nicht durch Hsp70 übernommen werden.

4.8 Gesamtbeurteilung und zusammenfassender Ausblick

Komplexe aus Peptid und Hsp70 verstärken die Antigenpräsentation und T-Zellaktivierung bei MHC II. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass dies auch für die Stimulation mit ganzem Protein gilt. Mit verschiedenen Methoden, wie sie teils für ähnliche Fragestellungen bereits verwendet wurden (96, 117) (Inkubation bei 4 °C, chemikalische Membranfixierung, Stoffwechsellinhibition, Fluoreszenzmikroskopie) konnte gezeigt werden, dass Hsp:Peptid-Komplexe in das Innere der APZs aufgenommen werden müssen. Ein Ausfall von

Stoffwechselprozessen wie das Ansäuern der Prozessierungsvesikel (25) oder die Aktinpolymerisation reduziert die T-Zellaktivierung sowohl mit Peptid alleine als auch mit Hsp:Peptid-Komplexen. Dies alles deutet darauf hin, dass Hsp:Peptid-Komplexe durch eine rezeptorvermittelte Aufnahme verstärkt in den MHC II-Präsentationsweg gelangt. Die Rezeptorfrage konnte in dieser Arbeit jedoch nicht abschließend geklärt werden.

In den Beladungskompartimenten kann Hsp70 das gebundene Peptid bei erniedrigtem pH abgeben und evtl. in direkter Interaktion auf MHC II übertragen (79). Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass Hsp70 nicht die Funktion von HLA-DM ersetzen kann (27, 112).

In weiteren Arbeiten könnte nun das Zytokinmuster bei Zellkulturen mit Hsp:Peptid-Komplexen weiter untersucht werden, um die Reaktionen der Zellen weiter zu analysieren. Dies könnte schließlich Rückschlüsse liefern, inwieweit Hsp:Peptid-Komplexe bei immunologischen Prozessen wie Autoimmunerkrankungen oder auch der Transplantatabstoßung involviert sind. Es wurde bereits gezeigt, dass das irreversible Hsc70 Bindereagenz 15-Deoxyspergualin (DSG) solch eine Immunreaktion indirekt durch Inhibition von Makrophagen und die Proliferationshemmung cytolytischer T- und B-Zellen verhindern kann (73). Die in dieser Arbeit zur Analyse verwendeten möglichen Inhibitionsmechanismen entlang des Aufnahmemechanismus könnten dabei auch von klinischer Bedeutung sein (60, 80, 96, 107).

Zusammenfassung

Komplexe aus antigenen Peptiden und Stress-induzierbarem Hsp70 können die durch MHC I und II-vermittelte Antigenpräsentation verstärken.

Diese Arbeit untersuchte in einem humanen, antigenspezifischen System die forcierte CD4⁺ T-Zellaktivierung mit Hsp70-komplexierten Antigenen. Dabei wurden die bereits bekannten Kenntnisse um HSP und MHC II um Versuche mit ganzem (intaktem) antigenem Protein anstatt Peptiden erweitert. Es folgten Untersuchungen zum genauen Mechanismus der Hsp70-verstärkten CD4⁺ T-Zellproliferation.

CD4⁺ T-Zellen von HLA-typisierten und gegen Influenza oder TT immunisierten Donoren wurden mit Peptiden oder Hsp:Peptid-Komplexen aus dem Tetanustoxoid oder Influenza-Hämagglutinin stimuliert. Anzahl und Proliferation antigenspezifischer T-Zellen wurden nach 6-10 Tagen mittels CD4⁺ und HLA-DR-Tetramerfärbung durchflusszytometrisch bestimmt. Mit HSP70 wurde dabei eine verstärkte Stimulation gefunden. Neben den kurzen Peptidfragmenten wurde auch die Reaktion antigenspezifischer T-Zellen auf Stimulation mit dem ganzen Tetanus-Toxoid Protein mit und ohne Hsp70-Komplexierung untersucht. Es zeigte sich eine Proliferationsverstärkung ähnlich der durch das Peptid. Ein Teil der proliferierten Zellen konnte durch MHC II-Tetramer Färbung als spezifisch für ein Peptidfragment des Proteins nachgewiesen werden. Die Präsentation bestimmter Peptidfragmente weist auf Aufnahme und Prozessierung von Hsp70-chaperonierten antigenen Peptiden und Proteinen in APZs sowie einen intrazellulären Prozessierungsweg hin.

Daraufhin wurde die mögliche Aufnahme der Hsp:Peptid-Komplexe und deren Mechanismus näher untersucht. Hierzu wurden verschiedene Aufnahmemechanismen der antigenpräsentierenden Zellen geblockt. Ein Block der Endozytose wurde einerseits durch eine Antigeninkubation der APZs bei reduzierter Temperatur, eine Quervernetzung der Membran durch PFA, sowie andererseits eine Inkubation der APZs mit endozytoseblockierenden Chemikalien (Cytochalasin D, Genistein und Chloroquine) provoziert. Die Unterbindung dieser Mechanismen resultierte in einem signifikanten Rückgang der Proliferation antigenspezifischer CD4⁺ T-Zellen, sowohl bei Stimulation mit

Peptid als auch mit Hsp:Peptid-Komplexen. Eine Inhibition der Endozytose verhinderte die Hsp70-verstärkte CD4⁺ T-Zellproliferation. Blockadeversuche eines beschriebenen Endozytoserezeptors mit einem Antikörper zeigten, dass CD91 möglicherweise der Rezeptor für diesen Mechanismus ist, diese Ergebnisse waren allerdings nicht eindeutig.

Die im Rahmen dieser Arbeit gewonnenen Daten indizieren, dass antigene Peptide mittels Hsp70 erleichtert die endosomalen Kompartimente über Rezeptor-vermittelte Endozytose erreichen, in denen MHC II-Moleküle beladen werden. In einer früheren Arbeit konnte gezeigt werden, dass Hsp70 direkt mit MHC II-Molekülen interagieren kann. Bei Verwendung einer für das HLA-DM Molekül negativen Zelllinie als antigenpräsentierende Zellen konnte allerdings gefunden werden, dass Hsp70 nicht die stabilisierende Funktion von HLA-DM bei der Peptidbeladung auf MHC II-Moleküle übernehmen kann.

Die Ergebnisse dieser Arbeit ergänzen die bisherigen Daten zu einer verstärkten Präsentation Hsp70-gebundener Peptide über MHC II um die Tatsache, dass neben kurzen Peptidfragmenten auch intakte Proteine verstärkt in den MHC II-Präsentationsweg gelangen. Durch Blockade verschiedener Stoffwechselwege konnte der Mechanismus der Hsp70-vermittelten CD4⁺ T-Zellaktivierung weiter aufgeklärt und gezeigt werden, dass die Aufnahme der Hsp:Peptid-Komplexe in APZs für die durch Hsp70 erleichterte CD4⁺ T-Zellaktivierung notwendig ist.

Die beschriebene Verstärkung der Immunreaktion von CD4⁺-Zellen kann nur bei unbeeinträchtiger Endozytosefähigkeit der präsentierenden Zelle stattfinden. Eine intakte Funktion der Aktinpolymerisierung, der Tyrosinkinasen sowie der endosomalen Proteolyse ist Bedingung für die Verstärkung der Antigenpräsentierung durch APZs. Dies könnte insbesondere bei der Behandlung von Autoimmunerkrankungen wie etwa der juvenilen rheumatoiden Arthritis interessant sein. Durch Einflussnahme an diesen Mechanismen wäre eine Regulation des immunmodulierenden Effektes von HSP denkbar.

5 Literaturverzeichnis

- 1 **Janeway, C.A., Medzhitov, R.**, Innate Immune Recognition. *Ann Rev Immunol* 2002 **20**: 197-216
- 2 **Batista FD, Harwood NE.**, The who, how and where of antigen presentation to B cells. *Nat Rev Immunol* 2009 **9**: 15–27
- 3 **LeBien TW, Tedder TF.**, B lymphocytes: how they develop and function. *Blood* 2008 **112**: 1570–1580
- 4 **Michael C. Carroll**, The complement system in regulation of adaptive immunity. *Nat Immunol* 2004 **5**: 981-986
- 5 **Köhl J, Hawlisch H.**, Complement and Toll-like receptors: Key regulators of adaptive immune responses. *J Mol Immunity* 2006 **43**: 13-21
- 6 **Takahama Y.**, Journey through the thymus: stromal guides for T-cell development and selection. *Nat Rev Immunol.* 2006 **6**: 127–135
- 7 **Jiang H, Wu Y, Liang B, Zheng Z, Tang G, Kanellopoulos J, Soloski M, Winchester R, Goldstein I, Chess L.**, An affinity/avidity model of peripheral T cell regulation. *J Clin Invest* 2005 **115**: 302-312
- 8 **Maiati E, Potter P, Rogers NJ, Morley BJ.**, Control of apoptosis in autoimmunity. *J Pathol* 2008 **214**: 190–198
- 9 **Antonio Lanzavecchia**, Mechanisms of antigen uptake for presentation. *Current Opinion in Immunology* 1998 **8**: 348-354
- 10 **Miaczynska M, Stenmark H.**, Mechanisms and functions of endocytosis. *The Journal of Cell Biology* 2008 **180**: 7–11
- 11 **Mayor S, Pagano RE.**, Pathways of clathrin-independent endocytosis. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2007 **8**:603-612
- 12 **Chen CY, Brodsky FM.**, Huntingtin-interacting protein 1 (Hip1) and Hip1-related protein (Hip1R) bind the conserved sequence of clathrin light chains and thereby influence clathrin assembly in vitro and actin distribution in vivo. *J Biol Chem.* 2005 **280**:6109-6117
- 13 **Mayor S, Pagano RE.**, Pathways of clathrin-independent endocytosis. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2007 **8**:603-612
- 14 **Huynh KK, Eskelinen EL, Scott CC, Malevanets A, Saftig P, Grinstein S.**, LAMP proteins are required for fusion of lysosomes with phagosomes. *EMBO J.* 2007 **26**: 313-324

15 **Veiga E, Guttman JA, Bonazzi M, Boucrot E, Toledo-Arana A, Lin AE, Enninga J, Pizarro-Cerdá J, Finlay BB, Kirchhausen T, Cossart P.**, Invasive and adherent bacterial pathogens co-Opt host clathrin for infection *Cell Host Microbe* 2007 **2**: 340-351

16 **Mellman I, Pierre P, Amigorena S.**, Lonely MHC molecules seeking immunogenic peptides for meaningful relationships. *Curr Opin Cell Biol.* 1995 **7**: 564-572

17 **Banchereau J, Steinman RM.**, Dendritic cells and the control of Immunity. *Nature* 1998 **392**: 245-252

18 **Banchereau J, Briere F, Caux C, Davoust J, Lebecque S, Liu YJ, Pulendran B, Palucka K.**, Immunobiology of Dendritic Cells. *Annu Rev Immunol* 2000 **18**:767-811

19 **Hart DN.**, Dendritic cells: Unique leukocyte populations which control the primary immune response. *Blood* 1997 **90**: 3245-3287

20 **Storni T, Bachmann MF.**, Loading of MHC Class I and II Presentation Pathways by Exogenous Antigens: A Quantitative In Vivo Comparison. *J Immunol.* 2004 **172**: 6129-6135

21 **Trowsdale J, Ragoussis J, Campbell RD.**, Map of the human MHC. *Immunol Today.* 1991 **12**: 443-446

22 **Benoist C, Mathis D.**, Regulation of major histocompatibility complex class-II genes: X, Y and other letters of the alphabet. *Annu Rev Immunol.* 1990;**8**: 681-715

23 **Holling TM, Schooten E, van Den Elsen PJ.**, Function and regulation of MHC class II molecules in T-lymphocytes of mice and men. *Hum Immunol.* 2004 **65**: 282-290

24 **Lanzavecchia A.**, Antigen-specific interaction between T and B cells. *Nature.* 1985 **314**: 537-539

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

26 **Neefjes J.**, CIIV, MIIC and other compartments for MHC class II loading. *Eur J Immunol.* 1999 **29**: 1421-1425

27 **Denzin LK, Cresswell P.**, HLA-DM induces CLIP dissociation from MHC class II alpha beta dimers and facilitates peptide loading. *Cell.* 1995 **82**: 155-165

- 28 **Pond L, Watts C.**, Characterization of transport of newly assembled, T cell-stimulatory MHC class II-peptide complexes from MHC class II compartments to the cell surface. *J Immunol.* 1997 **159**: 543-553
- 29 **Heath WR, Belz GT, Behrens GM, Smith CM, Forehan SP, Parish IA, Davey GM, Wilson NS, Carbone FR, Villadangos JA.**, Cross-presentation, dendritic cell subsets, and the generation of immunity to cellular antigens. *Immunol Rev.* 2004 **199**: 9-26
- 30 **Rudolph MG, Wilson IA.**, The specificity of TCR/pMHC interaction. *Curr Opin Immunol.* 2002 **14**: 52-65
- 31 **Bodmer JG, Marsh SG, Albert ED, Bodmer WF, Bontrop RE, Dupont B, Erlich HA, Hansen JA, Mach B, Mayr WR, Parham P, Petersdorf EW, Sasazuki T, Schreuder GM, Strominger JL, Svejgaard A, Terasaki PI.**, Nomenclature for Factors of the HLA System 1998. *Vox Sang.* 1999;**77**: 164-191
- 32 **Marsh SG.**, Nomenclature for factors of the HLA system, update September 1998. *Tissue Antigens.* 1998 **51**: 317
- 33 **Schenning L, Larhammar D, Bill P, Wiman K, Jonsson AK, Rask L, Peterson PA.**, Both α and β chains of HLA-DC class II histocompatibility antigens display extensive polymorphism in their aminoterminal domains. *EMBO J.* 1984 **3**: 447-452
- 34 **Brown JH, Jardetzky TS, Gorga JC, Stern LJ, Urban RG, Strominger JL, Wiley DC.**, Three-dimensional structure of the human class II histocompatibility antigen HLA-DRB1. *Nature.* 1993 **364**: 33-39
- 35 **Dessen A, Lawrence CM, Cupo S, Zaller DM, Wiley DC.**, X-Ray Crystal Structure of HLA-DR4 (DRA*0101, DRB1*0401) complexed with a Peptide from Human Collagen II. *Immunity.* 1997 **7**: 473-481
- 36 **Denzin LK, Cresswell P.**, HLA-DM induces CLIP dissociation from MHC class II alpha beta dimers and facilitates peptide loading. *Cell.* 1995 **82**: 155-165
- 37 **Busch R, Doebele RC, Patil NS, Pashine A, Mellins ED.**, Accessory molecules for MHC class II peptide loading. *Curr Opin Immunol.* 2000 **12**: 99-106
- 38 **Riese RJ, Chapman HA.**, Cathepsins and compartmentalization in antigen presentation. *Curr Opin Immunol.* 2000 **12**: 107-113
- 39 **Guidos CJ.**, Positive selection of CD4 + and CD8 + T cells. *Current Opinion in Immunology* 1996 **8**:225-232

- 40 **Robey E, Fowlkes BJ.**, Selective events in T cell development. *Annu Rev Immunol.* 1994;**12**: 675-705
- 41 **Petrie HT, Strasser A, Harris AW, Hugo P, Shortman K.**, CD4+8 -and CD4-8 + mature thymocytes require different postselection processing for final development. *J Immunol.* 1993 **151**: 1273-1279
- 41 **Odegard VH, Schatz DG.**, Targeting of somatic hypermutation. *Nat Rev Immunol.* 2006 **6**: 573-83
- 42 **Wang S, Chen L.**, Co-signaling molecules of the B7-CD28 family in positive and negative regulation of T lymphocyte responses. *Microbes Infect.* 2004 **6**: 759-766
- 43 **Zhu J, Paul WE.**, Heterogeneity and plasticity of T helper cells. *Cell Res.* 2010 **20**: 4-12
- 44 **Szabo SJ, Sullivan BM, Peng SL, Glimcher LH.**, Molecular mechanisms regulating Th1 immune responses. *Annu Rev Immunol.* 2003 **21**: 713-758
- 45 **Ansel KM, Djuretic I, Tanasa B, Rao A.**, Regulation of Th2 differentiation and Il4 locus accessibility. *Annu Rev Immunol.* 2006 **24**: 607-656
- 46 **Miyara M, Sakaguchi S.**, Human FoxP3(+)CD4(+) regulatory T cells: their knowns and unknowns. *Immunol Cell Biol.* 2011 **89**: 346-51
- 47 **de Kleer IM, Wedderburn LR, Taams LS, Patel A, Varsani H, Klein M, de Jager W, Pugayung G, Giannoni F, Rijkers G, Albani S, Kuis W, Prakken B.**, CD4+CD25bright Regulatory T Cells Actively Regulate Inflammation in the Joints of Patients with the Remitting Form of Juvenile Idiopathic Arthritis. *J Immunol* 2004 **172**: 6435-6443
- 48 **Bettelli E, Oukka M, Kuchroo VK.**, T(H)-17 cells in the circle of immunity and autoimmunity. *Nat Immunol.* 2007 **8**: 345-350
- 49 **Lindquist S, Craig EA.**, The heat-shock proteins. *Annu Rev Genet.* 1988 **22**: 631-677
- 50 **Ananthan J, Goldberg AL, Voellmy R.**, Abnormal proteins serve as eucaryotic stress signals and trigger the activation of heat shock genes. *Science.* 1986 **232**: 522-524
- 51 **Parsell DA, Lindquist S.**, The function of heat-shock proteins in stress tolerance: degradation and reactivation of damaged proteins. *Annu Rev Genet.* 1993 **27**: 437-496
- 52 **Lindquist S.**, The heat-shock response. *Annu Rev Biochem.* 1986 **55**: 1151-1191

- 53 **Ang D, Liberek K, Skowrya D, Zylicz M, Georgopoulos C.**, Biological Role and Regulation of the Universally Conserved Heat Shock Proteins. *J Biol Chem.* 1991 **266**: 24233-24236
- 54 **Gething MJ, Sambrook J.**, Protein folding in the cell. *Nature.* 1992 **355**: 33-45
- 55 **Pockley AG.**, Heat shock proteins as regulators of the immune response. *Lancet.* 2003 **362**: 469-476
- 56 **Quintana FJ, Cohen IR.**, Heat Shock Proteins as Endogenous Adjuvants in Sterile and Septic Inflammation. *J Immunol.* 2005 **175**: 2777-2782
- 57 **Basu S, Binder RJ, Suto R, Anderson KM, Srivastava PK.**, 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.* 2000 **12**: 1539-1546
- 58 **Bausero MA, Gastpar R, Multhoff G, Asea A.**, Alternative Mechanism by which IFN- Enhances Tumor Recognition: Active Release of Heat Shock Protein 72. *J Immunol.* 2005 **175**: 2900-2912
- 59 **Srivastava PK, Menoret A, Basu S, Binder RJ, McQuade KL.**, Heat shock proteins come of age: primitive functions acquire new roles in an adaptive world. *Immunity* 1998 **8**: 657-665
- 60 **Udono H, Srivastava PK.**, Heat shock protein 70-associated peptides elicit specific cancer immunity. *J.Exp.Med.* 1993 **178**: 1391-1396
- 61 **Suto R, Srivastava PK.**, A mechanism for the specific immunogenicity of heat shock protein-chaperoned peptides. *Science.* 1995 **269**: 1585-1588
- 62 **Zügel U, Kaufmann SH.**, Immune response against heat shock proteins. *Immunobiology.* 1999 **201**: 22-35
- 63 **Lagaudrière-Gesbert C, Newmyer SL, Gregers TF, Bakke O, Ploegh HL.**, Uncoating ATPase Hsc70 is recruited by invariant chain and controls the size of endocytic compartments. *PNAS* 2002 **99**: 1515-1520
- 64 **Singh-Jasuja H, Hilf N, Scherer HU, Arnold-Schild D, Rammensee HG, Toes RE, Schild H.**, The heat shock protein gp96: a receptor-targeted cross-priming carrier and activator of dendritic cells. *Cell Stress Chaperones.* 2000 **5**: 462-470
- 65 **Asea A, Kabingu E, Stevenson MA, Calderwood SK.**, HSP70 peptide-bearing and peptide-negative preparations act as chaperokines. *Cell Stress Chaperones.* 2000 **5**: 425-431

- 66 **Singh-Jasuja H, Scherer HU, Hilf N, Arnold-Schild D, Rammensee HG, Toes RE, Schild H.**, The heat shock protein gp96 induces maturation of dendritic cells and down-regulation of its receptor. *Eur J Immunol.* 2000 **30**: 2211-2215
- 67 **Wells AD, Malkovsky M.**, Heat shock proteins, tumor immunogenicity and antigen presentation: an integrated view. *Immunol Today* 2000 **21**: 129-132
- 68 **Abulafia-Lapid R, Elias D, Raz I, Keren-Zur Y, Atlan H, Cohen IR.**, T Cell Proliferative Responses of Type 1 Diabetes Patients and Healthy Individuals to Human hsp60 and its Peptides. *J Autoimmun.* 1999 **12**: 121-129
- 69 **Cohen IR.**, A heat shock protein, molecular mimicry and autoimmunity. *Isr J Med Sci.* 1990 **26**: 673-676
- 70 **Hartl FU.**, Molecular chaperons in cellular protein folding. *Nature* 1996 **381**: 571-579
- 71 **Rüdiger S, Germeroth L, Schneider-Mergener J, Bukau B.**, Substrate specificity of the DnaK chaperone determined by screening cellulose-bound peptide libraries. *EMBO J.* 1997 **16**: 1501-1507
- 72 **Zhu X, Zhao X, Burkholder WF, Gragerov A, Ogata CM, Gottesman ME, Hendrickson WA.**, Analysis of Substrate Binding by the Molecular Chaperone DnaK. *Science* 1996 **272**: 1606-1614
- 73 **Amemiya H.**, 15-Deoxyspergualin: a newly developed immunosuppressive agent and its mechanism of action and clinical effect: a review. Japan Collaborative Transplant Study Group for NKT-01. *Artif Organs.* 1996 **20**: 832-835
- 74 **Arnold PY, Mannie MD.**, Vesicles bearing MHC class II molecules mediate transfer of antigen from antigen-presenting cells to CD4+ T cells. *Eur J Immunol.* 1999 **29**: 1363-1373
- 75 **Castellino F, Boucher PE, Eichelberg K, Mayhew M, Rothman JE, Houghton AN, Germain RN.**, Receptor-mediated Uptake of Antigen/Heat Shock Protein Complexes Results in Major Histocompatibility Complex Class I Antigen Presentation via Two Distinct Processing Pathways. *J Exp Med.* 2000 **191**: 1957-1964
- 76 **Singh-Jasuja H, Hilf N, Scherer HU, Arnold-Schild D, Rammensee HG, Toes RE, Schild H.**, The heat shock protein gp96: a receptor-targeted cross-priming carrier and activator of dendritic cells. *Cell Stress Chaperones.* 2000 **5**: 462-470
- 77 **Haug M, Dannecker L, Schepp CP, Kwok WW, Wernet D, Buckner JH, Kalbacher H, Dannecker GE, Holzer U.**, The heat shock protein Hsp70

enhances antigen-specific proliferation of human CD4+ memory T cells. *Eur J Immunol.* 2005 **35**: 3163-3172

78 **Panjwani N, Akbari O, Garcia S, Brazil M, Stockinger B.**, The HSC73 Molecular Chaperone: Involvement in MHC Class II Antigen Presentation. *J Immunol.* 1999 **163**:1936-1942

79 **Haug M, Schepp CP, Kalbacher H, Dannecker GE, Holzer U.**, 70-kDa heat shock proteins: specific interactions with HLA-DR molecules and their peptide fragments. *Eur J Immunol.* 2007 **37**: 1053-1063

80 **Willnow TE, Nykjaer A, Herz J.**, Lipoprotein receptors: new roles for ancient proteins. *Nat Cell Biol.* 1999 **1**:E157-162

81 **Thériault JR, Adachi H, Calderwood SK.**, Role of Scavenger Receptors in the Binding and Internalization of Heat Shock Protein 70. *J Immunol.* 2006 **177**: 8604-8611

82 **Srivastava P.**, Interaction of heat shock proteins with peptides and antigen presenting cells: chaperoning of the innate and adaptive immune responses. *Annu Rev Immunol.* 2002 **20**: 395-425

83 **Wang Y, Kelly CG, Karttunen JT, Whittall T, Lehner PJ, Duncan L, MacAry P, Younson JS, Singh M, Oehlmann W, Cheng G, Bergmeier L, Lehner T.**, CD40 is a cellular receptor mediating mycobacterial heat shock protein 70 stimulation of CC-chemokines. *Immunity.* 2001 **15**: 971-983

84 **van Kooten C, Banchereau J.**, CD40-CD40 ligand. *J Leukoc Biol.* 2000 **67**: 2-17

85 **Becker T, Hartl FU, Wieland F.**, CD40, an extracellular receptor for binding and uptake of Hsp70-peptide complexes. *J Cell Biol.* 2002 **158**: 1277-1285

86 **Akira S, Takeda K.**, Toll-like Receptor Signalling. *Nat Rev Immunol.* 2004 **4**: 499-511

87 **Asea A, Rehli M, Kabingu E, Boch JA, Bare O, Auron PE, Stevenson MA, Calderwood SK.**, Novel signal transduction pathway utilized by extracellular HSP70: role of toll-like receptor (TLR) 2 and TLR4. *J Biol Chem.* 2002 **277**: 15028-15034

88 **Berwin B, Hart JP, Rice S, Gass C, Pizzo SV, Post SR, Nicchitta CV.**, Scavenger receptor-A mediates gp96/GRP94 and calreticulin internalization by antigen-presenting cells. *EMBO J.* 2003 **22**: 6127-6136

89 **Binder RJ, Srivastava PK.**, Essential role of CD91 in re-presentation of gp96-chaperoned peptides. *PNAS* 2004 **101**: 6128-6133

- 90 **Holzer U, Kwok WW, Nepom GT, Buckner JH.**, Differential antigen sensitivity and costimulatory requirements in human Th1 and Th2 antigen-specific CD4+ cells with similar TCR avidity. *J Immunol.* 2003 **170**: 1218-1223
- 91 **Rohlmann A, Gotthardt M, Hammer RE, Herz J.**, Inducible inactivation of hepatic LRP gene by cre-mediated recombination confirms role of LRP in clearance of chylomicron remnants. *J Clin Invest.* 1998 **101**: 689-695
- 92 **Willnow TE, Armstrong SA, Hammer RE, Herz J.**, Functional expression of low density lipoprotein receptor-related protein is controlled by receptor-associated protein in vivo. *PNAS* 1995 **92**: 4537-4541
- 93 **Berwin B, Hart JP, Pizzo SV, Nicchitta CV.**, CD91-Independent Cross-Presentation of GRP94(gp96)-Associated Peptides. *J Immunol.* 2002 **168**: 4282-4286
- 94 **Huang W, Dolmer K, Gettins PG.**, NMR solution structure of complement-like repeat CR8 from the low density lipoprotein receptor-related protein. *J Biol Chem.* 1999 **273**: 14130-14136
- 95 **Tobian AA, Canaday DH, Harding CV.**, Bacterial Heat Shock Proteins Enhance Class II MHC Antigen Processing and Presentation of Chaperoned Peptides to CD4+ T Cells. *J Immunol.* 2004 **173**: 5130-5137
- 96 **Maier JT, Haug M, Föll JL, Beck H, Kalbacher H, Rammensee HG, Dannecker GE.**, Possible association of non-binding of HSP70 to HLA-DRB1 peptide sequences and protection from rheumatoid arthritis. *Immunogenetics.* 2002 **54**: 67-73
- 97 **Haug M, Schepp CP, Kalbacher H, Dannecker GE, Holzer U.**, 70-kDa heat shock proteins: Specific interactions with HLA-DR molecules and their peptide fragments. *Eur.J.Immunol* 2007 **37**: 1053-1063
- 98 **Thériault JR, Mambula SS, Sawamura T, Stevenson MA, Calderwood SK.**, Extracellular HSP70 binding to surface receptors present on antigen presenting cells and endothelial/epithelial cells. *FEBS Lett.* 2005 **579**: 1951-1960
- 99 **Fields GB, Noble RL.**, Solid phase peptide synthesis utilizing 9-fluorenylmethoxycarbonyl amino acids. *Int J Pept Protein Res.* 1990 **35**: 161-214
- 100 **Haug M.**, Hitzeschockproteine: Interaktion mit HLA-DR-Molekülen und Einfluss auf die MHC II-vermittelte T-Zellantwort. 2005.
- 101 **Buckner JH, Holzer U, Novak EJ, Reijonen H, Kwok WW, Nepom GT.**, Defining antigen-specific responses with human MHC class II tetramers. *J Allergy Clin Immunol.* 2002 **110**: 199-208

102 **Danke NA, Kwok WW.**, HLA Class II-Restricted CD4+ T Cell Responses Directed Against Influenza Viral Antigens Postinfluenza Vaccination. *J Immunol.* 2003 **171**: 3163-3169

103 **Reichstetter S, Ettinger RA, Liu AW, Gebe JA, Nepom GT, Kwok WA.**, Distinct T Cell Interactions with HLA Class II Tetramers Characterize a Spectrum of TCR Affinities in the Human Antigen-Specific T Cell Response. *J Immunol.* 2000 **165**: 6994-6998

104 **Novak EJ, Liu AW, Nepom GT, Kwok WW.**, MHC class II tetramers identify peptide-specific human CD4+ T cells proliferating in response to influenza A antigen. *J Clin Invest.* 1999 **104**: R63-67

105 **Rammensee H, Bachmann J, Emmerich NP, Bachor OA, Stevanović S.**, SYFPEITHI: database for MHC ligands and peptide motifs. *Immunogenetics.* 1999 **50**: 213-219

106 **Vogt AB, Kropshofer H, Moldenhauer G, Hämmerling GJ.**, Kinetic analysis of peptide loading onto HLA-DR molecules mediated by HLA-DM. *PNAS* 1996 **93**: 9724-9729

107 **Bendz H, Ruhland SC, Pandya MJ, Hainzl O, Riegelsberger S, Braüchle C, Mayer MP, Buchner J, Issels RD, Noessner E.**, Human heat shock protein 70 enhances tumor antigen presentation through complex formation and intracellular antigen delivery without innate immune signaling. *J Biol Chem.* 2007 **282**: 31688-31702

108 **Fischer N, Haug M, Kwok WW, Kalbacher H, Wernet D, Dannecker GE, Holzer U.**, Involvement of CD91 and scavenger receptors in Hsp70-facilitated activation of human antigen-specific CD4+ memory T cells. *Eur J Immunol.* 2010 **40**: 986-997

109 **Busch R, Mellins ED.**, Developing and shedding inhibitions: how MHC class II molecules reach maturity. *Curr Opin Immunol.* 1996 **8**: 51-58

110 **Siklodi B, Vogt AB, Kropshofer H, Falcioni F, Molina M, Bolin DR, Campbell R, Hämmerling GJ, Nagy ZA.**, Binding Affinity Independent Contribution of Peptide Length to the Stability of Peptide-HLA-DR Complexes in Live Antigen Presenting Cells. *Hum Immunol.* 1998 **59**: 463-471

111 **Raddrizzani L, Bono E, Vogt AB, Kropshofer H, Gallazzi F, Sturniolo T, Hämmerling GJ, Sinigaglia F, Hammer J. Raddrizzani L, Bono E, Vogt AB, Kropshofer H, Gallazzi F, Sturniolo T, Hämmerling GJ, Sinigaglia F, Hammer J.**, Identification of destabilizing residues in HLA class II-selected bacteriophage display libraries edited by HLA-DM. *Eur J Immunol.* 1999 **29**: 660-668

- 112 **Vogt AB, Kropshofer H, Moldenhauer G, Hämmerling GJ.**, Kinetic analysis of peptide loading onto HLA-DR molecules mediated by HLA-DM. *PNAS* 1996 **93**: 9724-9729
- 113 **Kropshofer H, Arndt SO, Moldenhauer G, Hämmerling GJ, Vogt AB.**, HLA-DM Acts as a Molecular Chaperone and Rescues Empty HLA-DR Molecules at Lysosomal pH. *Immunity*. 1997 **6**: 293-302
- 114 **Binder RJ, Vatner R, Srivastava P.**, The heat-shock protein receptors: some answers and more questions. *Tissue Antigens*. 2004 **64**: 442-51.
- 115 **Zitzler S, Hellwig A, Hartl FU, Wieland F, Diestelkötter-Bachert P.**, Distinct binding sites for the ATPase and substrate-binding domain of human Hsp70 on the cell surface of antigen presenting cells. *Mol Immunol*. 2008 **45**:3974-83.
- 116 **Wang R, Kovalchin JT, Muhlenkamp P, Chandawarkar RY**, Exogenous heat shock protein 70 binds macrophage lipid raft microdomain and stimulates phagocytosis, processing, and MHC-II presentation of antigens. *Blood*. 2006 **107**:1636-42.
- 117 **Tobian AA, Canaday DH, Boom WH, Harding CV.**, Bacterial heat shock proteins promote CD91-dependent class I MHC cross-presentation of chaperoned peptide to CD8+ T cells by cytosolic mechanisms in dendritic cells versus vacuolar mechanisms in macrophages. *J Immunol*. 2004 **172**:5277-86.
- 118 **Garcia-Morales P, Minami Y, Luong E, Klausner RD, Samelson LE.**, Tyrosine phosphorylation in T cells is regulated by phosphatase activity: studies with phenylarsine oxide. *PNAS* 1990 **87**:9255-9.
- 119 **Akiyama T, Ishida J, Nakagawa S, Ogawara H, Watanabe S, Itoh N, Shibuya M, Fukami Y** Genistein, a specific inhibitor of tyrosine-specific protein kinases *J Biol Chem*. 1987 **262**:5592-5.
- 120 **Goddette DW, Frieden C.**, Actin polymerization. The mechanism of action of cytochalasin D. *J Biol Chem*. 1986 **261**:15974-80.
- 121 **Basu S, Binder RJ, Ramalingam T, Srivastava PK**, CD91 is a common receptor for heat shock proteins gp96, hsp90, hsp70, and calreticulin. *Immunity* 2001 **14** 303-13.

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt den Personen, die diese Arbeit ermöglicht und unterstützt haben, darunter besonders

Frau Dr. Ursula Holzer

für die Bereitstellung von Thema und Arbeitsplatz sowie die sehr gute Betreuung wissenschaftlich und menschlich. Ihr Einsatz und ihre Person hatten beim Entstehen dieser Arbeit großen Anteil.

Herrn Professor Dr. Günther E. Dannecker

für die wissenschaftliche Betreuung und Beratung, seine wertvollen Anregungen sowie die Bereitschaft zu Unterstützung und Diskussion der Ergebnisse.

Herrn Dr. Markus Haug

der mich in Arbeitsmethoden und Thematik einführte und mir stets hilfreich zur Seite stand. Seine Forschungen bilden die Grundlage meiner Arbeit und mit beispielloser Geduld und Freundlichkeit lehrte er mich kompetent Zusammenhänge und Techniken. Seine unermüdliche Bereitschaft, mir über Wissenslücken, Engpässe und Misserfolge hinwegzuhelfen, Entwürfe korrekturzulesen sowie seine Kompetenz und Persönlichkeit haben mich sehr beeindruckt und entscheidenden Anteil am Gelingen dieser Arbeit.

Herrn Dr. Hubert Kalbacher und seiner Arbeitsgruppe

welche die verwendeten Peptide synthetisierten

Frau Prof. Dr. Dorothee Wernet

für die HLA-DR Typisierung und Bereitstellung von Buffy-Coats

allen Mitarbeitern der AGn Holzer und Müller

für die gute Zusammenarbeit und Diskussion der Ergebnisse, Hilfe im Laboralltag, Blutspenden sowie die Unterstützung beim Erlernen der Methoden und wissenschaftlichen Grundlagen in angenehmem Arbeitsklima

meinen Eltern und Familie Eckle

die mir mein Studium ermöglichten, mich unterstützten und gemeinsam mit

meinen Geschwistern,

Familie Neibirt und meinen Freunden

für ihr Zuhören, Korrekturlesen und Inspiration.