

**Einfluss von Hitzeschockproteinen auf die MHC-II
vermittelte T-Zellantwort**

-

**Identifizierung einer molekularen Bindestelle
zwischen Hsp70 und HLA-DR**

Dissertation

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Eberhard Karls Universität Tübingen
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

Vorgelegt von
Daniela Schwörer
aus Stuttgart-Bad Cannstatt

Tübingen 2012

Tag der mündlichen Prüfung:

28. September 2012

Dekan:

Prof. Dr. Wolfgang Rosenstiel

1. Berichterstatter:

Prof. Dr. Hans-Georg Rammensee

2. Berichterstatter:

Prof. Dr. Gernot Bruchelt

FÜR MEINE FAMILIE

SCIENCE IS ORGANIZED KNOWLEDGE

(IMMANUEL KANT,

INSCRIFT IN DER LIBRARY OF CONGRESS, WASHINGTON D.C.)

ANYTHING THAT CAN GO WRONG ... (MURPHY)

INHALTSVERZEICHNIS

1	ZUSAMMENFASSUNG.....	1
2	EINLEITUNG.....	3
2.1	DAS IMMUNSYSTEM DES MENSCHEN.....	3
2.1.1	DIE ANGEBORENE IMMUNITÄT.....	3
2.1.2	DIE ERWORBENE IMMUNITÄT	4
2.2	ANTIGENPRÄSENTATION	6
2.2.1	ANTIGENPRÄSENTATION MITTELS MHC-I	6
2.2.2	ANTIGENPRÄSENTATION MITTELS MHC-II	7
2.2.3	KREUZPRÄSENTATION	8
2.3	HITZESCHOCKPROTEINE	9
2.3.1	HSP70 MOLEKÜLE	11
2.3.2	STRUKTUR VON HSP70	13
2.4	MÖGLICHE AUFNAHMEMECHANISMEN UND REZEPTOREN VON HSP70.....	16
2.5	MHC KLASSE II-ABHÄNGIGE ANTIGENPRÄSENTATION VON HSP	19
2.6	INTRAZELLULÄRER EFFEKT VON HSP	21
2.7	ZIEL DER ARBEIT.....	23
3	MATERIAL	25
3.1	GERÄTE	25
3.2	VERBRAUCHSMATERIALIEN	26
3.3	REAGENZIEN, CHEMIKALIEN, LÖSUNGEN.....	27
3.4	KITS	28
3.5	HERSTELLER	28
3.6	PROTEINE, ENZYME UND PEPTIDE	31
3.7	ANTIKÖRPER	32
3.8	OLIGONUKLEOTIDE.....	33

3.9	ZELLINIEN.....	34
3.10	MEDIEN	34
3.11	PUFFER	35
3.11.1	PUFFER UND MATERIALIEN FÜR POLYMERASE-KETTENREAKTION (PCR).....	35
3.11.2	PUFFER UND MATERIALIEN FÜR GELELEKTROPHORESE	36
3.11.3	PUFFER FÜR PROTEINAUFREINIGUNG	36
3.11.4	PUFFER FÜR HLA-DR AUFREINIGUNG	37
3.12	BAKTERIENSTÄMME	37
3.13	VEKTOREN.....	38
4	METHODEN	40
4.1	MOLEKULARBIOLOGISCHE TECHNIKEN.....	40
4.1.1	POLYMERASE-KETTENREAKTION (PCR).....	40
4.1.2	AUFTRENNUNG UND DETEKTION VON DNA MITTELS GELELEKTROPHORESE	41
4.1.3	KLONIERUNG IN PCR 2.1 TOPO VEKTOR (INVITROGEN).....	42
4.1.4	KLONIERUNG IN PET28A(+)......	42
4.1.5	ZIELGERICHTETE MUTAGENESE	43
4.1.6	BAKTERIENTRANSFORMATION MITTELS HITZESCHOCK.....	45
4.2	PROTEINBIOCHEMISCHE TECHNIKEN	46
4.2.1	PROTEINEXPRESSION	46
4.2.2	PROTEINAUFREINIGUNG	46
4.2.3	ISOLIERUNG VON HLA-DR MOLEKÜLEN AUS B-LCL ZELLINIEN	47
4.2.4	BESTIMMUNG DER PROTEINKONZENTRATION	48
4.2.5	AUFREINIGUNG GEGEN ENDOTOXIN.....	48
4.2.6	NACHWEIS AUF ENDOTOXINE (LIMULUS AMÖBOZYTENLYSAT TEST, LAL-TEST)	49
4.2.7	BIOTIN-MARKIERUNG	49
4.2.8	SDS-PAGE	50
4.2.9	WESTERN BLOT	51
4.2.10	PEPTIDE	52
4.2.11	KOMPLEXIERUNG VON PROTEINEN UND PEPTIDEN.....	52
4.2.12	EUROPIUM-FLUORESCENZ-ASSAYS (DELFI)A)	53

4.3	ZELLKULTUR UND ZELLBIOLOGISCHE METHODEN	55
4.3.1	GEWINNEN VON HUMANEM SERUM FÜR DIE ZELLKULTUR	55
4.3.2	ZELLKULTUR IMMORTALISierter B-ZELLINIEN ZUR HLA-DR-ISOLIERUNG	55
4.3.3	AUFREINIGUNG VON PBMCs (FICOLL).....	55
4.3.4	ISOLIERUNG UND KULTUR VON MONOZYTEN.....	56
4.3.5	ANTIKÖRPERFÄRBUNG.....	56
4.3.6	DURCHFLUSSZYTOMETRIE	56
4.3.7	AUFNAHMEASSAYS.....	57
4.3.8	QUENCHEN	58
4.3.9	ANALYSE DER KOMPLEXAUFNAHME MITTELS KONFOKALER LASER SCANNING MIKROSKOPIE	59
4.3.10	STATISTISCHE ANALYSEN	59
5	ERGEBNISSE	60
5.1	AUFNAHME VON HUMANEN HSP70:PEPTID-KOMPLEXEN IN ANTIGENPRÄSENTIERENDE ZELLEN.....	60
5.1.1	PEPTIDAUFNAHME IM ZEITRAUM VON 0-11 STUNDEN	61
5.1.2	VERGLEICH VERSCHIEDENER PEPTIDKONZENTRATIONEN BEI DER KOMPLEXAUFNAHME	62
5.1.3	ZEITREIHENUNTERSUCHUNG DER AUFNAHME VON HSP70:TT₉₄₇₋₉₆₆ KOMPLEXEN IN ANTIGENPRÄSENTIERENDE ZELLEN MITTELS DURCHFLUSSZYTOMETRISCHER ANALYSE.....	64
5.2	MIKROSKOPISCHE UNTERSUCHUNG DER AUFNAHME VON TT₉₄₇₋₉₆₆-FITC IN ANTIGENPRÄSENTIERENDE ZELLEN.....	66
5.2.1	VISUALISIERUNG DER PEPTIDAUFNAHME MITTELS KONFOKALER LASER MIKROSKOPIE.....	67
5.2.2	INTRAZELLULÄRE LOKALISATION VON TT₉₄₇₋₉₆₆-PEPTIDEN	70
5.3	KLONIERUNG VON HSP70	73
5.4	ETABLIERUNG VON BINDUNGSASSAYS	81
5.5	BINDUNGSSTUDIEN MIT VERKÜRZUNGSMUTANTEN	84

5.6	KLONIERUNG EINES OPTIMIERTEN VEKTORS FÜR DIE EXPRESSION HUMANER PROTEINE UND MUTATIONEN	86
5.7	BINDUNGSSTUDIEN MIT A405G.....	90
5.8	BINDUNGSSTUDIEN MIT WEITEREN MUTANTEN.....	93
6	DISKUSSION.....	96
6.1	HSP70 IN DER IMMUNANTWORT	96
6.2	KEINE BESCHLEUNIGTE AUFNAHME IN ANTIGENPRÄSENTIERENDE ZELLEN DURCH CHAPERONIERUNG VON PEPTIDEN MIT HSP70	98
6.3	GESCHWINDIGKEIT DER AUFNAHME UND LOKALISATION VON PEPTIDEN.....	102
6.4	OPTIMIERUNG DER DELFIA BINDUNGSASSAYS.....	105
6.5	OPTIMIERUNG DER DNA-STRUKTUR VON HSP70	107
6.6	DIE PUNKTMUTATION A405G ZEIGT REDUZIERTER SUBSTRATBINDUNG.....	111
6.7	VALIN 437 IST KEINE FÜR DIE SUBSTRATBINDUNG RELEVANTE AMINOSÄURE.....	113
6.8	DAS C-TERMINAL VERKÜRZTE AS-FRAGMENT VON HSP70 KANN WEITERHIN PEPTIDE BINDEN.....	115
6.9	DIE HLA-DR BINDUNG WIRD VON KEINER DER UNTERSUCHTEN MUTATION IM HSP70-PROTEIN BEEINFLUSST	117
6.10	WEITERFÜHRENDE UNTERSUCHUNGEN UND AUSBLICK	120
7	ANHANG	123
7.1	SEQUENZEN.....	123
7.1.1	SEQUENZVERGLEICH HUMANES UND BOVINES HSP70A1A	123
7.1.2	SEQUENZVERGLEICH HUMANES HSP70 UND BAKTERIELLES HSP70 HOMOLOG DNAK.....	124
7.1.3	SEQUENZVERGLEICH DNA-SEQUENZ WILDTYPISCHES GEN M11717 (HSPA1A) UND DNA-SEQUENZ HSP70 AUS EXPRESSIONSVEKTOR (QIAGENE).....	125
7.1.4	SEQUENZVERGLEICH DER PROTEINSEQUENZEN VON HSP70 UND HSP70 AUS EXPRESSIONSVEKTOR (QIAGENE)	127

7.1.5	MUTATIONEN IN DER DNA-/ PROTEIN-SEQUENZ VON HSP70A1A AUS EXPRESSIONSVEKTOR (QIAGENE) MIT PRIMERSEQUENZEN	128
7.2	VERZEICHNISSE	131
7.2.1	LITERATURVERZEICHNIS	131
7.2.2	ABBILDUNGS- UND TABELLENVERZEICHNIS.....	141
7.2.3	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	144
7.2.4	EINBUCHSTABENCODE DER AMINOSÄUREN	149
8	ANLAGEN.....	150
	AUS DIESER ARBEIT HERVORGEANGENE VERÖFFENTLICHUNGEN:	150
	KONGRESSBEITRÄGE	150
	FÖRDERUNGEN.....	150
	WISSENSCHAFTLICHE LEHRER	151
	LEBENS LAUF	152
	WISSENSCHAFTLICHE ZUSAMMENARBEIT	154
	DANKSAGUNG.....	155

Anmerkung:

Die Nomenklatur der Hitzeschockproteinen wird in dieser Arbeit folgendermaßen verwendet:

Die Schreibweise in Großbuchstaben (z. B. HSP70) bezieht sich auf die gesamte Klasse von HSP-Molekülen mit diesem Molekulargewicht, wird nur der Anfangsbuchstabe groß geschrieben (z. B. Hsp70) bezieht sich dies auf ein bestimmtes Hitzeschockprotein dieser Klasse. Bei dem in dieser Arbeit verwendeten Protein Hsp70 handelt es sich um das humane Hitzeschockprotein mit einer Größe von 72 kDa, das vom Gen *HSPA1A* (Gennummer 3303/ M11717) kodiert wird.

1 ZUSAMMENFASSUNG

Hitzeschockproteine (HSPs) sind eine große Gruppe hoch konservierter, intrazellulärer Proteine, die ubiquitär vorkommen und ihrer Größe nach in verschiedene Familien eingeteilt werden. Hitzeschockproteine sind in erster Linie für die intrazelluläre Chaperonierung von Proteinen bei Stress verantwortlich, helfen aber auch bei der Faltung, Entfaltung oder beim Abbau von Proteinen. Sie spielen aber auch eine Rolle in der Immunabwehr. So sind zum Beispiel Hitzeschockprotein 70 (Hsp70):Peptid Komplexe in der MHC-I und MHC-II vermittelten Antigenpräsentation involviert. In der vorliegenden Arbeit sollte die Bedeutung des Hsp70 bei der Chaperonierung antigener Peptide und der daraus resultierenden verstärkten Proliferation von antigenspezifischen CD4⁺ Lymphozyten näher charakterisiert werden.

Zunächst wurde der Frage nachgegangen, ob die Chaperonierung von antigenen Peptiden mit Hsp70 zu einer verstärkten Aufnahme in antigenpräsentierende Zellen führt. Dazu wurden Monozyten mit humanem Hsp70 und FITC-markierten Peptiden von Tetanustoxin (TT₉₇₄₋₉₆₆) oder Peptid alleine inkubiert und die Aufnahme über mehrere Stunden hinweg durchflusszytometrisch untersucht. Es konnte jedoch keine schnellere oder erhöhte Aufnahme von Hsp70:Peptid-Komplexen festgestellt werden.

Es erfolgten Untersuchungen mittels konfokaler Mikroskopie um die intrazelluläre Lokalisation der Peptide zu überprüfen. Hierbei konnte gezeigt werden, dass sich die markierten Peptide nach 3 Stunden in späten Endosomen innerhalb der Zelle befinden.

Die molekularbiologischen Untersuchungen einer Interaktion von HLA-DR und Hsp70 bilden den zweiten Teil dieser Arbeit. Mit Hilfe von Sequenzvergleichen wurden die für eine Substratbindung wichtigen Aminosäuren im humanen Hsp70 identifiziert und zielgerichtet mutiert. Weiterhin wurde eine Deletion der C-terminalen Domäne durchgeführt. In quantitativen Bindungsassays (DELFI) wurden die verschiedenen Mutationen dann hinsichtlich ihrer Bindungsaktivitäten

Zusammenfassung

getestet. So wurde gezeigt, dass eine Mutation in der Substratbindedomäne von Alanin 405 zu Glycin zu einem Verlust der Substratbindeaktivität führt, während sowohl eine Mutation vom Valin 437 zu Glycin als auch die Deletion der C-terminalen Domäne keinen Einfluss auf die Substratbindung hatten. Eine Bindung aller Mutanten an HLA-DR blieb allerdings unverändert im Vergleich zum Wildtyp Hsp70. Eine Bindung von Hsp70 an HLA-DR zeigte sich als substratunabhängig. Als potentielle Bindestellen an HLA-DR konnte der C-Terminus und die Substratbindedomäne von Hsp70 ausgeschlossen werden. Die Interaktion zwischen HLA-DR und Hsp70 liegt vermutlich im Bereich der ATPase Domäne von Hsp70.

Das Vorhandensein einer alternativen Bindestelle von HLA-DR an Hsp70 außerhalb der Substratbindedomäne ermöglicht eine direkte Übertragung eines Hsp70-chaperonierten Peptides in die Bindegroove von HLA-DR. Die erleichterte Beladung von MHC-II Molekülen führt zu einer effektiveren Präsentation an der Oberfläche antigenpräsentierender Zellen, die eine verstärkte Proliferation von antigenspezifischen CD4⁺-T-Lymphozyten zur Folge hat.

2 EINLEITUNG

2.1 DAS IMMUNSYSTEM DES MENSCHEN

Eine Bedrohung durch Einwirkungen von außen abzuwehren gehört zu den überlebenswichtigen Aufgaben eines Organismus. Sei es ein Fraßfeind von Pflanzen, ein Bakteriophage bei Mikroorganismen oder eine bakterielle Infektion beim Menschen – jedes Reich hat seine eigenen Feinde und so auch seine eigenen Abwehrmechanismen entwickelt. Beim Menschen übernimmt diese Aufgabe das Immunsystem, ein komplexes Zusammenspiel von Organen, Zellen und Proteinen. Es schützt den Organismus vor körperfremden Krankheitserregern wie Viren, Bakterien, Pilzen und Parasiten, aber auch vor körpereigenen, entarteten Zellen. Um wirksam vor Krankheiten zu schützen, muss das Immunsystem 4 Hauptaufgaben bewältigen:

- Das Vorhandensein einer Infektion erkennen
- Die Infektion eindämmen
- Die Immunreaktion unter Kontrolle halten und
- Vor einem erneuten Auftreten der Krankheit schützen.

Diese Aufgaben werden von verschiedenen Komponenten des Immunsystems ausgeführt, wobei in angeborene und der erworbene Immunität unterschieden wird [Murphy *et al.*, 2009, p. 54 ff.].

2.1.1 DIE ANGEBORENE IMMUNITÄT

Die angeborene Immunität, früher auch fälschlicherweise unspezifische Immunität genannt, ist der entwicklungsgeschichtlich älteste Bestandteil des humanen Immunsystems. Ihre Aufgabe besteht darin, schon beim ersten Kontakt mit einem Erreger diesen schnell und unspezifisch zu beseitigen. Dazu gehört schon bereits das mechanische Verhindern des Eindringens, weshalb Haut und Schleimhäute ebenfalls zur angeborenen Immunität gezählt werden.

Einleitung

Der Hauptbestandteil dieser Immunabwehr sind Makrophagen oder neutrophile Granulozyten, die über die sogenannten „*Toll-like*“-Rezeptoren körperfremde Strukturen erkennen. Es handelt sich hierbei um verschiedene Strukturmerkmale, die häufig bei viralen oder bakteriellen Pathogenen vorkommen, sich aber von körpereigenen Strukturen effizient unterscheiden lassen [Akira *et al.*, 2001, Akira & Takeda, 2004].

Wird eine körperfremde Struktur erkannt, beginnen die Fresszellen (Makrophagen) den Eindringling zu phagozytieren. Parallel dazu wird eine Signalkaskade in Gang gesetzt, die eine Entzündungsreaktion des infizierten Gewebes auslöst. Diese kann auch durch das Komplementsystem, eine Gruppe von Plasmaproteinen, ausgelöst werden [Janeway & Medzhitov, 2002, Kawai & Akira, 2010].

Ebenso zur angeborenen Immunität gehören die natürlichen Killerzellen (NK-Zellen). Ihre Aufgabe ist es, virusinfizierte oder Tumorzellen zu erkennen und die Zielzellen durch sekretorische Zellyse ohne vorherige Immunisierung oder Aktivierung zu töten. Ob NK-Zellen andere Zellen töten, hängt von der Balance von Signalen ab, die die NK-Zellen über aktivierende und inhibierende Rezeptoren erhalten. NK-Zellen sind auch in der Lage autologe Tumorzellen zu lysieren, was über die aktivierenden Rezeptoren vermittelt wird [Smyth *et al.*, 2002].

2.1.2 DIE ERWORBENE IMMUNITÄT

Die erworbene Immunität stellt ein komplexes System verschiedener Zellen und Eiweißstoffen dar. Die zellulären Bestandteile sind T-Lymphozyten, B-Lymphozyten und antigenpräsentierende Zellen (APZ).

B-Zellen reifen im Knochenmark heran und sind für die Vermittlung der humoralen Immunabwehr verantwortlich. Antigene werden über den spezifischen B-Zell-Rezeptor gebunden, internalisiert und intrazellulär prozessiert. Antigene Peptide werden dann auf der Oberfläche über MHC-Moleküle (*major*

Einleitung

histocompatibility complex) präsentiert. B-Lymphozyten zählen daher auch zu den antigenpräsentierenden Zellen. Es kommt zur klonalen Expansion der B-Zellen und zur Differenzierung in Plasmazellen, die Antikörper ausschütten und Gedächtniszellen zum Schutz vor einer erneuten Infektion [Flajnik, 2002, Gerlach *et al.*, 2011].

T-Lymphozyten reifen im Thymus heran und vermitteln die zelluläre Immunabwehr. Bindet ein naiver T-Lymphozyt mit seinem spezifischen T-Zellrezeptor ein präsentiertes Antigen und zusätzlich mit CD28 an CD80/CD86 einer Antigenpräsentierenden Zelle, differenziert er zur Effektorzelle. Man unterscheidet T-Lymphozyten aufgrund ihrer Oberflächenrezeptoren in CD4⁺ und CD8⁺ T-Lymphozyten [Mosmann *et al.*, 1986]. CD4⁺ T-Lymphozyten werden auch als T-Helferzellen (Th-Zellen) bezeichnet, da sie Makrophagen stimulieren und ihrerseits B-Lymphozyten zur Expansion anregen. CD8⁺ T-Lymphozyten sind für die zytotoxische Immunantwort verantwortlich und darauf spezialisiert intrazelluläre Infektionen, insbesondere durch Viren, zu bekämpfen. Weiterhin können sie so auch körpereigene, entartete Zellen (Tumorzellen) bekämpfen. Weitere antigenpräsentierende Zellen sind außerdem die bereits erwähnten phagozytierenden Makrophagen und dendritische Zellen [Steinman & Cohn, 1973]. Sie präsentieren ebenfalls aufgenommene antigene Strukturen auf MHC-Molekülen.

2.2 ANTIGENPRÄSENTATION

Um als Peptide auf der Oberfläche von Zellen präsentiert und von T-Lymphozyten erkannt werden zu können, müssen Antigene zunächst prozessiert werden. Diese Prozessierung für die Beladung von MHC-I erfolgt im endoplasmatischen Retikulum. Je nach Art der Präsentation gelangt das Antigen aber auf unterschiedliche Weise dorthin.

2.2.1 ANTIGENPRÄSENTATION MITTELS MHC-I

Moleküle aus zelleigenem Zytoplasma, wie sie auch bei einer viralen Infektion entstehen oder zelleigene Proteine entarteter Zellen, werden auf den Haupthistokompatibilitätskomplexen MHC Klasse I Molekülen präsentiert. Zu diesen gehören die humanen Leukozytenantigene (*human lymphocyte antigens* (HLA), HLA-A, -B und -C). Der MHC-I Rezeptor kann aufgrund seiner dreidimensionalen Struktur nur Peptide von 8-10 Aminosäuren Länge binden. Die Bindung erfolgt über Wasserstoffbrücken, die sich zwischen den Enden des Peptides und der Bindungstasche ausbilden. Daher werden Moleküle vom Proteasom in Peptide zerlegt, aktiv ins endoplasmatische Retikulum transportiert und dort auf neu synthetisierte MHC-I Moleküle geladen. Ist eine stabile Bindung zustande gekommen, faltet sich das MHC-I vollständig und wird von Vesikeln an die Oberfläche transportiert. Dort präsentiert und aktiviert es ausschließlich CD8⁺ T-Lymphozyten [Murphy *et al.*, 2009, p. 171 f.]. Das MHC-I gebundene Peptid wird hierbei durch den T-Zellrezeptor erkannt und gebunden. MHC-I wird zusätzlich vom CD8-Korezeptor erkannt [York & Rock, 1996].

2.2.2 ANTIGENPRÄSENTATION MITTELS MHC-II

Die Synthese von MHC-II Molekülen (zu diesen gehören HLA-DR, -DQ und -DP) findet ebenfalls im endoplasmatischen Retikulum (ER) statt, jedoch nur in sogenannten professionellen antigenpräsentierenden Zellen – dendritische Zellen, Monozyten, Makrophagen und B-Lymphozyten. MHC-II Moleküle bestehen aus 2 Untereinheiten, der α - und der β -Untereinheit, die beide in der Zellmembran verankert sind.

Die Bindungsspalte ist hier nicht an den Enden geschlossen, so dass auch größere Peptidketten von 12-24 Aminosäuren Länge gebunden werden können. Eine Beladung mit zelleigenen Antigenen wird jedoch im ER verhindert, da die Bindungsfurche durch eine invariante Kette blockiert ist [Zhu, Y. *et al.*, 2003].

Die so vorbeladenen Komplexe werden nicht präsentiert, sondern in Endosomen transportiert. Hier treffen sie auf extrazelluläre Proteine, bzw. deren Peptide, die nach der rezeptorvermittelten Endozytose oder Phagozytose in Lysosomen gespalten wurden und mit Endosomen zu Lysoendosomen fusionieren. Somit herrscht noch ein saures Milieu vor, das zur Degradation der invarianten Kette führt. Es bleibt nur noch das Bindungsgruben-assoziiertes Peptid CLIP (*class II-associated invariant chain peptide*) übrig. CLIP wird gegen ein antigenes Peptid ausgetauscht welches anschließend auf dem MHC-II an der Oberfläche präsentiert wird. Beladene MHC-II Moleküle aktivieren $CD4^+$ T-Lymphozyten (T-Helferzellen).

Die Erkennung der MHC-II gebundenen Peptide erfolgt über den T-Zellrezeptor, während ein $CD4$ -Korezeptor zusätzlich an MHC-II bindet [Rocha & Neefjes, 2008, Trombetta & Mellman, 2005]. Allerdings benötigen sowohl $CD4^+$ als auch $CD8^+$ T-Lymphozyten noch ein zweites Signal zur Aktivierung. Diese Funktion übernehmen $CD80$ und $CD86$, die vom ko-stimulatorischen Rezeptor $CD28$, der auf naiven T-Zellen vorkommt, gebunden werden [Bhatia *et al.*, 2006, Fuse *et al.*, 2011].

2.2.3 KREUZPRÄSENTATION

Die Überschneidung der Präsentationswege von MHC-I und MHC-II wird Kreuzpräsentation genannt. Dabei werden exogene Peptide nach dem Abbau von extrazellulärem Material auf MHC-I Moleküle übertragen und aktivieren somit CD8⁺ zytotoxische T-Lymphozyten [Singh-Jasuja *et al.*, 2000b]. Die Kreuzpräsentation findet vorwiegend in dendritischen Zellen statt, die extrazelluläre Proteine von abgestorbenen Zellen rezeptorvermittelt oder durch Pinozytose aufnehmen. Vermutlich ist diese Form von Antigenpräsentation vor allem für mit Viren infizierte Zellen oder Tumorzellen von Bedeutung, die keine eigene Immunantwort auslösen können.

2.3 HITZESCHOCKPROTEINE

Hitzeschockproteine (HSPs) sind hochkonservierte, intrazelluläre Proteine, die ubiquitär in allen Pro- und Eukaryoten vorkommen und nach ihrem Molekulargewicht in Familien eingeteilt werden. Sie werden unterteilt in die kleinen Hitzeschockproteine (ca. 10-30 kDa), die meist im Nukleus vorkommen, die HSP40-Familie, die Chaperonine (HSP60-Familie), sowie die großen HSPs (70, 90 oder 110 kDa). Diese verteilen sich in der Zelle auf verschiedene Kompartimente wie dem Zytosol, endoplasmatischem Retikulum (ER), Chloroplasten bei Pflanzen und den Mitochondrien [Lindquist & Craig, 1988].

Hitzeschockproteine machen bis zu 5 % der gesamten intrazellulären Proteine einer Zelle aus, in Stresssituationen kann ihr Gehalt aber auch auf über 15 % ansteigen [Srivastava, 2002b]. 1962 wurden sie in den Riesenchromosomen der Speicheldrüsen von *Drosophila hydei* entdeckt, nachdem diese versehentlich zu hohen Temperaturen ausgesetzt waren. An bestimmten Stellen im Genom konnte hierauf eine verstärkte Genaktivität festgestellt werden [Ritossa, 1962].

Nicht nur durch Hitze, sondern auch durch andere Stress-Faktoren (z. B. Hypoxie, Glucosemangel, bei Pflanzen auch osmotischer Stress [Kruse & Klopstech, 1992, Santoro, 2000, Tissières *et al.*, 1974]) wird die Expression vieler HSPs durch sogenannte Hitzeschocktranskriptionsfaktoren (HSFs) induziert, die bei den genannten Stressarten induziert werden. Neben den induzierbaren Hitzeschockproteinen gibt es auch noch andere HSPs, die auch unter Normalbedingungen konstitutiv exprimiert werden, wie das HSC (*heat shock cognate protein*) [Lindquist, 1986].

Eine Vielzahl von Funktionen wurde für HSPs beschrieben, wie die sogenannten „housekeeping“-Funktionen (zu Deutsch Ordnungsfunktionen) als molekulare Chaperone, die dem Schutz der Zelle vor Stress dienen [Hendrick & Hartl, 1993].

Einleitung

Ihre Hauptaufgabe besteht in der Bindung von Proteinen, hier helfen sie bei der Synthese, Faltung und Entfaltung sowie beim Zusammenführen verschiedener Untereinheiten, aber auch der Degradation von Proteinen [Bukau & Horwich, 1998].

In Stresssituationen stabilisieren sie durch ihre bindenden Eigenschaften Proteine und schützen sie vor der Entfaltung oder helfen bei deren Rückfaltung. Weiterhin können HSPs auch dem Transport von neu gebildeten Proteinen dienen [Gething & Sambrook, 1992, Haas, 1991, Hartl & Hayer-Hartl, 2002, Lindquist, 1986, Parsell & Lindquist, 1993].

In den letzten Jahren wurde gezeigt, dass HSPs auch wichtige Funktionen in der angeborenen und erworbenen Immunität erfüllen [Übersicht bei Srivastava [2002a] und Javid *et al.* [2007]]. Gp96 beispielsweise kann dendritische Zellen aktivieren, wodurch deren Reifung induziert wird, weiterhin werden pro-inflammatorische Zytokine ausgeschüttet und ko-stimulatorische Moleküle induziert [Singh-Jasuja *et al.*, 2000a]. Auch wurde bereits gezeigt, dass HSP chaperonierte Peptide von antigenpräsentierenden Zellen rezeptorvermittelt beispielsweise über CD91 [Fischer *et al.*, 2010] aufgenommen werden können und so die Immunantwort um ein Vielfaches verstärken.

Hitzeschockproteine können auch selbst als Antigene fungieren und eine immunmodulatorische Rolle übernehmen [Wieten *et al.*, 2010]. Dies ist jedoch von der Immunreaktion gegenüber dem chaperonierten Antigen im Antigen:HSP-Komplex, wie in dieser Arbeit vorgestellt, zu unterscheiden. Auf das in dieser Arbeit verwendete Hitzeschockprotein Hsp70 soll nun gesondert eingegangen werden.

2.3.1 HSP70 MOLEKÜLE

Am besten untersucht ist die Familie der HSP70 Moleküle. Ihre Mitglieder besitzen den höchsten Grad an evolutionärer Konservierung. Beim Menschen sind 13 HSP70 Moleküle bekannt, bei Bakterien dagegen nur 3, eines von ihnen ist das DnaK. Auch hier wird zwischen induzierbaren (z. B. Hsp70) und konstitutiv exprimierten Proteinen (z. B. Hsc70, ein 73 kDa großes Molekül) unterschieden (siehe Tabelle 1).

Die Hauptaufgabe von HSP70 Molekülen ist die Unterstützung der Zellfunktionen bei thermischem oder oxidativem Stress. Hierbei ist besonders ihre Fähigkeit zur Bindung von Proteinen und der Schutz vor deren Entfaltung wichtig. Auch sind sie Transportmoleküle, die noch nicht fertig gefaltete Proteine während des Transports zu ihrem Bestimmungsort innerhalb der Zelle stabilisieren und bei der korrekten Faltung unterstützen. Sie interagieren hierbei mit vielen Kofaktoren, auf die hier allerdings nicht näher eingegangen werden soll [Tavaria *et al.*, 1996].

Weiterhin haben sie, wie auch die HSP90 Moleküle, die Fähigkeit eine Vielzahl von Peptiden zu binden [zusammengefasst in Rüdiger *et al.* [1997]]. Darunter befinden sich auch Peptide, die als Antigene fungieren können, wodurch sie unter anderem in der Immunantwort eine Rolle spielen. So wurde beispielsweise bei Hsp70-defizienten Mäusen gezeigt, dass keine Aktivierung autoreaktiver T-Lymphozyten mehr stattfindet [Mycko *et al.*, 2008]. Ebenso konnte nachgewiesen werden, dass die Antigenpräsentation auf dendritischen Zellen bei Hsp70-Defizienz vermindert ist [Zietara *et al.*, 2009]. Eine verstärkte Aktivierung von antigenspezifischen CD4⁺ und CD8⁺ T-Lymphozyten gegen HSP70-gebundene Peptide wurde im murinen Modell nachgewiesen [Singh-Jasuja *et al.*, 2000b, Tobian *et al.*, 2004, Udono & Srivastava, 1993].

Einleitung

Tabelle 1: Die humanen Hitzeschockproteine der 70kDa Familie

Genbezeichnung, Proteinname, Synonym, Lokalisation und Stressinduzierbarkeit (sofern bekannt) der bisher bekannten Mitglieder der HSP70 Familie (nach Tavaría *et al.* [1996] und Daugaard *et al.* [2007]).

Genbezeichnung	Proteinname	Synonyme	Lokalisation	Stressinduziert
HSPA1A	Hsp70-1a	Hsp70; Hsp70-1; Hsp72; Hsx70	Zellkern / Zytosol / Lysosom	Ja
HSPA1B	Hsp70-1b	Hsp70-2	Zellkern / Zytosol / Lysosom	Ja
HSPA1L	Hsp70-1L	hum70t; Hsp70t, Hsp70-hom	Zellkern / Zytosol	Ja
HSPA2A	Hsp70-2A	Hsp70-2A; Hsp70-3	Zellkern / Zytosol	Nein
HSPA2B	Hsp70-2B	Hsp70-2B; Hsp70-3-		Nein
HSPA4	Hsp70-6	Hsp70RY		Nein
HSPA5	Hsp70-5	BiP; Grp78; MIF2	ER	Nein
HSPA6	Hsp70-6	Hsp70B'; Hsp70-6	Zellkern / Zytosol	Ja
HSPA7	Hsp70-7	Hsp70-7; Hsp70B		Nein
HSPA8	Hsp70-8	Hsc70; Hsc71; Hsp71; Hsp73	Zellkern / Zytosol	Nein
HSPA9	Hsp70-9	Grp75; mtHSP75; mtHsp70; HspA9B; MOT	Mitochondrien	Nein
HSPA12A	Hsp70-12a			?
HSPA12B	Hsp70-12b			?
HSPA13	Hsp70-13	Stch		?
HSPA14	Hsp70-14	Hsp70-4; Hsp70L1		Nein

2.3.2 STRUKTUR VON HSP70

Die Homologie von DnaK zu eukaryotischen HSP70, sowohl stressinduziertem, als auch konstitutiv exprimiertem HSP70, beträgt zwischen 40 und 50 % [Zhu, X. *et al.*, 1996]. Zwischen bovinem und humanem Hsp70 beträgt die Homologie sogar annähernd 99 %, hier sind nur 8 von 641 Aminosäuren ausgetauscht (Siehe Sequenzen im Anhang, Kapitel 7.1.1). Daher kann man von der Röntgenkristallstruktur des DnaK zumindest teilweise, aber von der Röntgenkristallstruktur des bovinen Hsp70 in jedem Fall auf die Struktur des humanen Hsp70 rückschließen.

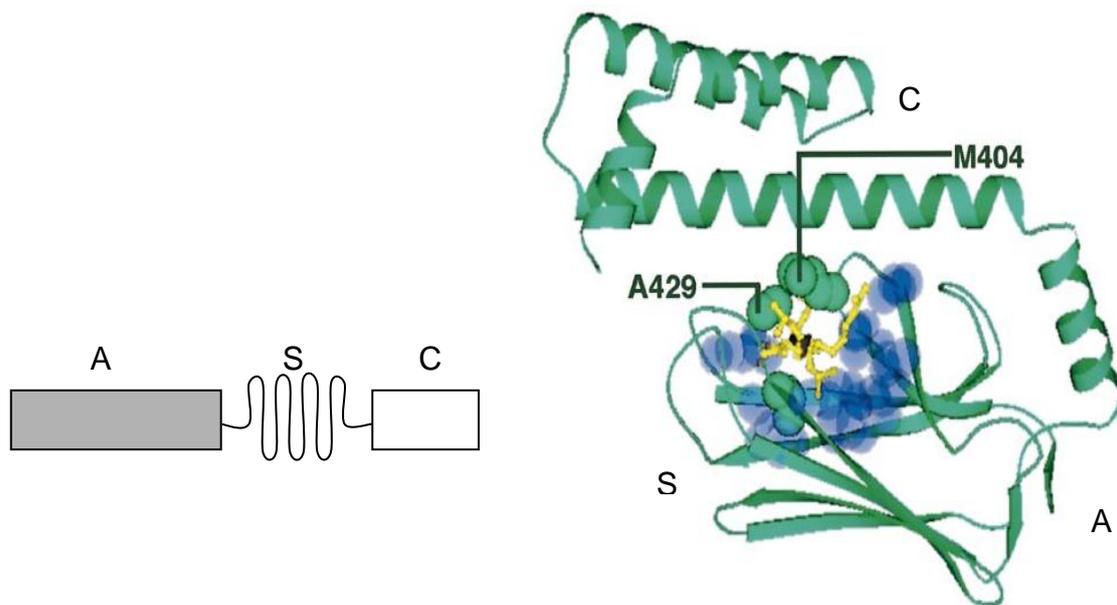


Abbildung 2-1 Schematische Struktur von Hsp70

Links: Lineare Ansicht des Hsp70 Moleküls bestehend aus: ATP-Bindedomäne (A, grau) der β -Faltblattstruktur der Substrat-bindenden Domäne (S) und C-terminus (C, weiß).
Nach Zimmer und Henics [2002].

Rechts: Kristallstruktur von DnaK mit α -helicalen- und β -Faltblattstrukturen. Detaillierte Darstellung der Substratbindedomäne (blau) und der für die Substratbindung wichtigen Aminosäuren (A429, M404, grün), mit gebundenem Peptid (gelb). Nach Rüdiger *et al.* [2000].

Einleitung

Allen HSP70-Molekülen gemeinsam ist eine ATPase-Aktivität sowie die Eigenschaft zur Bindung von kurzen hydrophoben Abschnitten einer Polypeptidkette [Buchberger *et al.*, 1995, McCarty *et al.*, 1995]. Über einer mittelständigen Substratbindedomäne befindet sich eine Art Deckel aus α -Helices (siehe Abbildung 2-1) der bei ATP-Bindung durch eine Konformationsänderung die substratbindende Domäne frei gibt, wodurch Bindungspartner schnell binden und dissoziieren können, bei der Hydrolyse von ATP zu ADP geht die C-terminale Struktur zurück in Ihre Ausgangsposition. Ein Peptid wird durch diese Konformationsänderung fest an die substratbindende Domäne gebunden, eine Dissoziation oder das Binden eines Peptides an eine unbeladene Substratbindestelle ist jetzt nur noch schwer möglich.

Eine Bindung ist daher ATP-abhängig [Zhu, X. *et al.*, 1996]. Insbesondere hydrophobe Aminosäuren, die normalerweise nicht an der Oberfläche eines Proteins exponiert werden, sondern sich nur bei entfalteteten Proteinen oder Peptiden zeigen, werden in der Substratbindedomäne gebunden [Landry *et al.*, 1992].

Für die Bindung verantwortlich sind insbesondere zwei Aminosäuren (siehe Abbildung 2-1, rechts), die in der Röntgenkristallstruktur identifiziert werden konnten und durch zielgerichtete Mutationen in der Substratbindestelle des bakteriellen DnaK bestätigt werden konnten. Hier handelt es sich um Methionin 404 und Alanin 429. Diese beiden Aminosäuren interagieren nach Bindung eines Substrates miteinander und bilden so einen hydrophoben Bogen aus, der das Substrat fest bindet. Methionin 404 wurde durch Alanin ersetzt, wodurch eine Lücke im hydrophoben Bogen besteht und eine Bindung zu Alanin 429 verhindert wird. Eine Substratbindung wurde so reduziert. *In vivo* jedoch erhielt trotz der fehlenden Brückenbindung die M404A Mutation ihre Funktion. Bakterien mit diesem Phänotyp konnten Temperaturen bis 41 °C standhalten [Mayer *et al.*, 2000].

Einleitung

Im Zuge der Identifikation der für eine Substratbindung wichtigen Aminosäuren wurde außerdem Valin an Position 437 (in Abbildung 2-1 nicht dargestellt), eine relativ kleine Aminosäure, durch Phenylalanin ersetzt. Diese Aminosäure wurde ausgewählt, da ihre aktive Gruppe als einzige direkt in das aktive Zentrum zeigt. Damit scheint sie prädestiniert für eine Bindungsaktivität. Die Größe der Phenylgruppe sollte die substratbindende Tasche blockieren. Tatsächlich führte dieser Aminosäuren Austausch zu einer stark reduzierten Bindung. Auch *in vivo* konnte diese Punktmutation den Phänotyp nicht komplementieren [Mayer *et al.*, 2000, Rüdiger *et al.*, 2000, Zhu, X. *et al.*, 1996].

2.4 MÖGLICHE AUFNAHMEMECHANISMEN UND REZEPTOREN VON HSP70

Neben ihren „*housekeeping*“-Funktionen spielen Hitzeschockproteine auch eine wichtige Rolle in der angeborenen und erworbenen Immunabwehr. Wenn Hitzeschockproteine, beispielsweise aus nekrotischen Zellen [Moseley, 2000], freigesetzt werden, können sie an extrazelluläre Peptide binden oder auch mit bereits intrazellulär gebundenen Peptiden von antigenpräsentierenden Zellen aufgenommen werden. Die so gebundenen Peptide werden dann auf der Oberfläche auf MHC-II Molekülen präsentiert, oder auch, über Kreuzpräsentation, auf MHC-I Komplexen und aktivieren dann CD4⁺ oder CD8⁺ T-Zellen [Calderwood *et al.*, 2005, Castellino *et al.*, 2000].

Die verstärkte T-Zellaktivierung durch extrazelluläre HSP:Peptid-Komplexe basiert wahrscheinlich auf der Endozytose der HSPs über einen oder mehrere Rezeptoren in die antigenpräsentierenden Zellen (APZs) [Binder *et al.*, 2004]. Während die Verstärkung der T-Zellaktivierung über MHC Klasse I Moleküle von der rezeptorvermittelten Endozytose über CD91 in die APZ abhängig zu sein scheint [Basu *et al.*, 2001, Binder, 2009], wurde die Präsentation über MHC Klasse II als CD91-unabhängig diskutiert [Tobian *et al.*, 2004].

Es konnte in unserer Arbeitsgruppe mit humanen Monozyten gezeigt werden, dass eine intrazelluläre Aufnahme der Hsp70:Peptid-Komplexe zur MHC Klasse II-verstärkten Antigenpräsentation notwendig ist. Durch Expressionshemmung des Scavenger Rezeptors CD91 durch RNA-Interferenz konnte dieser als ein Endozytoserezeptor für die MHC-II abhängige Präsentation von HSP-chaperonierten Peptiden bestätigt werden [Fischer *et al.*, 2010]. Andere Studien hingegen diskutieren eine CD91-unabhängige Aufnahme [Berwin *et al.*, 2002, Theriault *et al.*, 2005] oder postulieren andere Rezeptoren, meist Scavenger Rezeptor. Beispiele hierfür sind Lox-1 (*lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor-1*) der als Rezeptor für die Aufnahme von Hsp70-chaperonierten Peptiden durch humane dendritische Zellen dient [Delneste *et al.*, 2002].

CD36 [Panjwani *et al.*, 2000] SCARF-1 (*Scavenger rezeptor class F, member 1*) oder FEEL-1 (*fasciclin, EGF-like, laminin-type EGF-like and link domain-containing scavenger rezeptor-1*) werden ebenfalls postuliert. [Berwin *et al.*, 2003, Berwin *et al.*, 2004, Theriault *et al.*, 2006]. Auch die Bindung von Hsp70 an *lipid rafts* führt zur Endozytose. Hierbei konnte gezeigt werden, dass die Aufnahme von Hsp70 in Makrophagen zu einer erhöhten Prozessierung und effizienteren MHC-II Präsentation der Hsp70-gebundenen Peptide führte [Wang *et al.*, 2006] (siehe auch Abbildung 2-2).

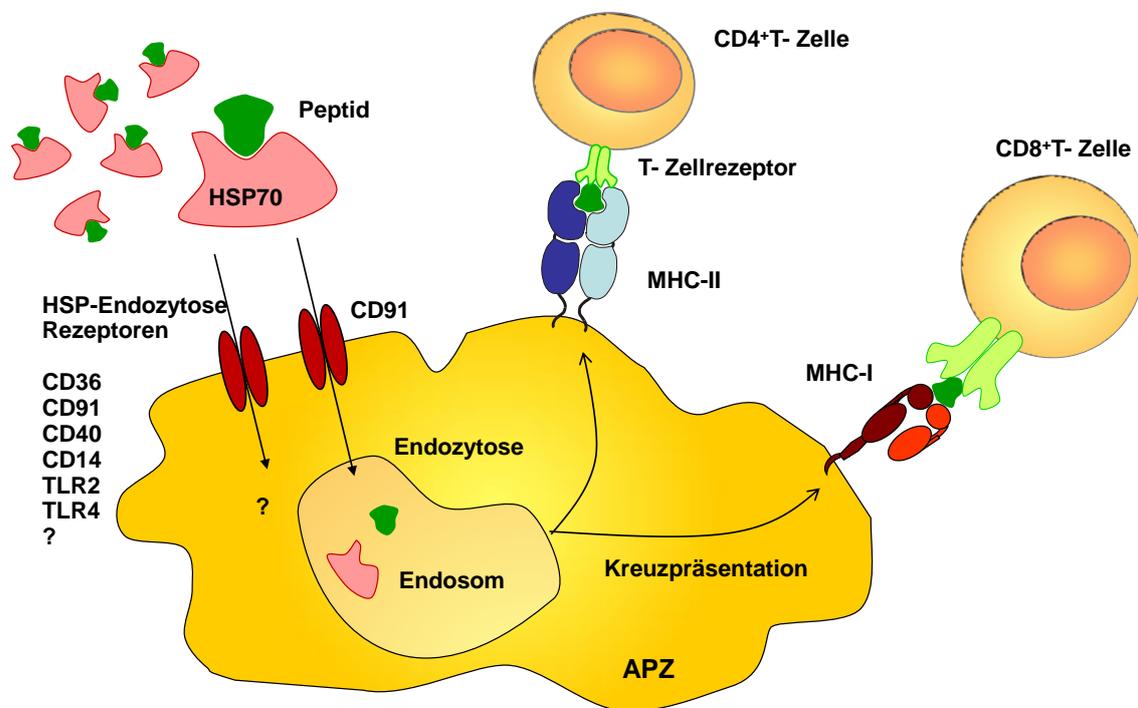


Abbildung 2-2: Schematische Darstellung der Aufnahme und Prozessierung von Hsp70-gebundenem Peptid in einer antigenpräsentierenden Zelle

Aufnahme von Hsp70 chaperonierten Peptiden in eine antigenpräsentierende Zelle erfolgt vermutlich rezeptorvermittelt. Bei der Aufnahme in Endosomen werden Hitzeschockprotein und Peptid voneinander getrennt und das Peptid auf ein MHC-II Molekül übertragen. Dadurch kommt es zur Aktivierung von antigenspezifischen CD4⁺ T-Lymphozyten. Durch Kreuzpräsentation kann die Beladung auf MHC-I Komplexen erfolgen und antigenspezifische CD8⁺ T-Lymphozyten aktivieren. Weitere intrazelluläre Effekte von Hsp70 werden diskutiert. Adaptiert nach Srivastava [2002b].

Einleitung

Ebenso werden die „*toll-like*“ Rezeptoren TLR-2 und TLR-4, die durch ihre Bindung von Hsp60, Hsp70 und Gp96 bei der Aktivierung von antigenpräsentierenden Zellen eine Rolle spielen, als Rezeptoren diskutiert [Asea *et al.*, 2002, Vabulas *et al.*, 2001, Vabulas *et al.*, 2002]. TLR-2, TLR-4 und CD14 sind allerdings ebenfalls sogenannte PRRs („*Patern-Recognition*“ Rezeptoren), die verschiedenste Strukturen erkennen können. So zum Beispiel das Endotoxin Lipopolysaccharid (LPS), das ebenso zur Aktivierung von antigenpräsentierenden Zellen führt. Die aktivierenden Effekte können also gleichermaßen von HSP:Peptid-Komplexen ausgelöst werden, wie von Endotoxinen. Manche Studien diskutieren daher die Effekte von Hsp70 als Endotoxinverunreinigung [Gao & Tsan, 2003, Reed *et al.*, 2003]. Die Liste der möglichen Rezeptoren und Aufnahmemechanismen lässt sich fortsetzen, daher ist höchstwahrscheinlich nicht ein einziger, spezifischer Rezeptor für die Aufnahme von Hsp70 oder Hsp70:Peptid-Komplexen in antigenpräsentierende Zellen verantwortlich, sondern ein Zusammenspiel vieler verschiedener Rezeptoren, die sich untereinander ergänzen.

2.5 MHC KLASSE II-ABHÄNGIGE ANTIGENPRÄSENTATION VON HSP

Einige Arbeiten haben die vermutete Beteiligung von HSPs an der MHC Klasse II-vermittelten Antigenpräsentation gestützt [DeNagel & Pierce, 1992]. So wurde gezeigt, dass eine Überexpression des konstitutiv exprimierten Hsp70-Homologs, Hsc70, in einer murinen Makrophagen-Zelllinie zu einer verstärkten Präsentation von exogenem Antigen über MHC Klasse II führt [Panjwani *et al.*, 1999]. Ebenfalls im murinen Modell wurde eine verstärkte Präsentation von MHC Klasse I- und II-präsentierten Epitopen durch das Hitzeschockprotein gp96 nachgewiesen [Doody *et al.*, 2004].

Arbeiten mit prokaryotischen HSPs zeigten darüber hinaus, dass der Effekt nicht auf eukaryotische HSPs beschränkt ist. So wurde die verstärkte Proliferation mit DnaK, dem Hsp70-homolog aus *E. coli* [Roth *et al.*, 2002], und auch mit HSP aus *Mycobacterium tuberculosis* [Tobian *et al.*, 2005] beobachtet. Auch im Zusammenhang mit der Präsentation von autoantigenen Peptiden, die im Tiermodell der Multiplen Sklerose eine Rolle spielen, wurde durch Hsp70-Überexpression die verstärkte Proliferation von T-Lymphozyten nachgewiesen [Mycko *et al.*, 2004].

Die meisten dieser Arbeiten wurden im Tiermodell bzw. mit T-Zellklonen oder T-Zellhybridomen durchgeführt. Mittels HLA-DR Tetramer-Technologie konnte eine Hsp70-verstärkte CD4⁺ T-Zellantwort in einem humanen, antigenspezifischen System mit T-Zellen gezeigt werden. In unserer Arbeitsgruppe konnte in einem humanen, antigenspezifischen Versuchsansatz gezeigt werden, dass mit Hsp70 komplexierte Peptide eine verstärkte antigenspezifische CD4⁺ T-Zellantwort auslösen [Haug *et al.*, 2005].

Mononukleäre Zellen aus peripherem Blut gesunder, gegen Influenza geimpfter Spender mit bekanntem HLA-DR-Haplotyp, wurden mit Peptiden (Influenza Hämagglutinin HA₃₀₇₋₃₁₉) bzw. Hsp70:Peptid-Komplexen stimuliert. Es konnte gezeigt werden, dass die Stimulation mit Hsp70-gebundenen Peptiden der Stimulation mit Peptid alleine überlegen ist. Für die gefundene Verstärkung war

Einleitung

eine vorausgehende Bindung des Peptides an Hsp70 (Komplexierung) erforderlich.

Der positive Effekt der Peptidbindung an Hsp70 auf die CD4⁺ T-Zellproliferation war am deutlichsten ausgeprägt unter extremen Bedingungen, wie sehr geringen Peptidkonzentrationen von 0,1 µg/ml – 1 µg/ml auf oder einer reduzierten Anzahl APZ. Die Antigenpezifität der Zellen wurde durch die Färbung mittels HLA-DR Tetrameren gezeigt. Ein Effekt aufgrund von mikrobiellen Verunreinigungen (LPS) der Hsp70-Präparation konnte ausgeschlossen werden [Fischer *et al.*, 2010, Haug *et al.*, 2005].

Eine Studie mit bovinem Hsp70 bestätigte kürzlich diese Ergebnisse. Hier konnte eine verstärkte Proliferation antigenspezifischer boviner CD4⁺ T-Zellen nach der Inkubation mit Peptiden aus Maul-und-Klauenseuche Virus (FMDV, *Foot-and-mouth disease virus*) chaperoniert mit bovinem Hsp70 gezeigt werden. Diese traten ebenfalls insbesondere bei geringen Peptidmengen auf [McLaughlin *et al.*, 2010].

Es gibt Hinweise, dass Unterschiede zwischen autoantigenen und alloantigenen Strukturen bei der Präsentation auf MHC-II bestehen. So werden autoantigene Peptide verstärkt präsentiert. Eine Studie mit Hsp90 zeigt, dass das Autoantigen GAD (Glutaminsäuredecarboxylase) nicht mehr auf MHC-II präsentiert wird, wenn die Hsp90 Expression unterbunden wird. Die Expression von MHC-II ist hiervon nicht betroffen und eine Inhibierung der Präsentation von GAD hat keinen Einfluss auf die Präsentation von alloantigenen Strukturen [Houlihan *et al.*, 2009].

2.6 INTRAZELLULÄRER EFFEKT VON HSP

Der intrazelluläre Mechanismus der oben beschriebenen, verstärkten antigenspezifischen CD4⁺ T-Zellantwort durch Hsp70:Peptid-Komplexe ist weitgehend unklar. Vor allem ist ungeklärt, wie HSPs in endosomale MHC Klasse II Beladungskompartimente gelangen. HSPs können nach der Rezeptor-vermittelten Endozytose sowohl in den MHC Klasse I als auch in MHC-II Beladungskompartimenten gefunden werden [Lipsker *et al.*, 2002, Singh-Jasuja *et al.*, 2000b]. Bei der Präsentation eines chaperonierten Peptids aus HSP90:Peptid-Komplexen über MHC Klasse I Komplexe konnte eine Beladung endosomaler MHC Klasse I Moleküle in den frühen Endosomen nachgewiesen werden.

Die Präsentation der Peptide fand bereits nach 30 Minuten statt, was auf einen sehr schnellen und effizienten Prozessvorgang hinweist [Kurotaki *et al.*, 2007]. Des Weiteren können intrazelluläre HSPs über Autophagie-Prozesse in endosomale Kompartimente aufgenommen werden [Dengjel *et al.*, 2005].

In Bindungsstudien konnte gezeigt werden, dass humanes stressinduzierbares Hsp70 sowohl antigene Peptide als auch an ganze HLA-DR Moleküle binden kann. Die Bindung antigener Peptide ist bei niedrigem pH-Wert abgeschwächt, wohingegen ganze HLA-DR Moleküle gerade bei erniedrigten pH-Werten mit humanen Hsp70 Molekülen interagieren [Haug *et al.*, 2007].

Die Interaktion ganzer HLA-DR Moleküle mit Hsp70 konnte nicht durch Peptidfragmente gehemmt werden und war nicht ATP-abhängig, was auf unterschiedliche Bindungsstellen hindeutet [Haug *et al.*, 2007]. Diese Ergebnisse weisen auf eine spezifische Interaktion der ATPase-Domäne von Hsp70 Molekülen mit HLA-DR hin. Es ist davon auszugehen, dass die HLA-DR-Bindung an einer anderen Stelle des Hsp70-Proteins als die Substratbindung stattfindet. Aufgrund der Ergebnisse könnte das ATP-Bindestellen-Fragment ein möglicher Bindungspartner sein.

Einleitung

In den MHC Klasse II Beladungskompartimenten liegt ein erniedrigter pH vor, so dass Hsp70 Moleküle gebundene Peptide abgeben und in einem tertiären Komplex mit MHC Klasse II Molekülen die gebundenen Peptide direkt auf HLA-DR Moleküle übertragen könnten. In Abbildung 2-3 ist diese Hypothese schematisch dargestellt. Diese Ergebnisse sind ein Hinweis darauf, dass humane Hsp70 Moleküle als Vorprüfer für (auto-)antigene Peptide fungieren und diese bei erniedrigtem pH in den endosomalen Beladungskompartimenten in einer direkten Interaktion auf MHC Klasse II Moleküle übertragen können. Im Rahmen dieser Arbeit soll, unter anderem, mit Hilfe von gezielten Mutationen an der Peptid-Bindungsstelle diese Hypothese untersucht werden.

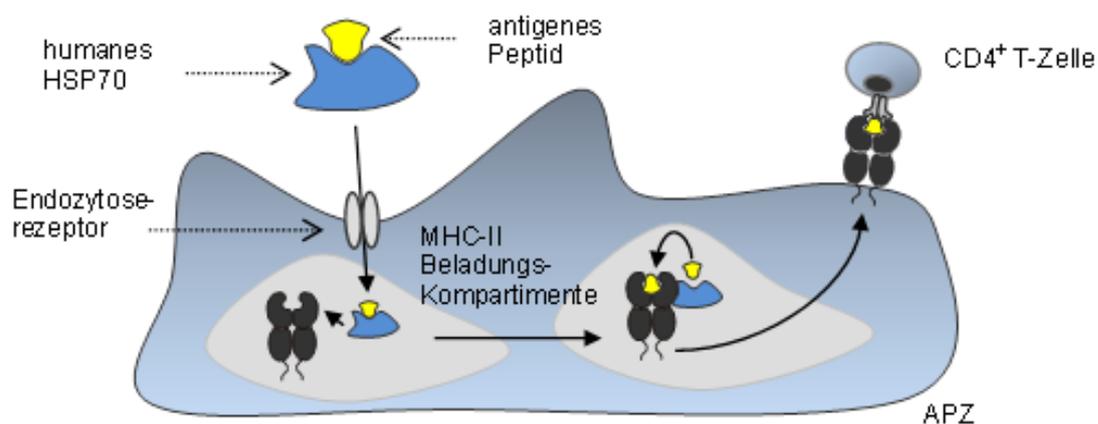


Abbildung 2-3: Hypothese der Interaktion HSP:Peptid-Komplexe und MHC-II.

HSP:Peptid-Komplexe werden von APZ über Endozytose-Rezeptoren aufgenommen und binden in den MHC-II Beladungskompartimenten an ganze HLA-DR Moleküle. Durch den in diesen Kompartimenten vorliegenden niedrigen pH werden die Peptide (gelb) aus der HSP-Bindung gelöst und an das MHC-II Molekül weitergegeben. Es erfolgt die Präsentation des Peptids auf der Zelloberfläche an CD4⁺ T-Zellen. Modifiziert nach Haug *et al.*

2.7 ZIEL DER ARBEIT

Eine erhöhte Proliferation von antigenspezifischen T-Zellen konnte bei Komplexierung von antigenen Peptiden mit Hsp70 bereits gezeigt werden [Haug *et al.*, 2005]. Diese fanden insbesondere bei geringen Peptidmengen statt. Studien mit bovinem Hsp70 konnten dies bestätigen [McLaughlin *et al.*, 2010]. Es stellt sich also die Frage nach dem Hintergrund der gesteigerten Proliferation.

Um zu überprüfen, ob eine erhöhte Peptidaufnahme für die gesteigerte Proliferation verantwortlich ist, sollen Aufnahmeexperimente durchgeführt werden, die sowohl mittels Durchflusszytometrie als auch mit Hilfe konfokaler Mikroskopie ausgewertet werden. FITC-markierte Peptide werden dazu entweder mit Hsp70 chaperoniert oder alleine zu antigenpräsentierenden Zellen gegeben. Nach Inkubationszeiten zwischen wenigen Minuten und mehreren Stunden sollen dann die Unterschiede in der Menge der Aufnahme ausgewertet werden um einen Rückschluss auf eine gesteigerte Aufnahme chaperonierter Peptide ziehen zu können.

Eine andere Hypothese geht von einer gesteigerten intrazellulären Weiterleitung von Peptiden nach Chaperonierung aus. Hierbei stellt sich die Frage, ob eine mögliche Bindung von Hsp70 an HLA-DR die zu einer effizienten Übertragung des Substrates führt. Sollte dies der Fall sein, müsste eine weitere Bindestelle des Hsp70 identifiziert werden, da die Substratbindestelle bereits vom Peptid besetzt ist. Um diesen Sachverhalt aufzuklären soll die Interaktion von humanen Hsp70-Proteinen mit aufgereinigten HLA-DR Molekülen untersucht werden, insbesondere die molekularen Bindungseigenschaften von Hsp70.

Es konnte bereits gezeigt werden, dass die für die Substratbindung verantwortlichen Aminosäuren im bakteriellen Hsp70-homolog DnaK Methionin 404 und Alanin 429 sind, während Valin 436 keinen Einfluss auf die Substratbindung zu haben scheint. Methionin 404 und Alanin 429 bilden eine hydrophobe Brücke, mit der das Substrat gebunden wird. Eine Mutation von

Einleitung

Methionin 404 zu Alanin und Alanin 429 zu Tryptophan verhindert das Ausbilden der Brücke und führt zum Entlassen des Substrates [Mayer *et al.*, 2000].

Valin 436 hingegen ist eine relativ kleine, hydrophobe Aminosäure, die genau in die Bindungstasche von Hsp70 hineinzeigt. Sie wurde durch eine größere Aminosäure, Phenylalanin, ersetzt. Dies sollte die substratbindende Tasche blockieren. Allerdings hatte diese Mutation keinen Einfluss auf die Substratbindung. In dieser Arbeit soll Valin 436 durch eine kleine, hydrophile Aminosäure, Glycin, ersetzt werden um die Wichtigkeit ihrer Bindungseigenschaften zu charakterisieren. Die beiden anderen Aminosäuren in der Substratbindestelle von DnaK sind nicht homolog mit denen im humanen Hsp70. Die im humanen Hsp70 für eine Substratbindung verantwortlichen Aminosäuren sollen ebenfalls ausgemacht und durch zielgerichtete Mutationen weiter analysiert werden. Mutierte Proteine sollen hinsichtlich der Bindung von Peptiden in der Substratbindedomäne und der Bindung an HLA-DR Moleküle charakterisiert werden.

Der C-terminale Deckel, der sich ATP-abhängig über der Substratbindedomäne schließt, ist ebenfalls für eine feste Bindung des Substrates wichtig. Eine C-terminale Verkürzung des humanen Hsp70 soll Aufschluss über dessen Rolle bei der Substratbindung geben. Weiterhin soll untersucht werden ob der C-Terminus ein möglicher Bindungspartner für MHC-II ist. Eine Bindung an MHC-II würde eine Übertragung der Peptide in die Bindungsgrube begünstigen und so eine verstärkte Präsentation von Peptiden verursachen. Dies ist möglicherweise ein weiterer Mechanismus, der zu einer verstärkten T-Zellproliferation führen könnte.

3 MATERIAL

3.1 GERÄTE

Assistant Rollenmischer RM5	Karl Hecht GmbH & Co. KG
autoMACS [®] Pro Separator	Miltenyi Biotec
Bestrahlungsgerät Gammacell [®] 1000 Elite	MDS Nordion
Bio-Plex Protein Array	Bio-Rad Laboratories
Blotapparatur XCell II [™] Blot Modul	Invitrogen
Brutschrank HERA Cell Inkubator	Heraeus Holding GmbH
Durchflusszytometer FACSCalibur [™]	BD Biosciences
Elektrophorese-Apparatur für Agarosegele	Sigma-Aldrich
ELISA Reader Milenia Kinetic Analyzer	Diagnostic Products Corporation
EVOS fl Fluoreszenzmikroskop	peqlab
Extraktionsgeräte Jura Impressa XF70	Jura Elektrogeräte
Philips Senseo HD7810	Philips Deutschland GmbH
Feinwaage MC1 Analytic AC 210 S	Sartorius AG
Folienschweißgerät Wallac Heat Sealer 1295-012	PerkinElmer
Geltrockner	BioRad
Heizblock Thermomixer 5436	Eppendorf
Kleinschüttler Reax Top	Heidolph Instruments GmbH & Co. KG
Kryo-Einfriergefäß „Mr. Frosty“	Thermo Fisher Scientific
Magnetrührer	Thermo Fisher Scientific
Mehrkanalpipette LABMATE [™]	ABIMED GmbH
Mikrowelle HF 22023	Siemens Elektrogeräte GmbH
Multipipette Multipette [®] Plus	Eppendorf
Neubauer Zählkammer	La Fontaine International GmbH
PCR Gerät Gene AMP PCR Systems 9700	PE Applied Biosystems
pH-Meter pH 538	ITT Corporation
Pipetten LABMATE [™]	ABIMED GmbH

Material

Pipettierhilfe SWIFTPET™	ABIMED GmbH
Präzisionswaage MC1 Analytic AC 210 S	Sartorius AG
Schüttelinkubator	GFL
Schüttler Polymax 1040	Heidolph Instruments GmbH & Co. KG
Spannungsquelle Power Pac 1000	Bio-Rad Laboratories
Standardzentrifuge Rotixa 50 RS/RP	Andreas Hettich GmbH & Co.KG
Sterilwerkbank HERAsafe	Heraeus Holding GmbH
Tischzentrifuge 5415 C	Eppendorf
Tischzentrifuge Mikro 22R	Andreas Hettich GmbH & Co.KG
Umkehrmikroskop LM Olympus IX50	Olympus
Wallac 1420 Victor Multilabel Counter	PerkinElmer
Wasserbad	Gesellschaft für Labortechnik
Zellzählkammer Neubauerzählkammer	La Fontaine International

3.2 VERBRAUCHSMATERIALIEN

4-20 % SDS, 12 well Pierce Protein Gele	Thermo Fisher Scientific
Combitips (2,5 ml)	Eppendorf
Disposable 5ml Polypropylen Röhrchen	Thermo Fischer Scientific
Einfrierröhrchen (1,2 ml)	Corning Incorporated
Einmalpipetten (5 ml, 10 ml, 25 ml)	Corning Incorporated
Eppendorfreaktionsgefäße Safe-Lock (0,5 ml, 1,5 ml, 2 ml)	Eppendorf
MACS® Separationssäulen (5x2)	Miltenyi Biotec
Nitrozellulosemembran (0,45 µm)	Invitrogen
Pipettenspitzen (1 ml)	Sarstedt AG & Co.
Pipettenspitzen (10 µl)	Greiner Bio-One GmbH
Pipettenspitzen (200 µl)	Labnet International
Plastik-Einschweißbeutel	PerkinElmer
Polypropylen-Röhrchen (15 ml, 50 ml)	BD Biosciences Labware
Polystyren Röhrchen (0,5 ml)	Sarstedt AG & Co.
Polystyren Röhrchen (5 ml)	Sarstedt AG & Co.

Material

Röntgenfilme CL-XPosure	Thermo Fisher Scientific
Zellkulturplatten (96 well Rundboden)	Greiner Bio-One GmbH
Zellschaber	Corning Incorporated
Zellsieb (40 µm)	BD Biosciences Labware

3.3 REAGENZIEN, CHEMIKALIEN, LÖSUNGEN

Agarose (elektrophoresis grade)	Duchefa
Agarose (molecular biology grade)	Merck KGaA
Ampuwa® Wasser	Fresenius Kabi Deutschland GmbH
BugBuster	Novagen
Biotin-N-Hydroxysuccinimidinester	Sigma
DELFIA Wash Concentrate, Assay-Buffer, Europium-labelled Streptavidin, Enhancement Solution	PerkinElmer
Essigsäure p.a.	Merck KGaA
Ethidiumbromid	AppliChem GmbH
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck KGaA
Dithiothreitol (DTT)	Carl Roth GmbH + Co. KG
Entwicklerlösung Dokumol	Tetenal AG & Co. KG
Ethanol	Merck KGaA
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Sigma-Aldrich
FACS Clean®	BD Biosciences
FACS Flow®	BD Biosciences
FACS Rinse®	BD Biosciences
FCS (Fetales Kälberserum)	Biochrom
Glycerin	Carl Roth GmbH & Co. KG
Imidazol	Merck KGaA
MACS CD4+ T Cell Isolation Kit II, human,	
MACS Monocyte Isolation Kit, human	Miltenyi Biotec
Methanol	Merck KGaA
Natriumchlorid	Merck KGaA

Material

Natriumdihydrogenphosphat $\text{NaH}_2(\text{PO})_4$	Merck KGaA
Natronlauge (NaOH) 1N	Merck KGaA
Nickel-NTA Agarose	Invitrogen
Phosphate gepufferte Salzlösung (PBS) ohne Ca^{2+} / Mg^{2+}	Biochrom AG
Propidiumiodid	BD Biosciences
Protease Inhibitor Cocktail Tabletten Complete MINI, EDTA frei	Roche
Roti [®] Nanoquant	Carl Roth GmbH & Co. KG
Salzsäure (HCl) 1N	Merck KGaA
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan- hydrochlorid (Tris-HCl)	Carl Roth GmbH & Co. KG
Trypanblau	Sigma-Aldrich
Tween-20	Carl Roth GmbH & Co. KG
Zwittergent 3-12	Calbiochem

3.4 KITS

Limulus Amebocyte Lysate QCL-1000	Lonza
EndoTrap [®] red 5/1	Hyglos GmbH
peqGOLD Plasmid Miniprep Kit I	Peqlab
High Pure PCR Product Purification Kit	Roche

3.5 HERSTELLER

Abcam	Cambridge, Großbritannien
AbD Serotec	Oxford, Großbritannien
ABIMED GmbH	Langenfeld, Deutschland
Adobe Systems	San Jose, CA, USA
Amhersham Pharmacia Biotech	Uppsala, Schweden
Ancell	Bayport, MN, USA
Andreas Hettich GmbH & Co.KG	Tuttlingen, Deutschland
Assay Designs	Ann Arbor, MI, USA
B. Braun Biotech International	Melsungen, Deutschland

Material

Bayer	Leverkusen, Deutschland
BD Biosciences	San Jose, CA, USA
BD Pharmingen	San Jose, CA, USA
Beckmann	München, Deutschland
Biochrom AG	Berlin, Deutschland
BioLegend	San Diego, CA, USA
Bio-Rad Laboratories	München, Deutschland
Cambrex Biosciences	Verviers, Belgien
Carl Roth GmbH + Co.KG	Karlsruhe, Deutschland
Cell Signaling Technology®	Danvers, MA, USA
Dako	Carpinteria, CA, USA
Dharmacon	Chicago, IL, USA
Diagnostic Products Corporation	Los Angeles, CA, USA
Difco Laboratories	Michigan, USA
eBioscience	San Diego, CA, USA
Eppendorf	Hamburg, Deutschland
Eurofins MWG Operon	Ebersberg, Deutschland
Exbio	Prag, Tschechien
Fisher Bioblock Scientific	Illkirch Cedex, Frankreich
Fresenius Kabi Deutschland GmbH	Bad Homburg, Deutschland
GE Healthcare	München, Deutschland
Gesellschaft für Labortechnik	Burgwedel, Deutschland
Gibco BRL	Paisley, Großbritannien
GraphPad Software	La Jolla, CA, USA
Greiner Bio-One GmbH	Frickenhausen, Deutschland
H. Saur Laborbedarf	Reutlingen, Deutschland
Heidolph Instruments GmbH & Co. KG	Schwabach, Deutschland
Heraeus Holding GmbH	Hanau, Deutschland
Hettich	Tuttlingen, Deutschland
Hycult Biotechnology	Uden, Niederlande
Hyglos GmbH	Bernried, Deutschland
Invitrogen	Carlsbad, CA, USA
InvivoGen	San Diego, CA, USA

Material

ITT Corporation	White Plains, NY, USA
Janssen-Cilag	Neuss, Deutschland
Kabi Pharmacia	Erlangen, Deutschland
Kodak	Rochester, NY, USA
La Fontaine International GmbH	Waghäusel, Deutschland
Labnet International	Woodbridge, NJ, USA
Lonza	Walkersville, MD, USA
Machery-Nagel	Düren, Deutschland
MDC Nordion	Fleurus, Belgien
MDS Nordion	Ottawa, ON, Kanada
Mediagnost	Reutlingen, Deutschland
Mediware Servoprax	Wesel, Deutschland
Merck KGaA	Darmstadt, Deutschland
Millipore	Bedford, MA, USA
Miltenyi Biotec	Bergisch Gladbach, Deutschland

3.6 PROTEINE, ENZYME UND PEPTIDE

Hitzeschockproteine (rekombinant)

humanes Hsp70, low endotoxin, StressGen

HLA-DR Moleküle

HLA-DRB1*0401 Exprimiert aus B-Zelllinie SAVC (IHW 9034)

Andere Proteine

Humanalbumin-Lösung 20 % (HSA) Deutsches Rotes Kreuz

Ovalbumin, grade V, mind. 98 % Sigma

Enzyme

Restriktionsenzyme

XbaI, *XhoI*, *BamHI*, *DpnI*, *EcoRI* Fermentas

DNaseI Sigma

Peptide

Tetanustoxin TT₉₄₇₋₉₆₆ FNNFTVSFWLRVPKVSASHL

Influenza Hämagglutinin HA₃₀₇₋₃₁₉ PKYVKQNTLKLAT

Invariant Chain Peptide CLIP₁₀₅₋₁₁₇ SKMRMATPLLMQA

Die Peptide wurden im Labor von Dr. Hubert Kalbacher am Medizinisch Naturwissenschaftlichen Forschungszentrum, Tübingen synthetisiert und gereinigt, sowie zusätzlich Biotin- oder FITC-markiert und für diese Arbeit freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

3.7 ANTIKÖRPER

Monoklonale anti-HSP Antikörper (unmarkiert)

Anti-Hsp70 (SPA-810, Klon C92F3A-5)

Anti-Hsp70 (SPA-820, Klon N27F3-4) StressGen

Monoklonaler anti-HLA-DR-Antikörper

(L-243, unmarkiert) BD Biosciences

Monoklonale Kontroll-Antikörper

Mouse IgG1 FITC,

Mouse IgG2a PE,

Mouse IgG2a APC BD Biosciences

Monoklonale Fluoreszenz-konjugierte Antikörper

Maus-anti-Human CD14 PE (IgG2a)

oder APC (IgG2b)

Maus-anti-Human CD63 PE (IgG1) BD Biosciences

Anti-Mouse IgG1-HRP

Peroxidasekonjugierter Antikörper (X56) BD Biosciences

3.8 OLIGONUKLEOTIDE

Primer zur Amplifikation von Hsp70 aus humaner DNA

3'HSP Überlänge ggaaggaccgagctcttctc

5'HSP Überlänge tgcattgtagaaaccgaaaa

Primer zur Amplifikation von Gesamtlänge- oder Verkürzungsmutanten mit *Bam*HI (forward) oder *Xho*I (reverse) Schnittstelle

hspASfor_bamhi taatattaGGATCCatgaaacaggcaaaagcagcagcaattg

hspASrev_xho ataaataCTCGAGcagggcatttttgcgctaacacgttcacgc

hspSCfor_bamhi taatattaGGATCCaaaagcgaaaatgtgcaggatctgctgctgc

hspSCrev_xho taatattaCTCGAGatcaacttcttcaatggtcggaccgctaccgc

Primer zur Amplifikation einer C-terminalen Verkürzungsmutante aus pEQhsp70A1A mit *Bam*HI (forward) oder *Xho*I (reverse) Schnittstelle

HSP70a1a A1forward ccgccGGATCCatggccaaagccgcggcagtcggc

HSP70a1a S1632reverse ccgccCTCGAGctagtaggactccagggcggttcttggc

Mutationsprimer auf pEQhsp70A1A

A405G_sense TGGGTCTGGAAACCGGAGGTGGTGTTATGAC

A405G_antisense GTCATAACACCACCTCCGGTTTCCAGACCCA

V437G_sense GATAATCAGCCGGGTGGCCTGATTCAGGTTTATG

V437G_antisense CATAAACCTGAATCAGGCCACCCGGCTGATTATC

3.9 ZELLINIEN

Bei der verwendeten Zelllinie (B-LCL) SAVC (IHW 9034) handelt es sich um eine durch EBV-transformierte immortalisierte B-Zelllinie humanen Ursprungs, die aus dem 12th *International Histocompatibility Workshop (IHW) Cell Panel* stammt. Sie exprimiert homozygot HLA-DRB1*0401, dessen Sequenz der hypervariablen Region 3 ist ⁷⁰QKRAA⁷⁴.

3.10 MEDIEN

LB-Medium	2 % LB Broth (w/v) für LB-Platten zusätzlich 1,2 % (w/v) Agar
SOC-Medium	2 % Bacto-Trypton (w/v) 0,5 % Bacto Hefeextrakt (w/v) 10 mM NaCl 2,5 mM KCl 10 mM MgCl ₂ 10 mM MgSO ₄ 20 mM Glukose pH 6,8 – 7,0 (NaOH)
Antibiotika für Bakterienkultur	Ampicillin 100 mg/ml in ddH ₂ O Endkonzentration: 100 µg/ml Kanamycin 50 mg/ml in ddH ₂ O Endkonzentration: 50 µg/ml

Material

Medium für die Monozytenkultur	RPMI 1640 Medium (very low endotoxin) 10 % gepooltes humanes Serum 2 mM Glutamin 0,06 mg/ml Penicillin 0,1 mg/ml Streptomycin 5 mM HEPES
--------------------------------	---

Medium für B-LCL-Suspensionskultur	RPMI 1640 Medium (very low endotoxin) 10 % fetales Kälberserum 2 mM Glutamin 0,06 mg/ml Penicillin 0,1 mg/ml Streptomycin 5 mM HEPES
------------------------------------	---

3.11 PUFFER

3.11.1 PUFFER UND MATERIALIEN FÜR POLYMERASE-KETTENREAKTION

5x PCR Puffer	15 mM Magnesiumchlorid 100 mM Ammoniumsulfat 0,08 % (v/v) Triton-X 100 20 % (v/v) Dimethylsulfoxid (DMSO) 50 mM Tris/HCl pH 8,3 0,4 % (v/v) Tween [®] 20
---------------	--

dNTPs	10 mM dATP, dGTP, dCTP, dTTP (peqlab)
-------	--

Taq-DNA Polymerase	5 Units / µl (peqlab)
--------------------	-----------------------

Material

3.11.2 PUFFER UND MATERIALIEN FÜR GELELEKTROPHORESE

TAE-Puffer	40 mM Tris, 20 mM Essigsäure, 1 mM EDTA 14 µg/l Ethidiumbromid pH 8,0 mit HCl
DNA-Ladepuffer Bromphenolblau (10-fach)	50 % Glycerin, 1 mM EDTA, 1 Spatelspitze Bromphenolblau für 20 Minuten autoklaviert
DNA-Ladepuffer Xylen-Cyanol (10-fach)	50 % Glycerin 1 % Xylen-Cyanol für 20 Minuten autoklaviert
1% TAE Agarosegel Größenstandard	1 g Agarose in 100 ml TAE Puffer gelöst GeneRuler™ 1 kb bzw. 100 bp DNA Ladder

3.11.3 PUFFER FÜR PROTEINAUFREINIGUNG

Lysepuffer	50 mM NaH ₂ PO ₄ 300 mM NaCl 20 mM Imidazol pH 8,0 (NaOH)
Elutionspuffer	50 mM NaH ₂ PO ₄ 300 mM NaCl 250 mM Imidazol pH 8,0 (NaOH)

3.11.4 PUFFER FÜR HLA-DR AUFREINIGUNG

Lysepuffer	10 mM Tris/HCl, 140 mM NaCl, pH 8 (HCl)
Waschpuffer	50 mM NaH ₂ PO ₄ , 150 mM NaCl, 0,1 % (m/V) Zwittergent 3-12, pH 8 (HCl)
Elutionspuffer	100 mM NaH ₂ PO ₄ , 0,1 % (m/V) Zwittergent 3-12, pH 11,2 (NaOH)

3.12 BAKTERIENSTÄMME

In dieser Arbeit wurden folgende Bakterienstämme von *Escherichia coli* verwendet. XL1-blue und TOP10 wurden auf Grund ihrer hohen Transformationseffizienz und Restriktionsnegativität zur Klonierung und Plasmidanreicherung eingesetzt, BL21 eignete sich am besten zu Proteinexpression, da die OmpT- und Lon-Proteasen genetisch inaktiviert wurden.

XL1-Blue	XL1-Blue kompetente Zellen (200249), Stratagene Genotyp: <i>recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac</i> [F' <i>proAB lacI^qZDM15 Tn10</i> (Tet ^r)]
TOP10	One Shot [®] Chemically Competent Cells (C4040-03), Invitrogen Genotyp: F- <i>mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) Φ80lacZΔM15 ΔlacZC74</i> <i>recA1 araD139 Δ(ara-leu)7697 galU galK rpsL (Str^R) endA1 nupG</i>
BL21	F ⁻ <i>ompT [dcm] [lon] hsdS_B (r_B, m_B) λ(DE3)</i>

3.13 VEKTOREN

pCR[®]2.1-Topo[®] Vektor für schnelle und effiziente Ligation von PCR-Produkten mit T/A Überhang von Invitrogen (Vektorkarte siehe Abbildung 3-1)

pET-28a(+)
Expressionsvektor für die Klonierung in Bakterien mit *Multicloningsite* und Lac-Operon von Novagen (Vektorkarte siehe Abbildung 3-2)

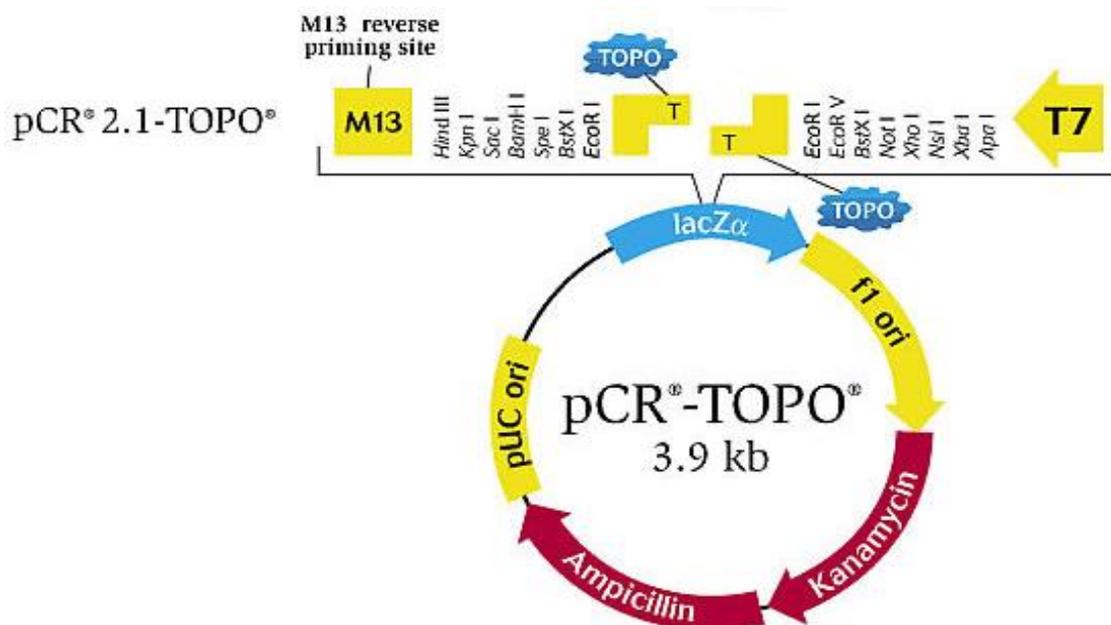


Abbildung 3-1: Vektorkarte von pCR[®] 2.1-Topo

Modifiziert nach: Invitrogen Produktwebseite

Material

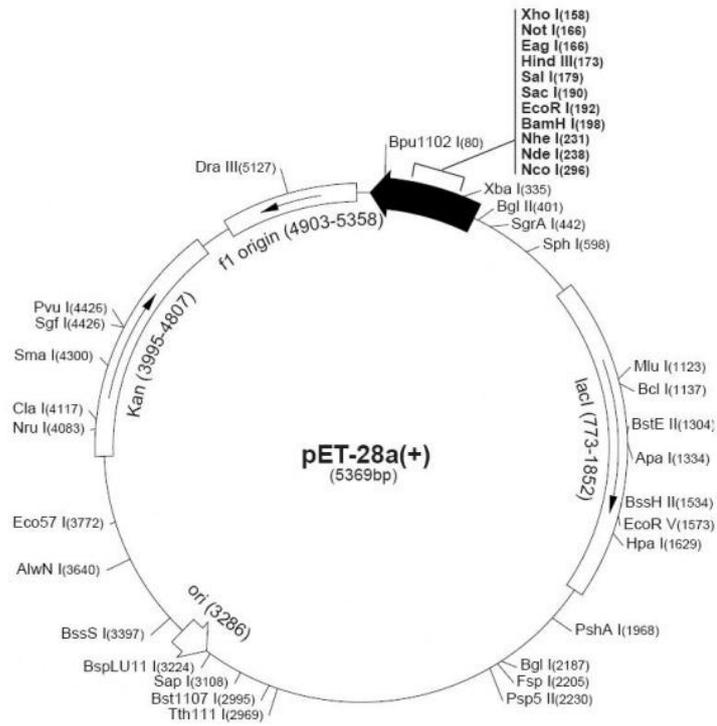


Abbildung 3-2: Vektorkarte von pET-28a(+)

Aus: Novagen Produktwebseite

4 METHODEN

4.1 MOLEKULARBIOLOGISCHE TECHNIKEN

4.1.1 POLYMERASE-KETTENREAKTION (PCR)

Die Standard-PCR wurde in einem Volumen von 25 µl durchgeführt. Bestandteile waren je: 5 µl 5x PCR-Puffer, 0,5 µl 10 mM dNTPs, 1 µl thermostabile Taq-DNA Polymerase und je 0,5 µl 10 µM Forward- bzw. Reverse-Primer. Die Menge an Template-DNA variierte je nach Ausgangsmaterial. Von frisch isolierter Plasmid-DNA wurden 1 µl einer 1:10 Verdünnung, bei genomischer DNA 1 µl unverdünnt verwendet. Für eine Kolonie-PCR wurde eine Einzelkolonie gepickt, in 10 µl doppelt *Aqua dest.* aufgenommen, für 10 Minuten bei 95°C aufgeschlossen und anschließend abzentrifugiert. 5 µl des Überstands wurde anschließend als PCR-Template eingesetzt. Je nach Primerkombination wurden verschiedene Annealingtemperaturen gewählt. Die Elongationszeit wurde entsprechend der Länge des zu amplifizierenden Produktes gewählt. Die DNA-Polymerase amplifiziert etwa 1 kb/min. Die verschiedenen Bedingungen sind in Abbildung 4-1 und Tabelle 2 dargestellt.

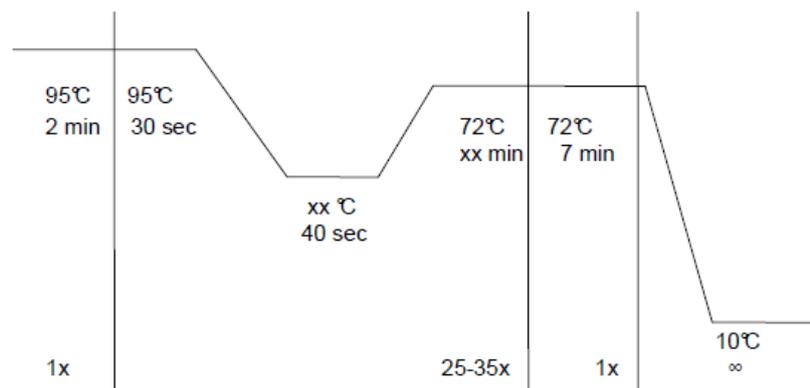


Abbildung 4-1: Schematische Darstellung von Temperatur und Dauer der einzelnen Schritte einer PCR.

Tabelle 2: Übersicht über Elongationszeiten und Annealingtemperaturen der angegebenen Primerkombinationen

Primerkombination	Elongationszeit	Annealingtemperatur
3'HSPÜberlänge/ 5'HSPÜberlänge	3:00 min	62°C
hspASfor_bamhi/ hspASrev_xho	1:50 min	60°C
hspSCfor_bamhi/ hspSCrev_xho	1:00 min	52°C
hspASfor_bamhi/ hspSCrev_xho	2:30 min	58°C
HSP70A1forward/ HSP70a1a S1632reverse	1:50 min	60°C

4.1.2 AUFTRENNUNG UND DETEKTION VON DNA MITTELS GELELEKTROPHORESE

Um DNA-Fragmente ihrer Größe nach aufzutrennen, wurden sie nach Zugabe von 1/10 Volumen eines 10-fach konzentrierten Ladepuffers auf 1 %ige TAE-Agarosegele geladen. Für Fragmente einer Größe von unter 500 bp wurde Xylen-Cyanol Puffer, für größere Fragmente wurde Bromphenolblau verwendet. Die Auftrennung erfolgte, je nach Größe, bei 120 Volt für 30-60 Minuten. Das Gel wurde anschließend für 20 Minuten mit 1 % Ethidiumbromid in TAE gefärbt, unter UV-Licht betrachtet und fotografisch dokumentiert. Aufgetrennte DNA-Fragmente wurden aus dem Gel ausgeschnitten und mit dem QIAquick[®] Gel Extraktions-Kit (Qiagen) nach den Anweisungen des Herstellers extrahiert.

4.1.3 KOLONIERUNG IN PCR 2.1 TOPO VEKTOR (INVITROGEN)

Aufgereinigte DNA-Fragmente aus PCRs wurden zuerst in den pCR2.1-Topo[®]Vektor nach dem Protokoll des Herstellers (Invitrogen) kloniert (siehe http://www.invitrogen.com/content/sfs/manuals/topota_man.pdf) bevor sie restriktionsenzymatisch verdaut und in den Zielvektor kloniert wurden.

4.1.4 KOLONIERUNG IN PET28A(+)

Für eine Ligation von Vektor und Insert müssen diese mit Restriktionsenzymen so geschnitten werden, dass die Überhänge sich aneinander lagern können. Restriktionsspaltungen wurden meistens in einem Volumen von 20 µl durchgeführt. Der Ansatz beinhaltete 1 µg Plasmid-DNA oder 1 µg aufgereinigte PCR-Fragmente, 1/10 des Endvolumens an entsprechendem Restriktionsenzym puffer und 0,5 µl Restriktionsenzym (10 U/µl). Nach einer 2 - 2,5 stündigen Inkubation bei 37°C wurde der komplette Ansatz zur Kontrolle der Spaltung gelelektrophoretisch aufgetrennt. Eine Dephosphorylierung des Vektors mittels alkalischer Phosphatase verhindert eine Selbstligation ohne Insert.

Dafür wurden zu dem Plasmid 1 µl alkalische Phosphatase (*calf intestinal alkaline phosphatase*, CIAP) zugegeben und der Ansatz für 1 Stunde bei 37°C inkubiert. Die Inaktivierung der Phosphatase erfolgte für 10 Minuten bei 75°C. Für eine Ligation wurde ein molares Vektor-Insert Verhältnis von 1:5 gewählt.

Die Ligationsansätze besaßen ein Endvolumen von 15-20 µl und enthielten neben Vektor (1 µl) und Insert (1-6 µl) 1x Ligase-Puffer mit ATP und 1 U T4-DNA-Ligase. Die Ligation wurde entweder im Thermocycler (8 Stunden bei 16°C, 60 Minuten bei 30°C, 10 Minuten bei 65°C) oder für 2 Stunden bei Raumtemperatur durchgeführt. Im Anschluss an die Ligation wurde der komplette Ansatz auf ein 1 %iges Agarosegel aufgetragen, gelelektrophoretisch aufgetrennt und nur die Bande, die den ligierten Vektor enthält, für die Transformation kompetenter Bakterienzellen ausgeschnitten.

4.1.5 ZIELGERICHTETE MUTAGENESE

Die ortspezifische Mutagenese dient der gezielten Mutation, Deletion oder Insertion einzelner Basen eines Genes. Dies erfolgt während einer PCR-Reaktion mit Hilfe spezifischer Primer, die an die Region um die zu mutierenden Basen binden, jedoch an der Stelle der einzuführenden Mutation die geänderte Basenabfolge enthalten. Die Reaktionen wurden mit dem Stratagene QuikChange[®] Site-directed Mutagenesis Kit XL II durchgeführt.

Als DNA-Matrize diente hierbei keine genomische DNA, sondern zirkuläre Plasmid-DNA, welche das zu mutierende Gen enthielt. Laut Protokoll sollten hierfür zwischen 10 und 50 ng eingesetzt werden, die effizientere Mutagenese fand aber mit 50 ng statt. Das gesamte Plasmid wurde mit einer „proof-reading“ DNA Polymerase (*PfuTurbo* DNA Polymerase) amplifiziert.

Um die Matrize später von den neuen, mutierten Plasmiden zu unterscheiden, wurde Plasmid-DNA verwendet, die aus einem *dam*⁺ *E. coli* Stamm isoliert worden war. Diese enthalten methylierte GATC-Abschnitte im Genom, die vom Restriktionsenzym *Dpn* I (10 Units/μl) verdaut werden können. Nach der PCR Reaktion fehlt den neu amplifizierten Plasmide diese Methylierung und sie werden nicht verdaut.

Die für die Mutagenese verwendeten Primer müssen verschiedene Parameter erfüllen:

- Sie sollten zwischen 25 und 45 Basen lang sein, mit einer Schmelztemperatur über 78 °C.
- Die gewünschte Mutation sollte sich in der Mitte der Primer befinden, so dass noch mindestens 10-15 Basen an beiden Seiten des Primers an die Matrize binden können.
- Beide Primer müssen die gewünschte Mutation beinhalten und sich über ihre gesamte Länge überlagern.

Pro Reaktion wurden 125 ng Oligonukleotide eingesetzt. Die Zyklenzahl einer Mutagenese PCR variiert je nachdem, ob nur Punktmutationen vorgenommen

Methoden

werden (12 Zyklen), ob Aminosäuren ausgetauscht werden (16) oder ob Deletionen oder Insertionen vorgenommen werden (18). Mehr Zyklen sind, laut Anleitung der Firma Stratagene, nicht effizienter, da durch die Amplifikation des gesamten Plasmides keine geschlossenen Plasmide entstehen, die also auch nicht als Matrize dienen können.

Die Reaktionsparameter im Einzelnen:

- 5 µl 10X PCR Puffer (aus Kit)
- 10-50 ng zirkuläre DNA
- Je 125 ng 3' und 5' Primer
- 1 µl dNTP Mix (aus Kit)
- 1 µl *PfuTurbo* DNA Polymerase (2,5 U/µl, aus Kit)
- Mit *Aqua dest.* auf 50 µl auffüllen

Die Elongationstemperatur betrug nicht, wie bei einer normalen PCR 72 °C sondern nur 68 °C, die Elongationszeit wurde entsprechend der Größe des Plasmids gewählt. Für ein 5 kb großes Plasmid, wie in den hier durchgeführten Experimenten, benötigt man eine 5-minütige Elongation bei 68 °C.

Das Anlagern der verwendeten Primerkombinationen an die Matrizen-DNA wurde für 50 Sekunden bei 60 °C durchgeführt. Direkt nach der PCR wurden die Reaktionsgefäße auf Eis gekühlt und 1 µl des Restriktionsenzym *DpnI* zugegeben. Der Verdau wurde dann für eine Stunde bei 37 °C durchgeführt. Kompetente *E. coli* XL1-Blue Zellen wurden mit 1 µl Plasmid-DNA mittels Hitzeschock (siehe 4.1.6) transformiert. Zur Überprüfung der Mutationen wurden die Plasmide sequenziert. Die Sequenzierung von Plasmiden oder DNA Fragmenten wurde von der Firma Agowa in Berlin übernommen. Dazu wurden 50 ng DNA eingereicht.

4.1.6 *BAKTERIENTRANSFORMATION MITTELS HITZESCHOCK*

Zu 40 µl chemisch kompetenter Bakterien *E. coli* DH5α (Invitrogen) oder XL-1 blue (Stratagene), die auf Eis aufgetaut wurden, wurde 1 µl des Ligationsansatzes pipettiert, vorsichtig gemischt und 30 Minuten auf Eis ruhen gelassen. Der Ansatz dann für eine Minute bei 42 °C im Wasserbad inkubiert, für weitere zwei Minuten auf Eis gekühlt und 1 ml SOC Medium zugefügt. Bei einer Antibiotikaresistenz gegen Kanamycin wurden die Zellen zunächst für eine Stunde bei 37 °C unter Schütteln inkubiert, bei einer Resistenz gegen Ampicillin konnten die Bakterien sofort auf einem Selektionsmedium ausplattiert und bei 37 °C über Nacht inkubiert werden.

4.2 PROTEINBIOCHEMISCHE TECHNIKEN

4.2.1 *PROTEINEXPRESSION*

Je eine Kolonie eines Bakterienstammes, der mit einem Expressionsplasmid transformiert war, wurde in einem selektiven LB-Medium als Vorkultur über Nacht bei 37 °C inkubiert. Die Hauptkulturen (200 ml Medium entsprechend der Vorkultur, ohne Antibiotika im 1 l-Erlenmeyerkolben) wurden mit 2 ml der Vorkultur angeimpft und bis zu einer $OD_{600} = 0,8$ bei 30 °C im Schüttler bei 190 rpm inkubiert. Die Kultur wurde auf 23 °C heruntergekühlt und die Expression durch die Zugabe von 0,6 mM IPTG (Endkonzentration) induziert. Nach 4 Stunden Induktion wurden die Zellen abzentrifugiert. Zu den sedimentierten Bestandteilen der Expressionskulturen wurde die 5-fache Menge (w/v) BugBuster Mix zugegeben und das Pellet durch Pipettieren resuspendiert. Die Suspension wurde danach für 20 Minuten auf einem Schüttler (150 rpm) bei Raumtemperatur inkubiert, 20 Minuten bei 16000 g und 4 °C zentrifugiert, der Überstand in ein neues Gefäß überführt und sofort bei 4 °C aufgereinigt. Wurde die Aufreinigung nicht sofort durchgeführt, so wurde der Aufschluss bei -80 °C gelagert.

4.2.2 *PROTEINAUFREINIGUNG*

Die Aufreinigung der Proteine erfolgte mit Nickel-Nitrilotriessigsäure (Ni-NTA)-Agarose Säulen. 2,3 ml Ni-NTA-Agarose wurden in eine leere Säule gegeben und der Lagerungspuffer wurde abgelassen. Anschließend wurde drei Mal mit je 8 ml Lysepuffer gewaschen. Auf die Säule wurde der Protein-Extrakt aus dem BugBuster Aufschluss gegeben und 1 Stunde bei 4°C im Überkopfschüttler durchmischt. Nachdem die His-Tags der Proteine an die Säulenmatrix binden konnten, wurde der Lysepuffer ablaufen gelassen. Die Säule wurde anschließend dreimal mit je 8 ml Wasch-Puffer gewaschen. Das gebundene Protein wurde in drei bis sechs Elutionsschritten mit je 750 µl Elutionspuffer von der Säule eluiert. Die Säule wurde dreimal mit je 8 ml Lysepuffer gewaschen und für eine dauerhafte Lagerung zuletzt mit 4 ml 30 % Ethanol gespült und in 4 ml 30 %

Ethanol bei 4°C bis zur nächsten Anwendung aufbewahrt. Alternativ erfolgte die Aufreinigung über eine HPLC mit denselben Puffern. Die Quantifizierung des Proteingehaltes in den einzelnen Fraktionen erfolgte nach Bradford (siehe 4.2.4).

4.2.3 ISOLIERUNG VON HLA-DR MOLEKÜLEN AUS B-LCL ZELLINIEN

Die Isolierung von HLA-DR Molekülen erfolgte mit Hilfe von Immunaффinitätschromatographie. Bei -80 °C tiefgefrorene Zellpellets von $1-6 \times 10^9$ Zellen der entsprechenden B-LCL-Zelllinien wurden in der vierfachen Menge Lysepuffer versetzt. In jeweils 10 ml Lysat wurde eine Tablette Proteinaseinhibitor (Complete mini, Roche) gelöst. Anschließend wurden 2 % (w/w) des Detergens Triton-X 100 zugegeben. Die Zellen wurden für 2 Stunden bei 4 °C unter langsamem Rühren lysiert und mit 1 M Tris/HCl pH 8,5 auf pH 7,8 eingestellt. Nach der Lyse wurden grobe Zellfragmente bei 1605 g, 4 °C für 30 Minuten abzentrifugiert, der Überstand wurde vorsichtig abgenommen und über ein 40 µm Filter Zellsieb von flotierenden Bestandteilen befreit.

Alle nachfolgenden Schritte wurden bei 4 °C in einem Kühlraum durchgeführt. Die verwendeten Säulen wurden zunächst mit Lysepuffer gewaschen. Das Zellysate wurde in eine Probenschleife eingefüllt und über Nacht über einen Zyklus bestehend aus einer Sepharose gefüllten Vorsäule zum Abfangen unspezifisch bindender Bestandteile und einer L243-Sepharose-Säule (Bindung von HLA-DR) gepumpt. Am nächsten Tag wurden die Säulen vom Zyklus entkoppelt und mit dem 2-fachen Säulenvolumen Lysepuffer gespült. Weniger stark an die Säule bindende Bestandteile wurden mit ca. 5 Säulenvolumina Waschpuffer ausgewaschen.

Zur Elution der fest an die Antikörper der Säule gebundenen HLA-DR-Komplexe wurden 2 Säulenvolumina des alkalischen Elutionspuffers (pH 11,2) verwendet. Das Eluat wurde direkt in vorgelegtes 1 M Tris/HCl pH 8,0 eingebracht. Die Säule wurde unmittelbar anschließend mit PBS neutralisiert. Die Eluate wurden vereinigt, auf pH 7,5 - 8,0 eingestellt und durch Ultrafiltration (20 kDa-Membran, Amicon-Rührzelle) auf PBS umgepuffert und aufkonzentriert.

Auf eine Zugabe von NaN_3 wurde verzichtet, da dieses die Bindung im DELFIA (siehe Punkt 4.2.12) beeinflusst. Die Reinheit der Isolation wurde anschließend mittels SDS-PAGE und Bradford Assay (siehe 4.2.4 und 4.2.8) überprüft.

4.2.4 BESTIMMUNG DER PROTEINKONZENTRATION

Die Proteinmenge wurde mit einem abgewandelten Bradford Assay [Bradford, 1976], bei dem die Bindung des Triphenylmethanfarbstoff Coomassie-Brillant-Blau G-250 an Proteine gemessen wird, bestimmt. Für die Messung wurden Proben 1:20 mit *Aqua dest.* verdünnt. 50 μl der Proben wurden in die Vertiefungen einer Mikrotiterplatte zu 200 μl einer 1:5 mit *Aqua dest.* verdünnten Roti[®]-Nanoquant-Stammlösung gegeben. Aus dem Quotienten der Absorption bei 630 nm und 540 nm im Photometer und den bekannten Werten einer mitgeführten BSA-Kalibrierungsgerade lässt sich die Proteinkonzentration errechnen.

4.2.5 AUFREINIGUNG GEGEN ENDOTOXIN

Die Proteine, die später in T-Zell-Proliferationsassays eingesetzt werden sollen, mussten gegen Endotoxin aufgereinigt werden. Eine absolute Endotoxin-Freiheit kann nicht erreicht werden, wohl aber eine Minimalisierung der Endotoxin Menge. Hierzu wurden die Proteine über eine 1 ml EndoTrap[®] red Säule aufgereinigt. Die Säule wurde dreimal mit Regenerationspuffer gewaschen, danach dreimal mit Equilibrierungspuffer. Anschließend wurde die Proteinlösung zugegeben. Diese wurde nach dem Durchfließen der Säule direkt wieder auf die Säule gegeben, bis nach 5 Zyklen die Säule dreimal mit Regenerationspuffer gewaschen wurde.

Nach 5 weiteren Zyklen sollte eine Menge an Endotoxin erreicht werden, die unterhalb 0,1 EU/ml liegt und im LAL-Test (Limulus Amöbozytenlysat) nicht mehr nachzuweisen ist. Im Fall eines höheren Endotoxinlevels wurden nochmals 5 Zyklen durchgeführt, bis die Nachweisgrenze erreicht war.

Die Säule wurde abschließend noch einmal mit Regenerationspuffer gewaschen und in diesem bei 4 °C gelagert. Alle Gebrauchsgegenstände zur Aufreinigung wurden zuvor über Nacht in 1 N NaOH gewaschen. Alle in die Zellkultur eingesetzten, aus Bakterien aufgereinigten Proteine wurden so behandelt.

4.2.6 NACHWEIS AUF ENDOTOXINE (LIMULUS AMÖBOZYTENLYSAT TEST, LAL-TEST)

50 µl der gegen Endotoxin gereinigten Proteinproben wurden in einem Heizblock auf 37 °C erwärmt. Zum Beginn der Reaktion wurden 50 µl LAL zugegeben. Nach 10 Minuten wurden 100 µl auf 37 °C vorgewärmtes Substrat zugegeben. Nach weiteren 6 Minuten wurde eine Stopplösung (entweder 25 %iger Eisessig (v/v) oder 100 g/l (w/v) SDS in Wasser) zugegeben. Die resultierende Farbreaktion wurde bei 405 nm im Photometer ausgelesen. Anhand von bekannten Werten einer mitgeführten LPS-Kalibrierungsgerade lässt sich die Endotoxin-konzentration errechnen. Alle in die Zellkultur eingesetzten Proteine wurden mit diesem Assay auf ihren Endotoxingehalt getestet.

4.2.7 BIOTIN-MARKIERUNG

HLA-DR Moleküle sowie rekombinant hergestellte Hsp70 Proteine und deren Mutanten mussten für bestimmte DELFIA Assays mit Biotin markiert werden. Dies erfolgte mit Biotin-N-Hydroxysuccinimidester (Biotin-NHS). 2 mg/ml Biotin-NHS in Dimethylformamid (DMF) wurden im molaren Verhältnis 4 : 1 (Biotin : Protein) langsam unter Rühren in eine Proteinlösung eingetroppt und anschließend für mindestens 2 Stunden unter Rühren bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde für 1 Stunde eine 1 M Glycin Lösung zugegeben, um freie Biotin-Ester zu binden. Die Biotin-markierten und -unmarkierten Proteine wurden mittels Gelfiltration über Sephadex G-25 Säulen voneinander abgetrennt.

Die Protein enthaltenden Fraktionen wurden mittels UV-Spektrometer (Adsorption bei 280 nm) bestimmt. Auf eine Zugabe von NaN_3 wurde aufgrund des Einsatzes im DELFIA Assay verzichtet.

4.2.8 SDS-PAGE

Die einzelnen Fraktionen einer Proteinaufreinigung lassen sich mittels SDS-PAGE (Natriumdodecylsulfat-Polyacrylaminelektrophorese) nach ihrer Molekulargröße auftrennen und dementsprechend auf ihre Reinheit sowie auf die Größe und ungefähre Menge Protein überprüfen [Laemmli, 1970]. Die verschiedenen Fraktionen einer Proteinaufreinigung wurden jeweils mit 4 x SDS Probenpuffer (NuPAGE LDS Sample Puffer mit 200 mM DTT) im Verhältnis 3:1 gemischt und in einem Wasserbad bei 95°C für 10 Minuten denaturiert.

Nach der Denaturierung wurden die Proben kurz abzentrifugiert und sofort auf Eis gestellt. Es wurden jeweils 30 µl der Probe pro Tasche auf ein Tris-HEPES-SDS 4 % - 20 % Gradienten-Fertiggel (Pierce) geladen. Zur Größenbestimmung von unbekanntem Proteinen wurde der Größenmarker *peqGOLD prestained protein Marker IV* (peqlab) verwendet. Als Laufpuffer wurde ein Tris-HEPES-SDS Puffer (0,1 M Tris, 0,1 M HEPES, 3 mM SDS, pH 8) verwendet. Die Proteine wurden bei einer konstanten Spannung von 150 Volt für 35 Minuten aufgetrennt.

Die Sichtbarmachung der Proteine erfolgte mit einer abgewandelten Coomassie-Färbung. Das Gel wurde hierzu 3 mal 15 Minuten mit *Aqua dest.* gewaschen, anschließend für 30 Minuten in Imperial Protein Stain (Thermo) gefärbt und für 30 Minuten oder über Nacht in *Aqua dest.* entfärbt bis kein Hintergrund mehr zu sehen war. Das Gel wurde anschließend zur Dokumentation eingescannt und getrocknet.

4.2.9 WESTERN BLOT

Um Proteine spezifisch mit Antikörpern nachzuweisen, wurden gelelektrophoretisch aufgetrennte Proteine mittels des semi-dry Blot Verfahrens (XCell II™ Blot Module) auf eine Nitrocellulose Membran (0,45 µm Porengröße) transferiert [Renart *et al.*, 1979]. Als Laufpuffer wurde 25 mM Tris, 192 mM Glycin, 20 % Methanol, pH 8 verwendet. Die Übertragung der Proteine auf die Nitrocellulosemembran erfolgte bei 30 Volt für 90 Minuten.

Nach dem elektrophoretischen Transfer der Proteine auf eine Nitrocellulosemembran wurde diese für mindestens 2 Stunden bei Raumtemperatur unter Schütteln in Blockierungslösung (Roti-Block®) zur Blockierung der freien Bindungsstellen inkubiert. Die Detektion von Hsp70 und seinen Mutanten erfolgte mittels des primären Antikörpers anti-Hsp70 SPA-810, verdünnt 1 : 2000 in Roti-Block® bei 4 °C über Nacht.

Es folgten 3 Waschschriffe mit PBS mit 0,1 % Tween für jeweils 15 Minuten bevor die Membranen mit dem sekundären Antikörper anti-mouse-HRP (1 : 10000 verdünnt in Roti-Block®) inkubiert wurden. Zur Detektion des gebundenen zweiten Antikörpers wurde nach erneutem dreimaligem Waschen mit PBS/Tween und einem Waschschriff mit PBS 10 ml frisch angesetzte ECL Lösung (SuperSignal® West Pico Chemoluminescent Substrate) zugegeben.

Das an den sekundären Antikörper gekoppelte Enzym HRP (*horseradish peroxidase*) katalysiert die Umsetzung von Luminol in seine oxidierte Form, bei der eine Lumineszenz entsteht. Nachdem die Nitrocellulosemembran luftblasenfrei in eine Folie eingeschweißt und in eine Röntgenkassette gelegt wurde, wurde die Lumineszenzreaktion mit Hilfe eines Röntgenfilmes (CL-XPosure Film) sichtbar gemacht.

4.2.10 PEPTIDE

Die in dieser Arbeit verwendeten Peptide wurden freundlicherweise von Dr. Hubert Kalbacher (Medizinisch-Naturwissenschaftliches Forschungszentrum (MNF), Universität Tübingen) zur Verfügung gestellt. Tetanustoxin TT₉₄₇₋₉₆₆ (FNNFTVSFWLRVPKVSASHL), Influenza Hämagglutinin HA₃₀₇₋₃₁₉ (PKYVKQNTLKLAT) und *invariant chain peptide* CLIP₁₀₅₋₁₁₇ (SKMRMATPLLMQA) wurden mittels Fmoc/TBTU Chemie durch einen multiplen Peptidesynthesizer (MultiSynTech, Witten, Germany) hergestellt. Nach dem letzten Kopplungsschritt wurde die Peptid-gebundene Fmoc-Gruppe durch 20 %ige Piperidin Lösung in Dimethylformamid (v/v) abgelöst. N-terminal-spezifische Markierung mit Biotin wurde mit Hilfe einer weiteren Koppelung von Fmoc-Isoleucin als Spacer-Molekül durchgeführt.

Biotin wurde im vierfachen Überschuss über Nacht zugegeben und durch eine *in situ* Aktivierung durch die TBTU//NMM/HOBt Methode gebunden. Für eine N-terminal-spezifische Markierung mit FITC (Fluorescein-Isothiocyanat) musste zunächst ein Fmoc-β-Alanin Spacer eingefügt werden.

FITC-Moleküle wurden in Dimethylformamid (DMF) gelöst und zusammen mit N-Methylmorpholin für 18 Stunden zugegeben. Nach dem Abspalten der Schutzgruppe durch Trifluoressigsäure (TFA) und Fällung in kaltem Diethylether wurden die Rohpeptide über eine Reverse Phasen HPLC aufgereinigt. Die Sequenz der aufgereinigten Peptide wurde mittels Massenspektrometrie überprüft. Die Reinheit, ebenfalls mittels HPLC überprüft, lag immer über 95 %. Biotin-markierte Peptide wurden im DELFIA eingesetzt, FITC-markierte Peptide in T-Zell-Aufnahmeassays.

4.2.11 KOMPLEXIERUNG VON PROTEINEN UND PEPTIDEN

Für Aufnahmeversuche (siehe 4.3.7) wurden jeweils 10 µg/ml Hsp70 mit 0,1 - 10 µg/ml FITC-markierten Peptiden über Nacht bei 37 °C vorinkubiert. Für DELFIA (siehe 4.2.12) wurden 5 µg/ml der exprimierten Hsp70 Proteine bzw. der

Mutanten von Hsp70 eingesetzt und mit jeweils 5 µg/ml Biotin-markierten Peptiden inkubiert. Ebenso wurden als Kontrollen Hsp70 Proteine und die jeweils verwendeten Peptide alleine über Nacht inkubiert, sowie Proteine und Peptide ohne Vorinkubation in die jeweiligen Assays eingesetzt.

4.2.12 EUROPIUM-FLUORESZENZ-ASSAYS (DELFI A)

Um die Bindung zwischen Proteinen und Peptiden oder Proteinen untereinander zu quantifizieren wurde ein Europium-Fluoreszenz-Assay (DELFI A, *dissociation-enhanced lanthanide fluorescent immunoassay*) durchgeführt. Der DELFI A funktioniert ähnlich einem ELISA (*Enzyme-linked immunosorbent assay*), erlaubt aber lineare Messungen über einen größeren Bereich, ist sensitiver und führt zu niedrigeren Hintergrundwerten [Smith *et al.*, 2001].

Dabei wird ausgenutzt, dass Lanthaniden-Elemente wie Europium bei erniedrigtem pH-Wert (DELFI A Enhancement Solution) langlebige Chelatkomplexe bilden. Diese haben ein sehr eng begrenztes Emissionsspektrum mit einem starken Wellenlängen-Unterschied zwischen absorbierter und emittierter Strahlung (Stokes-Shift). Es wird die „*time-resolved fluorescence*“ gemessen, bei der eine kurze Verzögerung zwischen Anregungspuls und Messung der emittierten Strahlung stattfindet.

Im sauren pH der DELFI A Enhancement Solution wird an Streptavidin gebundenes Europium freigesetzt (Eu^{3+}) und zu einem fluoreszierenden Chelatkomplex gebunden. Die resultierende Fluoreszenz der Chelatkomplexe kann dann bei 615 nm gemessen werden. Alle Antikörper-Beschichtungs- und Bindevorgänge wurden mit einem Volumen von 50 µl durchgeführt, alle Wasch- und Blockierungsschritte mit 200 µl. Verdünnungen erfolgten ausschließlich in PBS.

Es wurden zwei unterschiedliche Assays durchgeführt. Bei der Untersuchung der Bindung von Hsp70 an Peptide wurde zunächst eine 96-well Platte (FluoroNunc™ Plate MaxiSorp™ Surface) mit 10 µg/ml anti-Hsp70-Antikörper bei 4 °C über Nacht beschichtet. Bei der Bindung von HLA-DR Molekülen an Hsp70

Methoden

wurde die Platte zunächst entweder mit anti-HLA-DR-Antikörper (L-243, 5 µg/ml) beschichtet und, nach einem Waschschrift mit PBS, HLA-DR zugegeben, oder es erfolgte ein direktes Binden der HLA-DRB1*0401 Moleküle in den Vertiefungen der Mikrotiterplatte (10 µg/ml). Das weitere Vorgehen gestaltete sich identisch.

Die Platte wurde am nächsten Tag mit PBS gewaschen. Es folgte ein Blockierungsschritt für eine Stunde mit 5 % BSA. Nach einer Stunde Inkubation bei leichtem Schütteln bei Raumtemperatur wurde die Platte dreimal mit DELFIA Washing Buffer und einmal mit PBS gewaschen, danach die über Nacht inkubierten Vorinkubationslösungen von Hsp70 und Biotin-markierten Peptiden zugegeben (siehe 4.2.11). Bei HLA-DR Assays wurden Biotin-markierte Hsp70 Moleküle (5 µg/ml) zugegeben, als Kontrolle diente bei HLA-DRB1*0401 Biotin-markiertes HA₃₀₇₋₃₁₉.

Nach einer Stunde Schütteln bei Raumtemperatur wurde die Platte fünfmal mit DELFIA Washing Buffer und einmal mit PBS gewaschen. Europium-markiertes Streptavidin wurde 1 : 500 in DELFIA Assay Buffer (0,2 µg/ml) verdünnt und jeweils 50 µl pro Vertiefung zugegeben, nach einer weiteren Stunde erfolgte ein letzter Waschschrift mit DELFIA Washing Buffer und die Zugabe von DELFIA Enhancement Solution (100 µl/Vertiefung). Nach 10 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur im Dunkeln wurde die Platte im Wallac 1420 Victor Multilabel Counter bei 615 nm ausgelesen. Alle Messungen erfolgten in Dreifachbestimmung. Die statistische und graphische Auswertung der resultierenden Daten erfolgte mit Hilfe des Programms GraphPad Prism 4.01.

4.3 ZELLKULTUR UND ZELLBIOLOGISCHE METHODEN

4.3.1 GEWINNEN VON HUMANEM SERUM FÜR DIE ZELLKULTUR

Gesunden Spendern wurde 60-120 ml peripheres, venöses Blut ohne Gerinnungshemmer entnommen und bei 37 °C für 1 Stunde zur Gerinnung inkubiert wurden. Danach wurden das geronnene Sediment bei 3000 g für 10 Minuten abzentrifugiert, das Serum im Überstand abgenommen und gepoolt. Nach Hitzeinaktivierung (30 Minuten bei 56 °C) wurde das Serum aliquotiert und bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C eingefroren.

4.3.2 ZELLKULTUR IMMORTALISierter B-ZELLINIEN ZUR HLA-DR-ISOLIERUNG

Für die Aufreinigung von HLA-DR-Molekülen wurden immortalisierte B-Zelllinien, die homozygot für ein spezifisches HLA-DR-Molekül waren unter 5 % CO₂-Begasung bei 37 °C inkubiert. B-LCL-Zelllinien wurden als Suspensionskultur in 162 cm² Zellkulturflaschen mit RPMI 1640 Medium kultiviert, das mit 10 % FBS, 2 mM Glutamin, 0,06 mg/ml Penicillin, 0,1 mg/ml Streptomycin und 5 mM HEPES ergänzt war. Alle 3-4 Tage wurde frisches Medium zugegeben oder nach Bedarf die Kultur passagiert, das heißt auf mehrere neue Zellkulturflaschen verteilt. Bei ausreichendem Wachstum wurden die Zellen abzentrifugiert und die Zellpellets bei -80 °C bis zur Aufreinigung der HLA-DR-Moleküle (siehe 4.2.3) gelagert.

4.3.3 AUFREINIGUNG VON PBMCs (FICOLL)

Mononukleäre Zellen aus peripherem Blut (*peripheral blood mononuclear cells*, kurz: PBMCs) wurden mittels Ficoll-Hypaque Dichtegradientenzentrifugation isoliert. Heparinisiertes Blut wurde zu gleichen Teilen mit PBS verdünnt. In 50 ml Falcon-Röhrchen wurden jeweils 30 ml verdünntes Blut auf 15 ml Ficoll-Hypaque-Lösung geschichtet und bei 1050 g für 20 Minuten ohne Bremse zentrifugiert. Die PBMCs in der Interphase wurden abgenommen, in ein Röhrchen mit PBS

überführt und bei 1050 g für 10 Minuten zentrifugiert. Es folgten zwei weitere Waschschrte in PBS mit 2 % FBS. Abschließend wurden die Zellen gezählt und in PBS mit 2 % FBS bis zur weiteren Verwendung aufbewahrt. Alle Waschschrte der Zellen erfolgten bei Raumtemperatur, 350 g für 10 Minuten.

4.3.4 ISOLIERUNG UND KULTUR VON MONOZYTEN

CD14⁺ Monozyten wurden mit Hilfe von CD14 MicroBeads (Miltenyi) nach Angaben des Herstellers mittels AutoMACS aus PBMCs isoliert. Anschließend wurde die Zellzahl bestimmt und die Zellen in komplettem RPMI Medium aufgenommen. Die Reinheit wurde ebenfalls mittels durchflusszytometrischer Analyse bestimmt.

4.3.5 ANTIKÖRPERFÄRBUNG

Zu färbende Zellen wurden in FACS-Röhrchen überführt und mit 2 ml PBS mit 2 % FBS gewaschen. Nach dem Abzentrifugieren wurde der Überstand abgenommen. Die Zellen wurden in 50 µl FACS Puffer resuspendiert, mit 1-3 µl der fluoreszenzmarkierten Antikörper versetzt und für 15 Minuten im Dunkeln auf Eis inkubiert. Die Zellen wurden erneut mit 2 ml PBS mit 2 % FBS gewaschen und abzentrifugiert. Anschließend wurden die Zellen im Durchflusszytometer analysiert. Eine Zugabe von 1 µl Propidiumiodid zum Ausschluss toter Zellen erfolgte unmittelbar vor der Analyse.

4.3.6 DURCHFLUSSZYTOMETRIE

Die mittels Fluoreszenz-gekoppelter Antikörper gefärbten Zellen wurden mit einem Durchflusszytometer analysiert. Die Durchflusszytometrie erlaubt Aussagen über Größe, Granularität und spezifische Fluoreszenzen der analysierten Zellen.

Die Messung beruht darauf, dass die Fluoreszenz-markierten Zellen in einem laminaren Probenstrom einzeln mit einem Laserstrahl (Argon- und Helium-Neon-Laser) erfasst werden. Die Farbstoffe werden zur Emission eines Fluoreszenzlichts bestimmter Wellenlänge angeregt, das durch ein komplexes System von Spiegeln und Filtern gebündelt und zerlegt wird. Mit Hilfe spezifischer Detektoren können dann die Streulicht- und Fluoreszenzsignale einzelner Zellen gemessen werden. Mit dem in dieser Arbeit verwendeten Gerät (FACS Calibur, BD) konnten gleichzeitig vier Fluoreszenzfarbstoffe mit unterschiedlichen Emissionsspektren gemessen werden.

Unabhängig von den verwendeten Fluoreszenzfarbstoffen lassen sich auch Aussagen über die Größe der analysierten Zellen und deren Granularität treffen. Die Streulichtparameter enthalten das Vorwärtsstreulicht (Streuung in Verlängerung der Laserstrahlrichtung, FSC) und das Seitwärtsstreulicht (Streuung an Zellstrukturen um 90° zum Laserstrahl, SSC). Das Vorwärtsstreulicht definiert Zellpopulationen aufgrund ihrer Größe. Das Seitwärtsstreulicht stellt ein relatives Maß für die intrazelluläre Granulation der Zellen dar. Als Fluoreszenz-Farbstoffe wurden in dieser Arbeit Fluoreszeinisothiocyanat (FITC), Phycoerythrin (PE), Peridinin-Chlorophyll-Protein Komplex (PerCP), Propidiumiodid (PI) und Allophycocyanin (APC) verwendet. Überlappungen der einzelnen Emissionsspektren wurden vor der Messung kompensiert. Die Quantifizierung der Fluoreszenz- und Streulichtemissionen von 10.000 bis 50.000 Zellen je Probe wurden gespeichert. Die Daten wurden anschließend mit Hilfe des Programms CellQuest Pro ausgewertet.

4.3.7 AUFNAHMEASSAYS

PBMCs oder Monozyten wurden in RPMI 1640 Medium mit 5 % PHS, 1 % L-Glutamin, 1 % HEPES-Puffer und 1 % Penicillin/Streptomycin, aufgenommen und in Rundboden-FACS Röhrchen verteilt. Bei Versuchen mit PBMCs wurden die 500.000 Zellen pro 1 ml Medium auf die Röhrchen verteilt, bei Versuchen mit

isolierten Monozyten lag die Zellzahl bei 200.000 Zellen pro Ansatz. Die Vorinkubationslösungen (siehe 4.2.11) wurden gemäß ihrer Inkubationsdauer (0 - 3 h) zu den Zellen gegeben. Die Inkubation erfolgte im Brutschrank bei 37 °C. Zum Abstoppen der Peptid-/Peptid:Proteinaufnahme wurden alle Ansätze mit 2 ml eiskaltem PBS mit 2 % FBS gewaschen und bis zu ihrer Analyse im Durchflusszytometer im Dunkeln auf Eis gelagert. Die Datenanalyse und -auswertung wurde mit Hilfe der CellQuest Software durchgeführt.

4.3.8 QUENCHEN

Um nur intrazelluläres Leuchten einer FITC-Fluoreszenz im Durchflusszytometer aufzuzeichnen, müssen extrazelluläre Farbstoffe überdeckt werden. Dies geschieht mit Hilfe von Trypanblau. Trypanblau (TB) selbst hat keine Fluoreszenz. Meist wird es für Vitalitätsfärbungen von Zellen im Durchlichtmikroskop verwendet, da es durch die Zellmembran toter Zellen eindringen und diese somit blau anfärben kann. Lebende Zellen werden nicht angefärbt und können so unterschieden werden [Mulisch & Welsch, 2009].

Das Adsorptionsspektrum von Trypanblau allerdings überlappt das Emissionsspektrum von FITC [Hed *et al.*, 1987, Sahlin *et al.*, 1983]. Dieser Effekt wird ausgenutzt um die Phagozytose von FITC-gefärbten Molekülen von extrazellulär gebundenen zu unterscheiden. Die Adsorption intrazellulärer FITC-Moleküle ist von dieser Überlagerung unbeeinträchtigt. Man bezeichnet dieses Phänomen als Quenchen. Es gibt einige wenige Studien, die die optimale Konzentrationen der TB-Lösungen und die Abhängigkeit des pH-Wertes auf den Quenchvorgang für solche Effekte untersucht haben [Bjerknes & Bassoe, 1984, Hed *et al.*, 1987, Sahlin *et al.*, 1983].

Um zwischen aufgenommenen und extrazellulär gebundenen Protein:Peptid Komplexen bzw. alleinigen Peptiden unterscheiden zu können, wurde Trypanblau zu den Ansätzen gegeben. Die Zugabe erfolgte zusammen mit dem Abstoppen

der Aufnahmereaktion. Es wurden verschiedene TB-Konzentrationen zwischen 0,03 - 0,16 µg/µl getestet.

4.3.9 ANALYSE DER KOMPLEXAUFNAHME MITTELS KONFOKALER LASER SCANNING MIKROSKOPIE

Isolierte Monozyten wurden in RPMI 1640 Medium mit 5 % PHS, 1 % L-Glutamin, 1 % HEPES-Puffer und 1 % Penicillin/Streptomycin aufgenommen und in einen Kammer-Objektträger gegeben. Eine Vorinkubations-Lösung (entweder FITC-markiertes TT₉₄₇₋₉₆₆-Peptid oder Hsp70:FITC-TT₉₄₇₋₉₆₆, siehe 4.2.11) wurden zu den Zellen gegeben.

Erfolgte nur eine Momentaufnahme, wurde eine Färbung mit DAPI durchgeführt um den Zellkern darzustellen, sowie eine Oberflächenfärbung, indem 1-10 µl des entsprechenden Antikörpers zugegeben wurde. Die Inkubation erfolgte für 10 - 20 Minuten im Dunkeln auf Eis. Die DAPI Färbung erfolgte mit einer 1:5000 verdünnten Lösung, die ebenfalls für 10 - 20 Minuten auf die Zellen gegeben wurde. Die Färbereaktion wurde durch die Zugabe von 1 ml eiskaltem PBS mit 2 % FBS gestoppt. Erfolgte die Aufnahme einer Zeitreihe wurde auf die Zugabe anderer Antikörper und DAPI verzichtet, da nur eine Farbe über die Zeit gemessen werden kann.

Die Bilder wurden mit einem konfokalen Laser Scanning Mikroskop (KLSM) unter Verwendung geeigneter Filter aufgenommen. Es wurden Einzelbilder oder Serien von Bildern alle 30 Sekunden über 30 Minuten bis zu mehreren Stunden aufgenommen.

4.3.10 STATISTISCHE ANALYSEN

Alle Daten wurden mit der Software GraphPad Prism 4.01 auf statistische Signifikanz getestet. Signifikanzen wurden berechnet mit einem *paired, two-tailed student's t-test*. P-Werte > 0,05 wurde als nicht signifikant angesehen (n.s.), p < 0,05 als signifikant (*), p < 0,01 als sehr signifikant (**).

5 ERGEBNISSE

5.1 AUFNAHME VON HUMANEN HSP70:PEPTID-KOMPLEXEN IN ANTIGENPRÄSENTIERENDE ZELLEN

Hitzeschockproteine (HSPs) wurden neben ihrer Aufgabe als Ordnungsproteine auch als wichtiger Bestandteil der Immunabwehr identifiziert, aber ihre exakte Funktion ist hierbei noch weitgehend unbekannt. Mit dem bakteriellen Hitzeschockprotein DnaK wurden bereits viele Studien durchgeführt, die aber aufgrund mangelnder Homologie im eukaryotischen System zu keinem aussagekräftigen Ergebnis geführt haben.

Dennoch konnte gezeigt werden, dass ein DnaK-gebundenes, antigenes Peptid in antigenpräsentierende Zellen aufgenommen wird. Im Vergleich zum bakteriellen Protein wird aber bei der Bindung eines Peptides an ein humanes Hsp70 dieses nach der Aufnahme über einen Rezeptor, vermutlich CD91 [Fischer *et al.*, 2010], in ein MHC-II Beladungskompartiment überführt und anschließend auf den MHC-II Molekülen auf der Zelloberfläche präsentiert. Die daraufhin angeregte T-Zell-Proliferation ist bereits bei kleinen Peptidmengen schon um ein Vielfaches höher als bei der Aufnahme des Peptids alleine [Haug *et al.*, 2005]. Die Vorgänge der Aufnahme und Präsentation, insbesondere die intrazelluläre Bindung an MHC-II Moleküle, sollten in dieser Arbeit genauer charakterisiert werden.

Zunächst wurde untersucht, ob durch die Chaperonierung von Peptiden diese schneller in antigenpräsentierende Zellen aufgenommen werden. Bei der Chaperonierung handelt es sich um die umschließende Bindung eines Peptids oder Proteins durch Hitzeschockproteine zum Schutz vor Stress, Hitze oder Trockenheit, die zur Degradation des Proteins führen könnte.

5.1.1 PEPTIDAUFNAHME IM ZEITRAUM VON 0-11 STUNDEN

Eine Aufnahme von Peptiden oder Peptid-HSP-Komplexen in Zellen wurde mittels durchflusszytometrischer Analysen untersucht. Monozyten wurden mittels magnetischer Markierungen aus PBMCs isoliert und mit 1 µg/ml FITC-markiertem TT₉₄₇₋₉₆₆-Peptid oder einem Komplex aus Hsp70 (1 µg/ml) und FITC-markiertem TT₉₄₇₋₉₆₆ (1 µg/ml) inkubiert. Über einen Zeitraum von 11 Stunden erfolgten durchflusszytometrische Analysen. Um nur die intrazelluläre Fluoreszenz zu ermitteln wurde vor der Messung zu jedem Ansatz 0,03 mg/ml Trypanblau zugegeben, um die extrazelluläre Fluoreszenz zu überdecken.

Die so ermittelten Werte der intrazellulären Fluoreszenz wurden dann mit Hilfe von CellQuest Pro ausgewertet. Dargestellt in Abbildung 5-1 sind die intrazellulären Fluoreszenzwerte (geometrisches Mittel der Fluoreszenz, *mean intensity fluorescence*, *geo mean*) von HSP komplexiert mit TT₉₄₇₋₉₆₆ (▲) und TT₉₄₇₋₉₆₆ alleine (■) zweier unabhängig voneinander durchgeführter Experimente. Eine Hilfslinie (einseitige Hyperbel) verdeutlicht die Sättigung der Aufnahme. Nach etwa 3 Stunden ist wahrscheinlich der Großteil der Peptide und Komplexe in die Zellen aufgenommen. Danach ist eine Aussage über die Intrazellularität der Fluoreszenz nicht mehr hinreichend zu untersuchen, da nach 3 Stunden bereits eine Präsentation der Peptide an der Oberfläche der Zellen stattfindet. Dies zeichnet sich auch in den großen Schwankungen der Messwerte ab, die vor allem in der zweiten Hälfte des Versuches auszumachen sind. Folgende Versuche beschränken sich daher auf die ersten 3 Stunden. Grundsätzlich ist aber zu sehen, dass die Aufnahme von Komplexen langsamer stattfindet, als die von Peptiden alleine und auch nicht das Maximum der Peptidaufnahme erreicht.

Ergebnisse

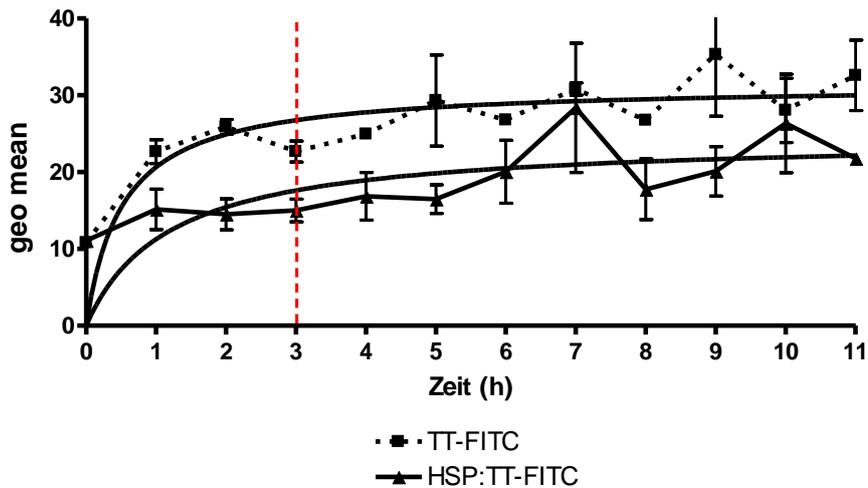


Abbildung 5-1 Aufnahmeversuch über einen Untersuchungszeitraum von 0-11 Stunden

Durchführung von Aufnahmeversuchen mit isolierten Monozyten. Die Monozyten wurden mit 1 µg/ml TT₉₄₇₋₉₆₆-Peptid (TT-FITC ■) alleine oder 1 µg/ml TT₉₄₇₋₉₆₆-Peptid komplexiert mit 1 µg/ml Hsp70 (HSP:TT-FITC ▲) inkubiert. Die Inkubationszeiten betragen 0-11 Stunden. Zur Ermittlung der intrazellulären Fluoreszenz wurden eine Konzentration von 0,03 mg/ml TB hergestellt. Dargestellt wurden die Mittelwerte und die SEM (Standartfehler des Mittelwerts) der geometrischen Mittelwerte (geo mean) der Fluoreszenz von HSP:TT-FITC (durchgehende Linie) und TT-FITC (gestrichelte Linie) gegen die Zeit. Die Daten stammten aus zwei unabhängig durchgeführten Versuchen. Es wurden für beide Kurven Hyperbeln eingezeichnet.

5.1.2 VERGLEICH VERSCHIEDENER PEPTIDKONZENTRATIONEN BEI DER KOMPLEXAUFNAHME

Haug und Fischer [Fischer *et al.*, 2010, Haug *et al.*, 2005] haben bereits gezeigt, dass bei antigenspezifischen CD4⁺ T-Zellen eine verstärkte Proliferation vor allem bei geringen Peptidkonzentrationen (0,01 bis 0,1 µg/ml) nachgewiesen werden kann. Andere Arbeitsgruppen bestätigen diese Ergebnisse [McLaughlin *et al.*, 2010]. Daher wurde nun die Aufnahme von verschiedenen TT₉₄₇₋₉₆₆ Konzentrationen (0,1 µg/ml, 1 µg/ml und 10,0 µg/ml) komplexiert mit 1 µg/ml Hsp70 oder alleine hinsichtlich der Geschwindigkeit und Menge ihrer Aufnahme über 3 Stunden untersucht.

Ergebnisse

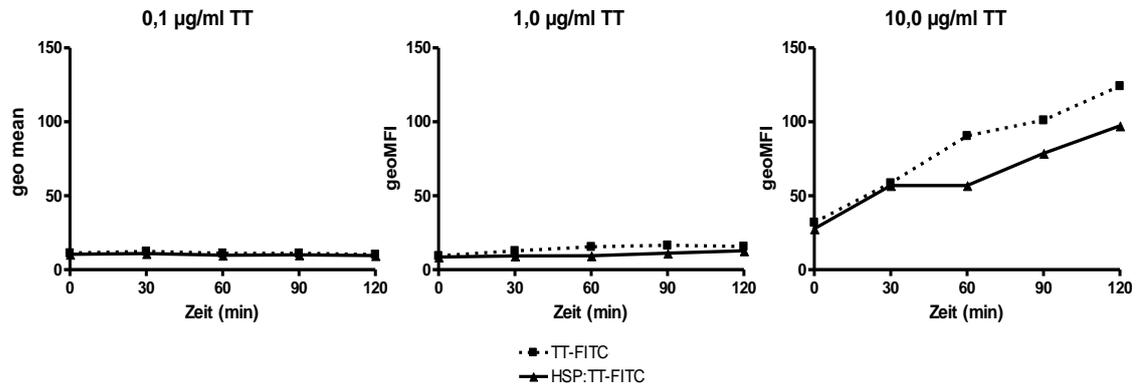


Abbildung 5-2: Aufnahme verschiedener TT₉₄₇₋₉₆₆ Peptid-Konzentrationen durch Monozyten

Durchführung von Aufnahmeversuchen mit PBMCs und anschließender Auswertung der relevanten Monozyten. Die PBMCs wurden mit drei verschiedenen TT₉₄₇₋₉₆₆-Peptidkonzentrationen, 0,1 µg/ml, 1,0 µg/ml, 10,0 µg/ml, (TT-FITC) oder komplexiert mit 1,0 µg/ml Hsp70-Protein (HSP:TT-FITC) inkubiert. Durchflusszytometrisch ausgewertet wurden allerdings nur CD14⁺ Monozyten. Es wurden Inkubationszeiten von 0-120 Minuten analysiert. Zur Ermittlung der intrazellulären Fluoreszenz wurden bei den gequenchten Ansätzen eine Konzentration von 0,05 mg/ml TB hergestellt. Die mittleren Fluoreszenzwerte der gequenchten Ansätze wurden gegen die Zeit aufgetragen (HSP:TT-FITC = durchgehende Linie; TT-FITC = gestrichelte Linie).

PBMCs wurden jeweils 0,1 µg/ml, 1 µg/ml oder 10 µg/ml FITC-markiertem TT₉₄₇₋₉₆₆ Peptid oder einem Komplex aus FITC-markiertem TT₉₄₇₋₉₆₆ in den o. g. Konzentrationen und Hsp70 (1 µg/ml) inkubiert. Die extrazelluläre Fluoreszenz wurde mit Trypanblau gequenchet. Die durchflusszytometrische Auswertung erfolgte nur auf Antikörper-markierte CD14⁺ Monozyten.

Um ein höheres Volumen der Vorinkubationslösungen (25 µl) und somit auch eine stärkere Fluoreszenz auszugleichen, wurden 0,05 mg/ml Trypanblau verwendet. Abbildung 5-2 zeigt die geometrischen Mittel der intrazellulären Fluoreszenz von Hsp70 komplexiert mit TT₉₄₇₋₉₆₆ (▲) und TT₉₄₇₋₉₆₆ alleine (■). Bei 0,1 µg/ml ist keine spezifische Fluoreszenz zu erkennen und somit auch keine Aussage über die Geschwindigkeit einer Aufnahme zu treffen. Eine leichter Anstieg der Fluoreszenz und somit intrazelluläre Peptide und Komplexe sind erst bei einem Einsatz von 1,0 µg/ml TT₉₄₇₋₉₆₆ zu erkennen.

Ergebnisse

Bei 10 µg/ml ist eine deutliche Zunahme der intrazellulären Fluoreszenz über die Zeit zu erkennen. Hier konnte eine kontinuierliche Aufnahme durch ansteigende Werte (dargestellt sind geometrische Mittelwerte der Fluoreszenz, vgl. Abbildung 5-2) festgestellt werden. Allerdings ist bei keiner Konzentration eine höhere oder schnellere Aufnahme der Komplexe im Vergleich zu den Peptiden alleine festzustellen.

Durch die unterschiedlichen Konzentrationen der Peptide lässt sich somit keine unterschiedlich schnelle Aufnahme nachweisen. Um eine Aufnahme anschaulich zu gestalten, wurde für die folgenden Aufnahmeversuche immer die höchste Peptidkonzentration (10 µg/ml) eingesetzt.

5.1.3 ZEITREIHENUNTERSUCHUNG DER AUFNAHME VON HSP70:TT₉₄₇₋₉₆₆ KOMPLEXEN IN ANTIGENPRÄSENTIERENDE ZELLEN MITTELS DURCHFLUSSZYTOMETRISCHER ANALYSE

PBMCs wurden bei 37 °C mit 10 µg/ml FITC-markiertem TT₉₄₇₋₉₆₆ Peptid alleine oder chaperoniert mit 1 µg/ml Hsp70-Protein inkubiert. Die Aufnahme der fluoreszierenden Moleküle wurde anhand durchflusszytometrischer Analyse über einen Zeitraum von 3 Stunden untersucht. Zur Ermittlung der intrazellulären Fluoreszenz wurde zu den Ansätzen zusätzlich 0,16 mg/ml Trypanblau gegeben [Hed *et al.*, 1987].

Bei verschiedenen Vorversuchen hatten sich diese Bedingungen etabliert. In die Auswertung mit einbezogen wurden lediglich Zellen, die in der durchflusszytometrischen Analyse als Monozyten identifiziert werden konnten. Aufgetragen in Abbildung 5-3 sind die geometrischen Mittelwerte von 6 unabhängig durchgeführten Experimenten für die intrazelluläre Aufnahme (nur gequenchte Werte) von TT₉₄₇₋₉₆₆-FITC und TT₉₄₇₋₉₆₆-FITC:Hsp70. Zu Beginn der Messungen (0 Stunden Zeitpunkt) ist erwartungsgemäß kein Unterschied zwischen chaperonierten Peptiden oder Peptiden alleine sichtbar ($p = 0,6056$, n.s.). Nach einer Stunde ist ebenfalls noch kein signifikanter Unterschied zu erkennen ($p = 0,1495$, ns), wenngleich aber eine Tendenz zur größeren Aufnahme

Ergebnisse

des Peptides sichtbar ist, die sich nach 2 und 3 Stunden bestätigt (Signifikanz ** $p=0,0024$ bzw. * $p=0,0235$).

Die Aufnahme von chaperonierten Peptiden erfolgt also bei den eingesetzten Peptidkonzentrationen nicht, wie angenommen, schneller als die Aufnahme von Peptiden alleine. Eine erhöhte Präsentation von antigenen Peptiden bzw. die damit einhergehende verstärkte Proliferation von aktivierten T-Zellen muss also durch intrazelluläre Vorgänge beeinflusst werden.

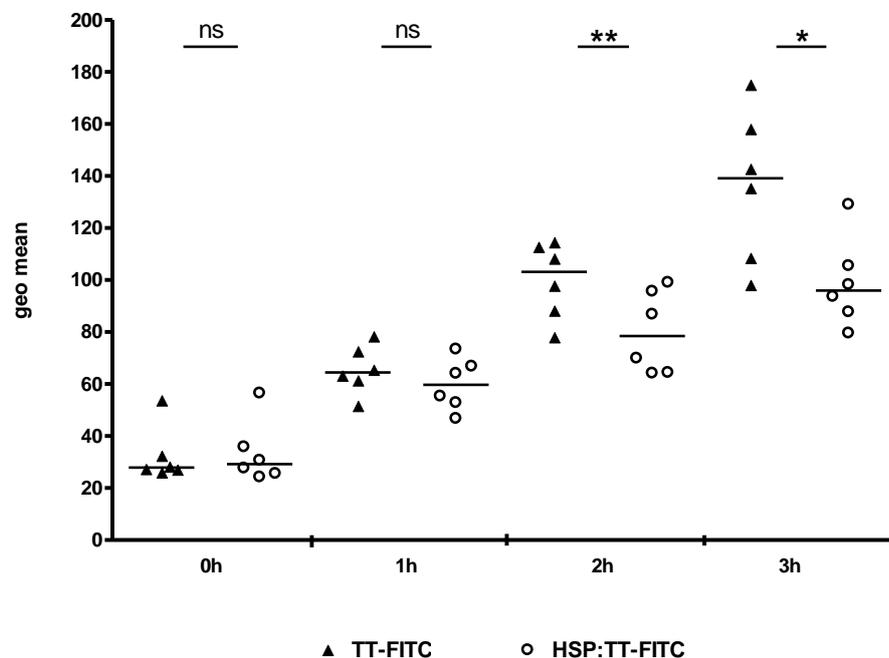


Abbildung 5-3: Aufnahme von chaperonierten Peptiden vs. Peptide nach Optimierung der Versuchsbedingungen

PBMCs wurden mit $10 \mu\text{g/ml}$ TT₉₄₇₋₉₆₆ (TT-FITC \blacktriangle) oder Peptid chaperoniert mit Hsp70 (HSP:TT-FITC \circ) für 0-3 Stunden inkubiert. Es wurde durch Quenchen mit $0,16 \text{ mg/ml}$ Trypanblau nur die intrazelluläre Fluoreszenz ermittelt. Dargestellt sind die geometrischen Mittel von 6 unabhängigen Experimenten, Signifikanzen wurden berechnet mit einem paired, two-tailed student's t-test. p-Werte $> 0,05$ wurde als nicht signifikant angesehen (ns), $p < 0,05$ als signifikant (*), $p < 0,01$ als sehr signifikant (**).

5.2 MIKROSKOPISCHE UNTERSUCHUNG DER AUFNAHME VON TT₉₄₇₋₉₆₆-FITC IN ANTIGENPRÄSENTIERENDE ZELLEN

Die Aufnahme von FITC-markierten Peptiden konnte im Durchflusszytometer nur punktuell zu einzelnen Zeitpunkten gemessen werden. Zur Verifikation der Aufnahme wurden daher Zeitreihenaufnahmen mit einem Fluoreszenzmikroskop durchgeführt. Die folgende Abbildung stellt ausgewählte Aufnahmen von zwei Zeitreihen über jeweils 60 Minuten dar, die eine Zunahme der grünen FITC-Fluoreszenz in Zellen zeigt. Isolierten Monozyten wurden in Kammer-Objektträger mit 10 µg/ml FITC-markiertem TT₉₄₇₋₉₆₆ inkubiert. Die Aufnahmen erfolgten im EVOS Fluoreszenzmikroskop im Abstand von 30 Sekunden. Das EVOS Fluoreszenzmikroskop sendet zu jedem angegebenen Zeitpunkt nur einen kurzen Lichtimpuls und verschließt anschließend die Blende zum Objektträger wieder, so dass ein Ausbleichen der Fluoreszenzmarkierung unterbunden wird.

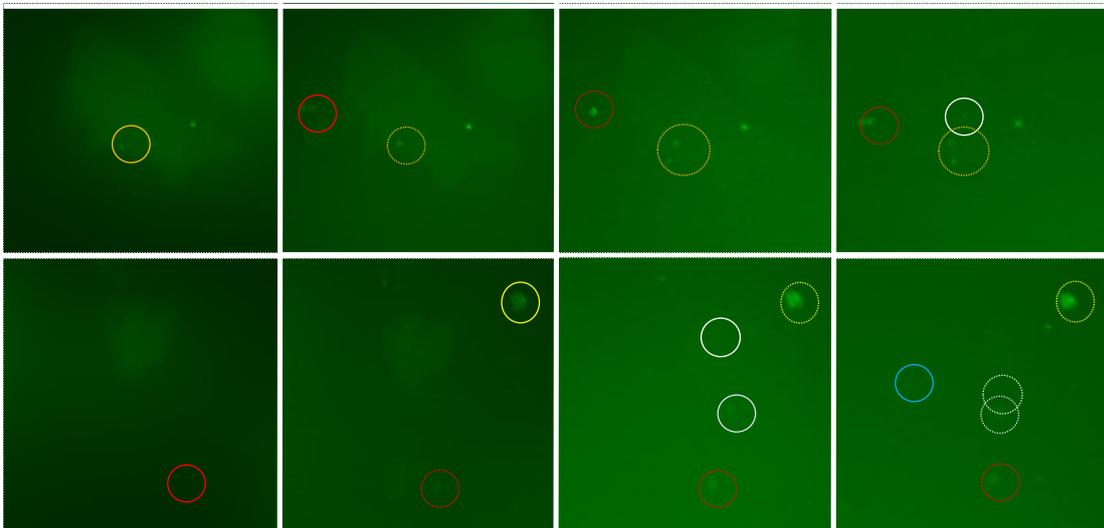


Abbildung 5-4: Aufnahme von FITC markiertem TT₉₄₇₋₉₆₆ in Monozyten

Exemplarische Auswahl fluoreszenzmikroskopischer Aufnahmen von Monozyten, inkubiert mit TT₉₄₇₋₉₆₆-FITC, die alle 30 Sekunden über 1 Stunde aufgezeichnet wurden. Runde Markierungen zeigen Zellen, bei denen eine beginnende Aufnahme festgestellt wurde, gepunktete Markierungen zeigen die Zellen im Verlauf. Zu beobachten ist ein stetiges Ansteigen der Fluoreszenz bis zur Sättigung, aber kein Verblassen innerhalb einer Stunde. Beginnende Aufnahmen konnten zu jeden beliebigen Zeitpunkt festgestellt werden, daher sind keine exakten Zeitpunkte der Aufnahmen angegeben.

Ergebnisse

Aus den entstandenen Aufnahmen wurden exemplarisch diejenigen ausgewählt, die eine Aufnahme am besten belegen. Runde Markierungen verdeutlichen Zellen, bei denen die beginnende Aufnahme festgestellt wurde, gepunktete Markierungen zeigen die Zelle im folgenden zeitlichen Ablauf. Im Verlauf der Zeit kann man erkennen, dass eine kontinuierliche Aufnahme erfolgt, bis sich ein Sättigungsgrad einstellt. Es ist zu jedem Zeitpunkt über 60 Minuten eine weitere Aufnahme von FITC-markiertem TT₉₄₇₋₉₆₆ in die Zellen festzustellen, so dass keine Aussage darüber getroffen werden kann, zu welchem Zeitpunkt insgesamt eine Sättigung der Aufnahme erreicht ist. Außerdem ist keine Aussage über eine intrazelluläre Aufnahme oder extrazelluläre Bindung des Peptides zu treffen.

5.2.1 VISUALISIERUNG DER PEPTIDAUFNAHME MITTELS KONFOKALER LASER MIKROSKOPIE

Um einen näheren Einblick in die Verarbeitung der aufgenommenen Peptide und Komplexe zu erhalten wurden Bilderserien mit dem konfokalen Fluoreszenzmikroskop durchgeführt. Zunächst wurden nur Aufnahmen von Durchlicht und FITC-Fluoreszenz überlagert, um den Zeitpunkt der optimalen Sichtbarkeit aufgenommener Peptide zu finden.

Wie bereits in vorhergehenden Experimenten war nach 3 Stunden Aufnahme ein Maximum an intrazellulärem Peptid vorhanden. Beispielhaft hierfür zeigt Abbildung 5-5 eine Aufnahme nach 3 Stunden Aufnahme von FITC-markiertem TT₉₄₇₋₉₆₆ Peptid alleine. Der Großteil des FITC-markiertes TT₉₄₇₋₉₆₆ ist innerhalb der Zellen zu erkennen.

Ergebnisse

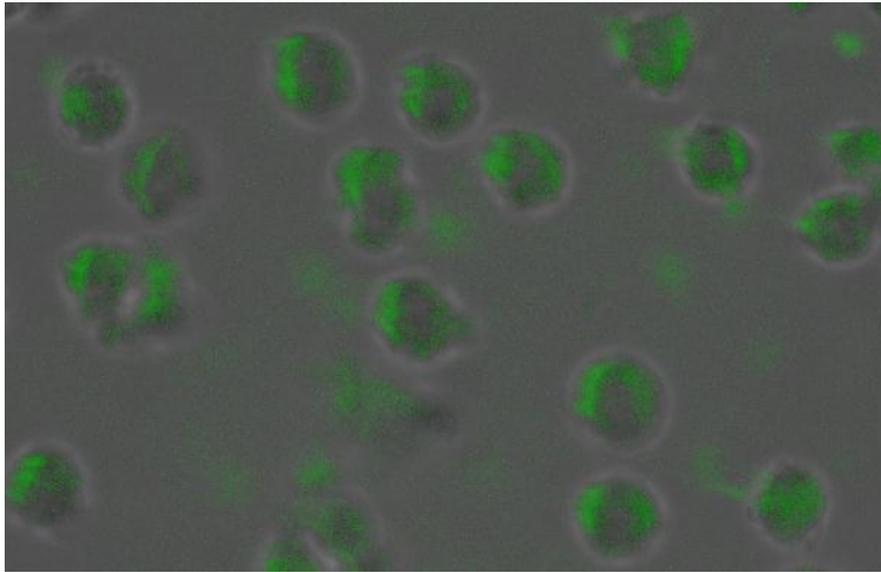


Abbildung 5-5: Durchlichtaufnahme mit FITC-markiertem TT₉₄₇₋₉₆₆

Monozyten wurden isoliert und für 3 Stunden mit 10 µg/ml FITC-markiertem TT₉₄₇₋₉₆₆ inkubiert und anschließend konfokalmikroskopisch betrachtet.

Mittels konfokalen Laser Scanning Mikroskopie sollte ebenfalls ein näherer Einblick erhalten werden, in welchen Kompartimenten sich Peptide und Komplexe nach ihrer Aufnahme befinden. Zur Etablierung dieser Analysen wurden PBMCs mit 10 µg/ml FITC-markiertem TT₉₄₇₋₉₆₆ für 3 Stunden inkubiert. Zusätzlich erfolgte eine Färbung der Zellen mit APC-konjugiertem anti-CD14-Antikörper. DAPI-Lösung ermöglichte das gezielte Anfärben von Zellkernen. In Abbildung 5-6 A ist exemplarisch die türkisfarbene DAPI-gefärbte DNA der Zellkerne zu sehen. Bei den folgenden Abbildungen dieser Reihe handelte es sich um dieselben Zellen in der gleichen Ebene. Abbildung 5-6 B zeigt die anti-CD14-Antikörper Färbung der Zellen in Rot.

Da in dem Aufnahmeversuch PBMCs eingesetzt wurden, markierte die anti-CD14-Antikörper Färbung die Monozyten, die später ausgewertet werden sollten. In Abbildung 5-6 C kann man TT₉₄₇₋₉₆₆ über die FITC-Markierung (grün) erkennen. In Abbildung 5-6 D wurden die drei Farbkanäle (A, B und C) überlagert.

Ergebnisse

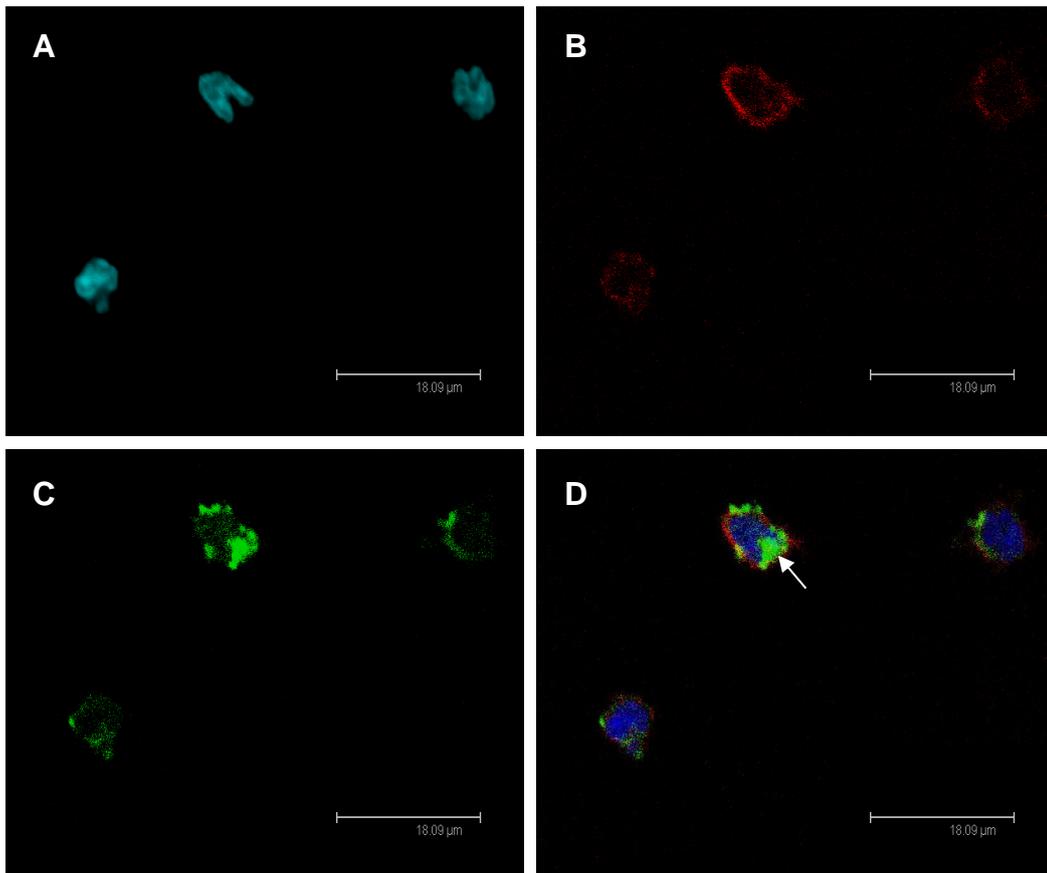


Abbildung 5-6: Visualisierung der Peptidaufnahme mittels konfokaler Laser Scanning Mikroskopie

PBMCs wurden 3h mit 10 µg/ml FITC-markiertem TT₉₄₇₋₉₆₆ inkubiert, zusätzlich DAPI-gefärbt zur Visualisierung der Zellkerne (A, türkis) und CD14 markiert (APC-gekoppelter CD14-Antikörper, B, rot) FITC: grün (C). D: Überlagerung aller 3 Farbkanäle. Die Zellen wurden mit Hilfe konfokaler Mikroskopie visualisiert.

Anhand dieser Überlagerung wurde eine Lokalisation der TT₉₄₇₋₉₆₆-Peptide ermöglicht. Deutlich wird, dass TT₉₄₇₋₉₆₆-FITC sowohl an der Oberfläche der Zelle gebunden hatte, als auch intrazellulär nachweisbar war (Pfeil). Allerdings war eine exakte intrazelluläre Lokalisation noch nicht möglich.

5.2.2 INTRAZELLULÄRE LOKALISATION VON $TT_{947-966}$ -PEPTIDEN

Bei der Aufnahme von Hsp70:Peptid-Komplexen, die mittels Durchflusszytometrie analysiert wurden, war eine Bestimmung der intrazellulären Komplexe mit Hilfe der Überlagerung der extrazellulären Fluoreszenz durch Trypanblau möglich. Mit dem ersten Aufnahmeversuch, der mikroskopisch untersucht wurde, konnte man die Lokalisation von $TT_{947-966}$ -FITC ebenfalls bezüglich intra- und extrazellulär unterscheiden. In den nächsten Aufnahmeversuchen sollte die Lokalisation der Peptide genauer bestimmt werden. PBMCs wurden mit 10 μ g/ml FITC-markiertem $TT_{947-966}$ inkubiert, zusätzlich zur Färbung mit APC-konjugiertem anti-CD14 Antikörper und DAPI erfolgte eine Färbung mit PE-konjugiertem anti-CD63 Antikörper. Dieser wird als Marker für später Endosomen beschrieben [Fiola *et al.*, 2010]. Er wurde für dieses Experiment ausgewählt, da in der aufgestellten Hypothese zur Aufnahme der Komplexe und deren Weiterverarbeitung davon ausgegangen wird, dass die Komplexe in MHC-II Beladungskompartimente transportiert werden wobei der Weg dorthin über Endosomen erfolgt.

Bei den folgenden Abbildung 5-7 wird exemplarisch eine Zelle gezeigt. In Abbildung 5-7 A ist die DAPI-Färbung eines Zellkerns (Türkis) abgebildet. In Abbildung 5-7 B ist die dazugehörige CD14-Färbung der Zelle (APC, Dunkelblau), die sie als Monozyt identifiziert. Die Abbildung 5-8 C zeigt die Zelle bezüglich ihrer CD63-Färbung in Rot (PE) und in Abbildung 5-7 D $TT_{947-966}$ -Peptide (FITC, Grün). In dieser Bilderfolge wurde die APC-Färbung in Dunkelblau dargestellt, um sie von der ebenfalls Rot fluoreszierenden PE-Färbung unterscheiden zu können. In Abbildung 5-7 E wurden in einer Überlagerung die Farbkanäle der Einzelbilder A, C und D vereint. Durch die Überlagerung von roter (CD63) und grüner ($TT_{947-966}$ FITC) Fluoreszenz erscheint die Ko-Lokalisation in Gelb.

Ergebnisse

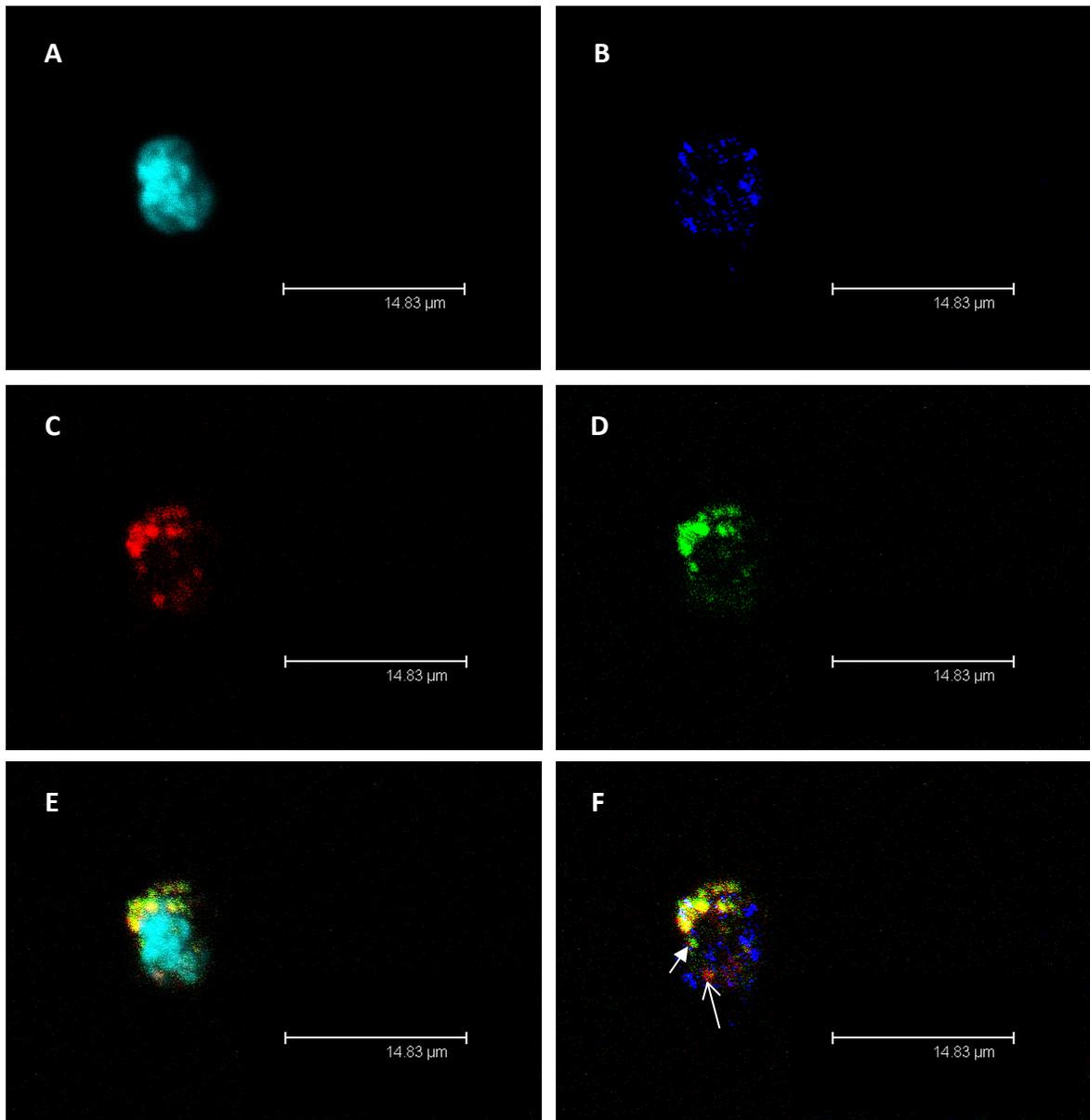


Abbildung 5-7 Ko-Lokalisation FITC-markierter Peptide mit dem späten Endosomenmarker CD63

PBMCs wurden mit 10 µg/ml TT₉₄₇₋₉₆₆-FITC für 3 Stunden inkubiert und anschließend mit anti-CD14-APC und anti-CD63-PE Antikörper sowie DAPI angefärbt. Die Zellen wurden mit Hilfe konfokaler Mikroskopie visualisiert. (A) DAPI-Färbung: Türkis. (B) CD14-Färbung: Blau. (C) CD63-Färbung: rot. (D) TT₉₄₇₋₉₆₆-FITC: Grün. (E) Überlagerung von A, C und D; DAPI: Türkis, TT₉₄₇₋₉₆₆-FITC: Grün, CD63: Rot, Ko-Lokalisation von TT₉₄₇₋₉₆₆-FITC und CD63-PE: Gelb. (F) Überlagerung von B, C und D. CD14: Blau; Ko-Lokalisation von TT₉₄₇₋₉₆₆-FITC und CD63-PE: Gelb; ausgefüllter Pfeil: TT₉₄₇₋₉₆₆-FITC (Grün); unausgefüllter Pfeil: spätes Endosom (Rot).

Ergebnisse

In Abbildung 5-7 F wurden die Einzelbilder B, C und D überlagert. In diesem Bild ist die Ko-Lokalisation von TT₉₄₇₋₉₆₆-FITC und CD63 ebenfalls in Gelb dargestellt. Späte Endosomen, die kein Peptid enthielten (dünner Pfeil), erscheinen Rot, während TT₉₄₇₋₉₆₆, das sich nicht in späten Endosomen befand (ausgefüllter Pfeil) Grün erscheinen. Man kann anhand der Bilder dieses Versuches eine Ko-Lokalisation von TT₉₄₇₋₉₆₆-Peptid und späten Endosomen erkennen.

5.3 KOLONIERUNG VON HSP70

Die bisher durchgeführten Experimente lassen nicht den Schluss zu, dass eine erhöhte Aufnahme von HSP:TT₉₄₇₋₉₆₆ Komplexen im Vergleich zu TT₉₄₇₋₉₆₆ bei den verwendeten Konzentrationen stattfindet. Daher stellte sich die Frage, ob statt einer erhöhte Aufnahme die Bindung des Hitzeschockproteins an intrazelluläres HLA-DR für eine bessere Übertragung des Antigens auf HLA-DR-Moleküle sorgt und somit Grundlage für eine effizientere Antigenpräsentation ist. Dass Hsp70 an Peptide der hypervariablen Region von HLA-DR bindet, wurde bereits gezeigt [Auger & Roudier, 1997, Maier *et al.*, 2002]. Dass Hsp70 auch an ganze HLA-DR Moleküle bindet, wie in Abbildung 5-8 beispielsweise für HLA-DRB1*0401 gezeigt, ist hier mittels DELFIA dargestellt. HLA-DRB1*0401 wurde über Nacht in die Vertiefungen einer Mikrotiterplatte gegeben, Biotin-markiertes (°) Hsp70 wurde für eine Stunde zugegeben.

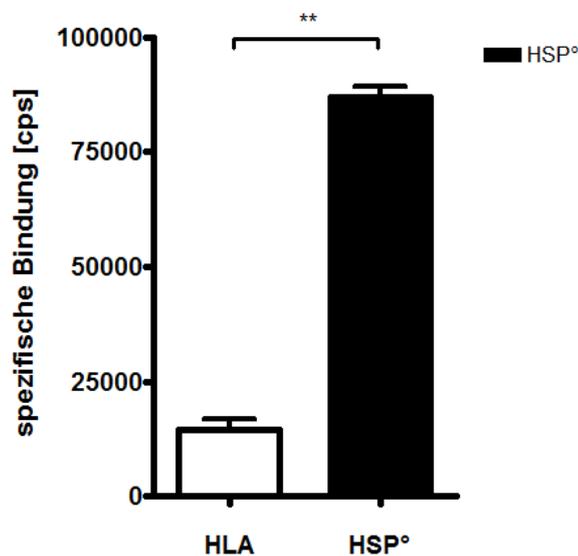


Abbildung 5-8: Bindung von Biotin-markiertem Hsp70 (°) an HLA-DRB1*0401

HLA-DRB1*0401 (10 µg/ml) wurde über Nacht in die Vertiefungen einer Mikrotiterplatte gegeben. Am nächsten Tag wurden 5 µg/ml Biotin-markiertes Hsp70 zugegeben. Das Auslesen in *counts per second* [cps] erfolgte anhand von Europium-gelabeltem Streptavidin, das an Biotin bindet.

Weiß: HLA-Hintergrund, Schwarz: an HLA-DR gebundenes, Biotin-markiertes (°) Hsp70.
HLA-DRB1*0401

Ergebnisse

Hsp70 zeigt eine Bindung an HLA-DR, die sich signifikant vom Hintergrund abhebt. Im Vergleich dazu konnte bereits gezeigt werden, dass Biotin-markierte Hsc70, Grp78 (BiP) und DnaK signifikant reduziert an HLA-DR binden [Haug *et al.*, 2007].

Um die Bindestelle von Hsp70 an HLA-DR näher zu identifizieren, wurden zunächst Mutationsanalysen durchgeführt. Hierzu wurde die dreiteilige Struktur von Hsp70 als Grundlage genutzt und zum einen die N-terminale Domäne (ATP-Bindestelle) und zum anderen der C-terminale Deckel über der mittelständigen Substratbindestelle entfernt. Hierzu wurde eine PCR auf HSPA1A (HSPA1A heat shock 70kDa protein 1A [*Homo sapiens*] Gennummer 3303 / M11717) durchgeführt (schematische Darstellung siehe Abbildung 5-9).

Für eine Amplifikation mittels PCR musste aufgrund einer erschwerten Bindung der eigentlichen Primer zunächst ein Überlängeprodukt aus humaner DNA amplifiziert werden, das ca. 70 Basenpaare länger ist als das Hsp70 Gen (Primerkombination: 3' HSP Überlänge / 5' HSP Überlänge). Auf diesem PCR Produkt wurde dann eine nested PCR durchgeführt, bei der die Primerkombinationen für das Hsp70 Gesamtlängeprotein (hspASfor_bamhi (1) / hspSCrev_xho (4)), für die C-terminale Verkürzungsmutante AS (bestehend aus ATP-Domäne und Substratbindedomäne, hspASrev_xho (3) / hspASfor_bamhi (1)) für die N-terminale Verkürzungsmutante SC (bestehend aus Substratbindedomäne und C-Terminus, hspSCrev_xho (4) / hspSCfor_bamhi (2)) zum Einsatz kamen.

Ergebnisse

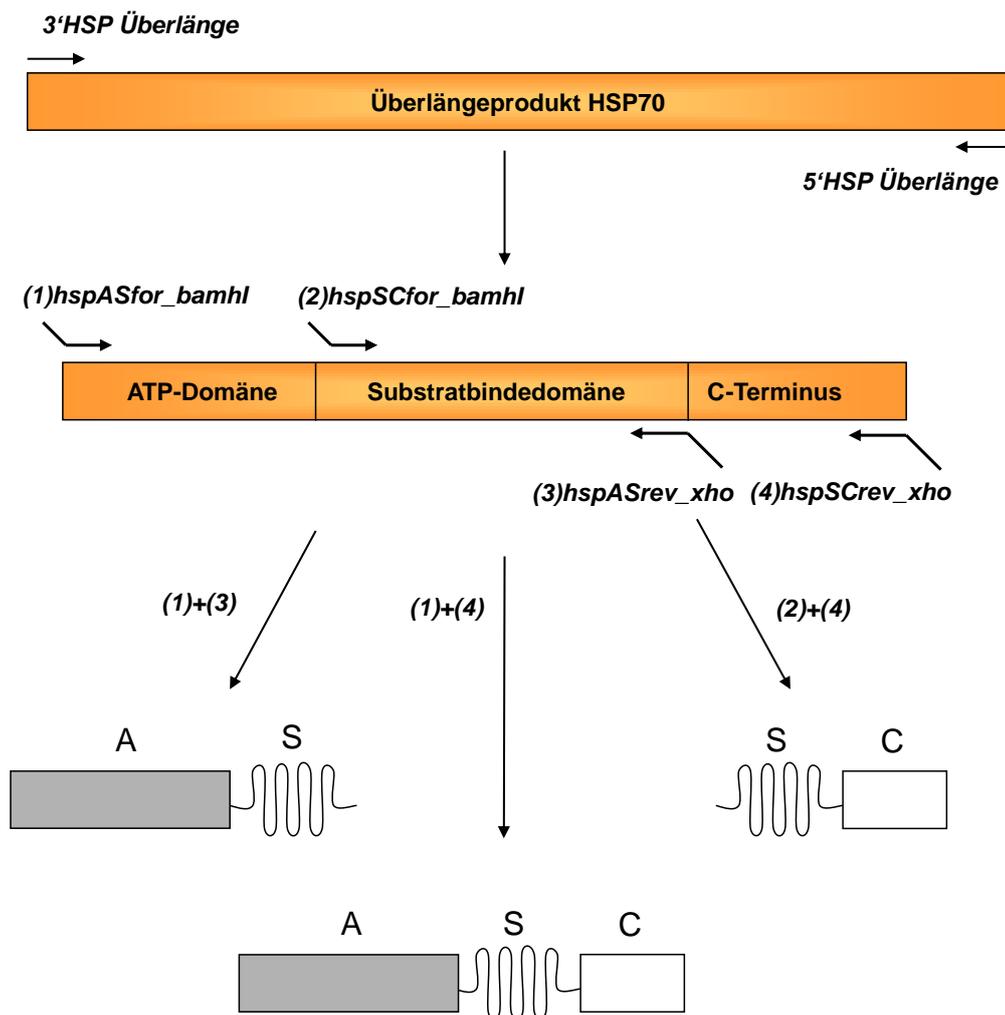


Abbildung 5-9: Schematische Darstellung der Domänen von Hsp70 und Primerlage zur Amplifikation verschiedener Genabschnitte

Dargestellt sind schematische Genprodukte und die zugehörigen Primer der durchgeführten PCR-Reaktionen.

A = ATP-Bindedomäne, S = Substratbindedomäne, C = C-Terminus

Zum Teil modifiziert nach Zimmer und Henics [2002]

Ergebnisse

Die Primer enthielten jeweils Schnittstellen für *Bam*HI oder *Xho*I zur Klonierung in einen Expressionsvektor. Abbildung 5-10 A zeigt den Ausschnitt eines Agarosegels zur Überprüfung der PCRs. Die linke Spur zeigt das Produkt der Überlängenamplifikation (2220 bp), die rechte Spur das Produkt der darauf folgenden PCR mit den Primern für Hsp70 (2130 bp). Zur besseren Verdeutlichung des geringen Größenunterschiedes wurde eine PCR durchgeführt, ohne das ursprüngliche Genprodukt vorher gegen Primer aufzureinigen. Für eine Transformation in einen pCR2.1.-Topo[®] Vektor wurde vor der zweiten PCR eine Aufreinigung durchgeführt, welche die Primer der ersten Amplifikation entfernt, so dass nach der zweiten Amplifikation nur noch eine Einzelbande zu sehen ist.

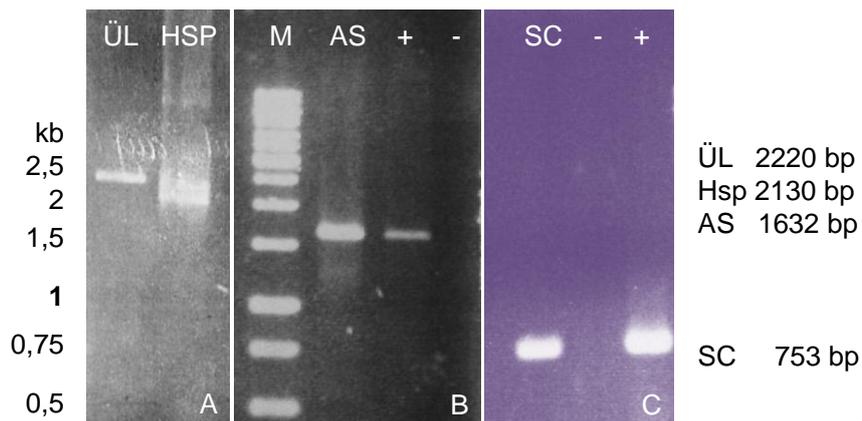


Abbildung 5-10: Amplifikation von Hsp70 und Verkürzungsmutationen von Hsp70 mittels PCR

A: Amplifikation eines Überlängeproduktes (ÜL, 2220 bp) und Hsp70 (HSP, 2130 bp).
B: M - Marker, Amplifikation der Verkürzungsmutation AS (1632 bp) mittels Kolonie-PCR nach Transformation mit Positiv- (+) und Negativkontrolle (-).
C: Amplifikation der Verkürzungsmutation SC (753 bp) mittels Kolonie-PCR nach Transformation mit Positiv (+) - und Negativkontrolle (-), bp – Basenpaare, kb – Kilobasen.

Ergebnisse

Nach der PCR wurden die PCR Produkte aufgereinigt und in den pCR2.1-Topo[®] Vektor ligiert. Bei erfolgreicher Transformation des ligierten Vektors in kompetente *E. coli* Top10 Zellen konnte die Vektor-DNA aus einer 5 ml Flüssigkultur isoliert werden, bevor das Genprodukt mit den Restriktionsenzymen *Bam*HI und *Xho*I ausgeschnitten und nach einer weiteren Aufreinigung in einen ebenso behandelten pET28a(+) Vektor eingefügt werden konnte (siehe Abbildung 5-11). Nach erfolgreicher Ligation wurde die Vektor-DNA zunächst in *E. coli* XL1 blue kompetente Zellen kloniert und dort vermehrt. Nach Isolation wurden 50 ng Plasmid-DNA zur Sequenzierung eingereicht. Bei Übereinstimmung der Sequenzen wurde der Vektor zur Proteinexpression in *E. coli* BL21 kompetente Zellen kloniert.

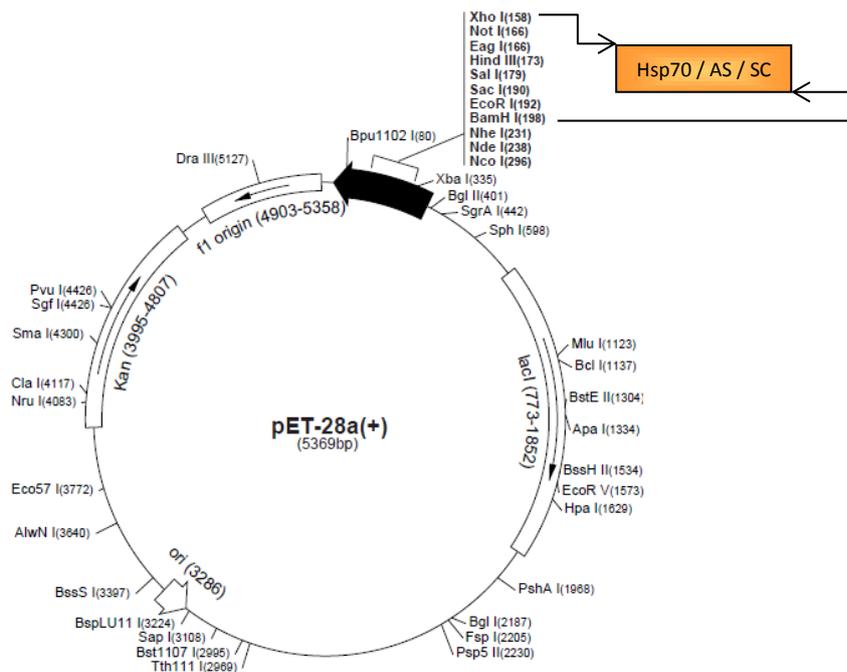


Abbildung 5-11 schematische Abbildung der Klonierung von Hsp70, AS und SC in den Expressionsvektor pET28a(+)

Die einzelnen Genprodukte (Hsp70 Gesamtlänge, AS, SC) wurden zur Expression über die Schnittstellen *Xho*I und *Bam*HI in pET28a(+) inseriert. Modifiziert nach Vektorkarte des Herstellers (Novagen).

Ergebnisse

Abbildung 5-10 B und C zeigen jeweils einen Ausschnitt eines Agarosegels zur Überprüfung einer erfolgreichen Transformation der Verkürzungsmutanten (AS, 1632 bp und SC, 753 bp) in *E. coli* BL21. Als Positivkontrolle diente in der PCR das jeweilige zu ligierende Insert als Vorlage, als Negativkontrolle wurde ein leerer, mit den Restriktionsenzymen *Bam*HI und *Xho*I geschnittener Vektor pET28a(+) verwendet.

Die Expression der Proteine erfolgte wie in Kapitel 4.2.2 unter Proteinaufreinigung beschrieben. Zur Überprüfung der Aufreinigung wurden die einzelnen Fraktionen auf einem SDS-Gel überprüft. Hierzu wurden jeweils 30 µl der Fraktionen auf ein Gel aufgetragen. Abbildung 5-12 zeigt exemplarisch eine Aufreinigung von Hsp70 mittels HPLC und das dazugehörige SDS-Gel. In den Fraktionen 2 bis 5 zeigt sich der Durchfluss der nicht an die Säulenmatrix gebundenen Proteine. Anschließend wurde die Säule gewaschen, bis die Adsorption im UV Spektrum bei 280 nm (Dunkelblau, UV) wieder auf die Nulllinie abgesunken war, also kein weiteres Protein mehr von der Säule gewaschen wurde. In der Coomassie Färbung des SDS Gels zeigt sich ebenfalls ein Fehlen der Proteinbanden, bis in Fraktion 8 schließlich kein Protein mehr nachweisbar ist.

In den Fraktionen 9 bis 11 ist durch den Anstieg der Imidazolkonzentration (Grün, conc) auf zunächst 50 mM und dann 250 mM ebenfalls erst ein leichter, in Fraktion 10 dann ein deutlicher Anstieg der Proteinkonzentration (Dunkelblau, UV) zu erkennen. Dieser zeichnet sich ebenfalls bei 72 kDa (rote Bande) im SDS-Gel in den Fraktionen 9 bis 11 ab.

Ergebnisse

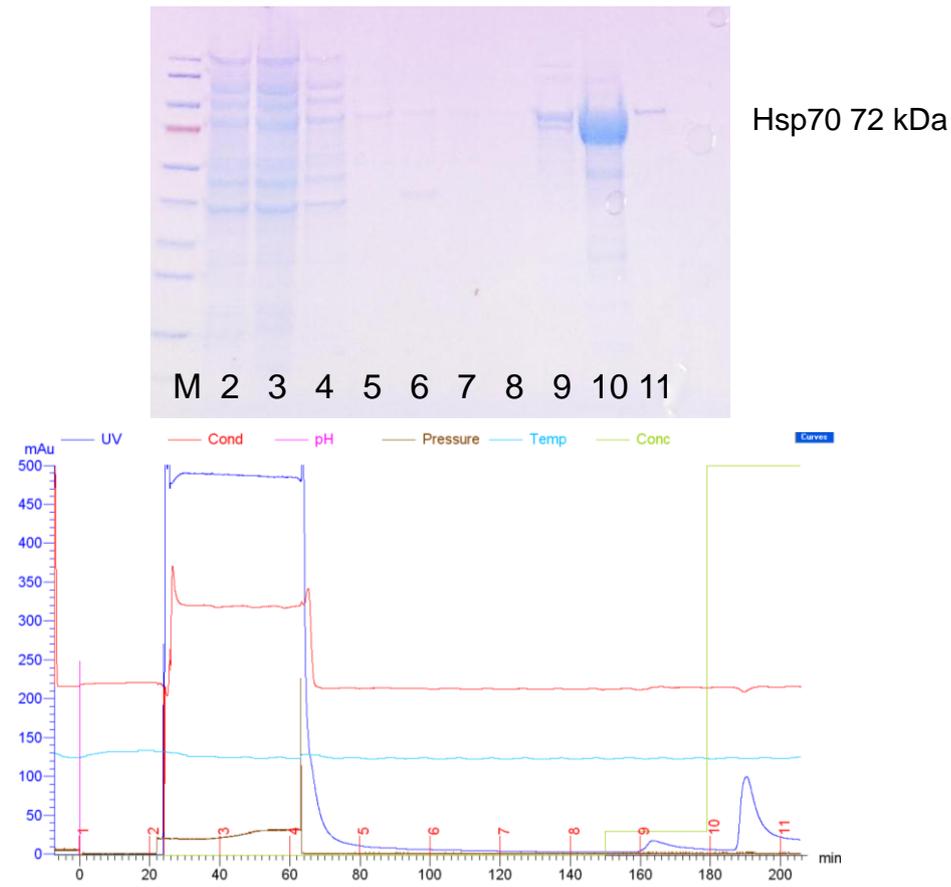


Abbildung 5-12 Aufreinigung von Hsp70 mittels HPLC und dazugehörige Coomassie-gefärbte SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Oben: Fraktionen der Aufreinigung im SDS-Gel, aufgetragen sind je 30 μ l der einzelnen Fraktionen, Coomassie Färbung.

Unten: Abbildung der von der HPLC gemessenen Parameter: blau: UV Adsorption bei 280 nm (Proteingehalt), Rot: Leitfähigkeit (Salzgehalt), Grün: relative Konzentration von Puffer B (Imidazolgehalt).

Analog hierzu wurden die Verkürzungsmutationen aufgereinigt (siehe Abbildung 5-13). Die Größe der verkürzten Proteine konnte nur annähernd mit Hilfe des Proteinidentifikations- und Analysewerkzeuges auf dem ExPASy Server berechnet werden (http://web.expasy.org/compute_pi/). Nach der Aufreinigung wurde zusätzlich eine Analyse im SDS-Gel mittels Western Blot mit einem anti-Hsp70-Antikörper (SPA-820) durchgeführt.

Ergebnisse

Hierbei zeigte sich, dass die berechnete Größe des SC-Teiles von 28 kDa nicht der Realität entspricht. Sowohl im Western Blot (siehe Abbildung 5-13 C) als auch SDS Gel (siehe Abbildung 5-13 B) läuft die Bande etwas höher, bei ca. 35 kDa. Die berechnete Größe des AS-Fragmentes hingegen liegt bei 59 kDa und stellt sich als ca. 55 kDa dar (siehe Abbildung 5-13 A).

Im Western Blot ist weiterhin eine zweite Bande für SC zu erkennen, die keiner Bande im SDS-Gel zugeordnet werden kann. Höchstwahrscheinlich handelt es sich hier um Abbauprodukte des instabilen Proteins oder um eine unspezifische Bindung des Antikörpers.

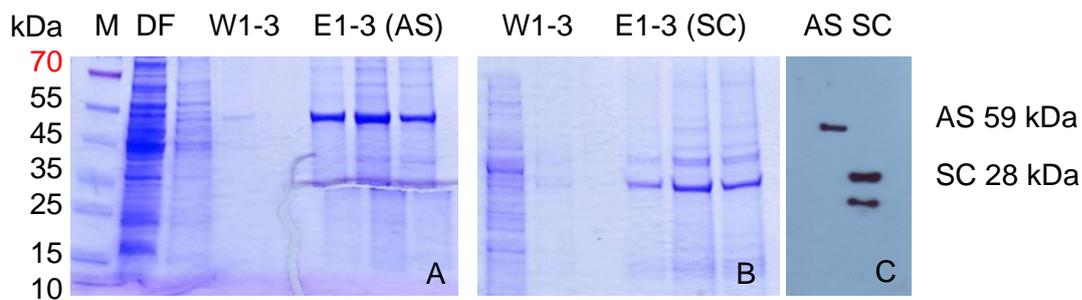


Abbildung 5-13: SDS Gele und Western Blot der Aufreinigung der Verkürzungsmutanten AS und SC von Hsp70

Aufgetragen sind jeweils 30 µl der einzelnen Fraktionen

A: Coomassie-gefärbtes SDS-Gel der Aufreinigung von AS, berechnete Größe 59 kDa

B: Coomassie-gefärbtes SDS-Gel der Aufreinigung von SC, berechnete Größe 28 kDa

C: Western Blot der Elutionsfraktionen von AS und SC mit anti-Hsp70-Antikörper.

M – Marker, DF – Durchfluss, W - Waschfraktionen, E - Elutionsfraktionen.

5.4 ETABLIERUNG VON BINDUNGSASSAYS

Wie bereits oben (siehe 5.1.2) erörtert, zeigte sich eine erhöhte CD4⁺ T-Zellproliferation vor allem in Verbindung mit geringen Peptidkonzentrationen. In Aufnahmeassays wurden Peptidkonzentrationen zwischen 0,1 µg/ml und 10 µg/ml Peptid und 1 µg/ml Hsp70 verwendet. Im Bindungsassays (DELFI) sind diese Konzentrationen aber unterhalb der Nachweisgrenze. Daher wurden verschiedene Konzentrationen zwischen 5 µg/ml und 25 µg/ml von Biotin-markierten Peptiden auf ihre unspezifische Hintergrundbindung an mit 5 % BSA blockierte Vertiefungen einer Mikrotiterplatte getestet. In Abbildung 5-14 sind exemplarisch die niedrigste (5 µg/ml) und höchste (25 µg/ml) verwendete Konzentration der verwendeten Biotin-markierten Peptide (TT₉₄₇₋₉₆₆, HA₃₀₇₋₃₁₉ und CLIP₁₀₅₋₁₁₇) dargestellt. Zum Vergleich wurden Vertiefungen nur mit 5 % BSA blockiert (BSA).

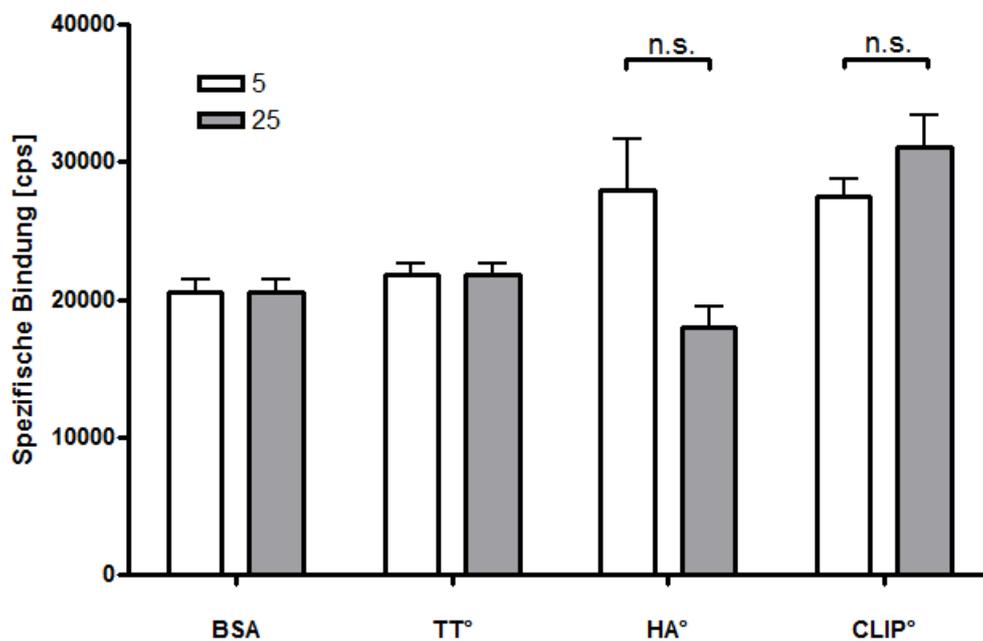


Abbildung 5-14 Untersuchung der Hintergrundbindung von Biotin-markierten Peptiden

Verschiedene Konzentrationen von Biotin-markierten (°) Peptiden (TT₉₄₇₋₉₆₆, HA₃₀₇₋₃₁₉ und CLIP₁₀₅₋₁₁₇) wurden auf ihre unspezifische Bindung an mit 5 % BSA blockierte Vertiefungen einer Mikrotiterplatte untersucht. Dargestellt sind die Ergebnisse der niedrigsten und höchsten Konzentration (5 und 25 µg/ml). Als Vergleichswert dienten BSA blockierte Vertiefungen (BSA). Das Auslesen in *counts per second* [cps] erfolgte anhand von Europium-gelabeltem Streptavidin, das an Biotin bindet.

Ergebnisse

Auch wenn ein Unterschied zwischen den beiden dargestellten Konzentrationen von Biotin-markiertem HA₃₀₇₋₃₁₉ und CLIP₁₀₅₋₁₁₇ festzustellen ist, so liegt dieser doch außerhalb des signifikanten Bereiches. Trotz eines höheren Hintergrundwertes von HA₃₀₇₋₃₁₉ bei 5 µg/ml, wurde aufgrund der geringeren und in etwa vergleichbaren Hintergrundbindung von CLIP₁₀₅₋₁₁₇ diese Konzentration für die folgenden Experimente verwendet.

Weiterhin wurden sowohl verschiedene Arten der Blockierung getestet, als auch der Unterschied zwischen einer direkten Bindung von Komplexen an eine Mikrotiterplatte, als auch einer indirekten Bindung über spezifische Antikörper. Die Hälfte der Vertiefungen einer Mikrotiterplatte wurde hierzu mit spezifischem anti-Hsp70-Antikörper beschichtet.

Die Blockierung von beschichteten und unbeschichteten Vertiefungen erfolgte dann mit 5 % BSA in PBS (w/v) oder dem kommerziell erhältlichen Roti-Block[®], das für die Blockierung von Western Blots entwickelt wurde. 5 % BSA hatten sich in Vorversuchen als die am besten geeignete BSA-Konzentration herausgestellt (ohne Abbildung). Der Grad der Blockierung des Hintergrundes wird anhand der noch unspezifisch gebundenen Menge Biotin-markierten TT₉₄₇₋₉₆₆-Peptides festgestellt. Wie Abbildung 5-15 darstellt, ist bei der vorherigen Bindung von spezifischem Antikörper kein Unterschied zwischen der Blockierung von 5 % BSA in PBS (w/v) und der Standardkonzentration von Roti-Block[®] festzustellen.

Bei einer nicht erfolgten Beschichtung mit Antikörper zeigt BSA zwar einen geringeren Hintergrund, Roti-Block[®] hingegen blockiert hier nicht ausreichend die freien Bindestellen, so dass zugegebenes, Biotin-markiertes TT₉₄₇₋₉₆₆ einen hohen Hintergrund erzeugt. In den folgenden Experimenten wurde daher eine Blockierung mit 5 % BSA gewählt, um sowohl Experimente mit, als auch ohne spezifischem anti-Hsp70 Antikörper mit vergleichbaren Hintergrundwerten durchführen zu können.

Ergebnisse

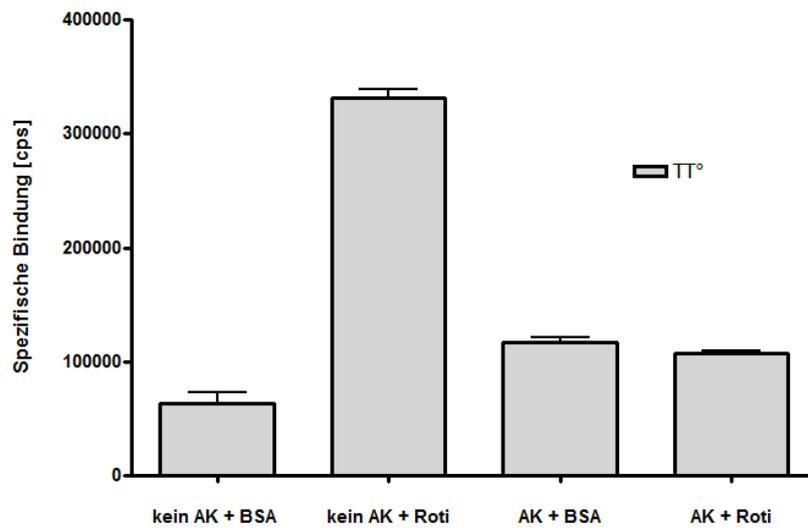


Abbildung 5-15: Unterschiedliche Blockierungsmethoden mit und ohne spezifischem anti-Hsp70-Antikörper

Zum Vergleich wurden Vertiefungen einer Mikrotiterplatte teilweise mit dem spezifischen anti-Hsp70-Antikörper (AK) SPA-820 beschichtet und mit 5 % BSA (+BSA) oder Roti-block[®] (+Roti) blockiert. Gemessen wurde die unspezifische Bindung von 5 µg/ml Biotin-markiertem (°) TT₉₄₇₋₉₆₆ in einem DELFIA-Versuch. Das Auslesen in *counts per second* [cps] erfolgte anhand von Europium-gelabeltem Streptavidin, das an Biotin bindet.

5.5 BINDUNGSSTUDIEN MIT VERKÜRZUNGSMUTANTEN

Die in Kapitel 5.3 (Klonierung von Hsp70) erwähnten, aufgereinigten Proteine wurden hinsichtlich ihrer Bindungsaktivität untersucht. Hierzu wurden verschiedene Biotin-markierte Peptide, (Influenza Hämagglutinin, HA₃₀₇₋₃₁₉ und *Invariant Chain Peptide*, CLIP₁₀₅₋₁₁₇) mit Hsp70 Proteinen über Nacht vorinkubiert und am nächsten Tag in mit anti-Hsp70-Antikörper beschichtete Vertiefungen einer Mikrotiterplatte gegeben. Je mehr Biotin-markiertes Peptid an die jeweiligen Hsp70 Proteine gebunden hatte, desto höher ist die resultierende spezifische Bindung, die als Adsorption im DELFIA ermittelt werden kann.

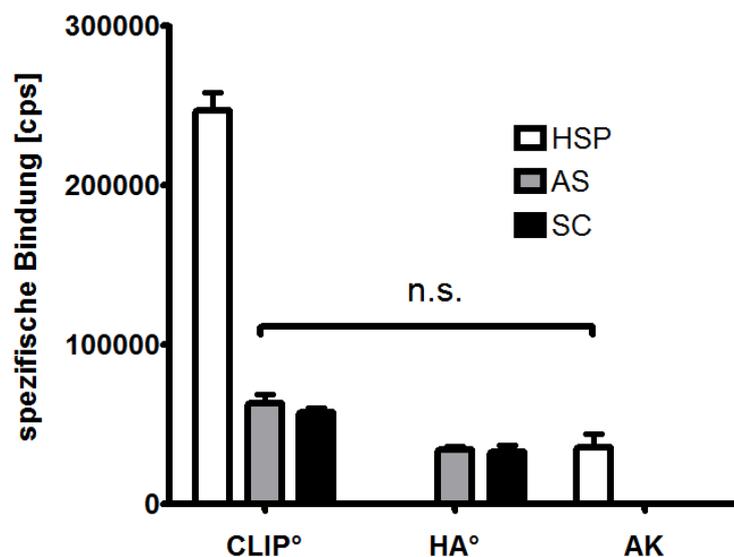


Abbildung 5-16: Peptid-Bindungsassay der Verkürzungsmutationen AS und SC im Vergleich zu Hsp70 mit Biotin-markiertem (°) CLIP₁₀₅₋₁₁₇ und HA₃₀₇₋₃₁₉

Vorinkubierte Protein:Peptid Komplexe (je 5 µg/ml Protein (Hsp70, AS, SC), 5 µg/ml Peptide (CLIP₁₀₅₋₁₁₇, HA₃₀₇₋₃₁₉)) wurden zu Plattengebundenem spezifischen anti Hsp-70 Antikörper (SPA-820, 10 µg/ml) gegeben.

Weiß: Bindung an Hsp70, Grau: Bindung an AS, Schwarz: Bindung an SC.

Die Bindung von Hsp70 an CLIP₁₀₅₋₁₁₇ dient als Positivkontrolle.

Die Hintergrundbindung ist durch Auslesen von unbeladenem Antikörper (AK) dargestellt.

Die Auswertung erfolgte mittels DELFIA (cps - counts per second).

Ergebnisse

In Abbildung 5-16 zeigt sich erwartungsgemäß eine Bindung des Komplexes von HSP und CLIP₁₀₅₋₁₁₇ an den plattengebundenen spezifischen anti-Hsp70-Antikörper, was indirekt eine Bindung von CLIP₁₀₅₋₁₁₇ an Hsp70 zeigt (positive Kontrolle). Die Verkürzungsmutanten AS und SC hingegen heben sich weder bei Bindung von CLIP₁₀₅₋₁₁₇ noch von HA₃₀₇₋₃₁₉ signifikant vom Hintergrund (AK) ab, so dass keine Aussage über eine Bindung des Komplexes an Peptide gemacht werden kann. Durch die Unversehrtheit der Substratbindestelle in beiden Verkürzungsmutationen kann davon ausgegangen werden, dass hier trotz Verkürzungen eine Bindung erfolgen kann.

Vielmehr führt die Instabilität, die sich bei SC bereits im Western Blot gezeigt hat, wohl zu einer Degradation der Proteine vor dem Zeitpunkt der Messung. Degradierungserscheinungen und Ausfällen der frisch aufgereinigten Proteine bestätigten diese Beobachtung zusätzlich. Eine Bindung des spezifischen Antikörpers konnte im Western Blot bereits gezeigt werden (siehe Abbildung 5-13 C).

Diese Beobachtungen legen nahe, dass unter Umständen bereits bei der Translation der Proteine, sowie deren Faltung bei der Expression Fehler entstehen. Abhilfe sollte eine stabilere DNA bringen, deren Basentriplets derart verändert werden, dass eine größtmögliche Stabilität der DNA sowie eine korrekte Expression durch Bakterien gewährleistet wird. Sekundärstrukturausbildungen werden so von vornherein unterbunden. Design und Synthese dieser DNA wurden von einem kommerziellen Anbieter (Qiagen) durchgeführt.

5.6 KLONIERUNG EINES OPTIMIERTEN VEKTORS FÜR DIE EXPRESSION HUMANER PROTEINE UND MUTATIONEN

Da die von Qiagen synthetisierte DNA zur Expression von humanem Hsp70 in Bakterien bereits in einen Expressionsvektor inseriert war, konnte dieser direkt in einen Expressionsstamm (*E. coli* BL21) kloniert werden. Außerdem eignete sie sich, um Punktmutationen zweier Aminosäuren in der Substratbindestelle durchzuführen (schematische Darstellung siehe Abbildung 5-19).

Aufgrund von Sequenzvergleichen zwischen humanem Hsp70 und bakteriellen DnaK konnten die für die Bindung von Substrat wichtigen Aminosäuren im humanen Protein ebenfalls ausgemacht werden. Bei DnaK handelt es sich um die Aminosäuren Methionin 404 und Alanin 429, diese entsprechen im humanen Hsp70 den Aminosäuren Alanin 405 und Tyrosin 430 (Siehe 7.1.2, Sequenzvergleich im Anhang).

```

                Glycin GGA
                TGGGTCTGGAAACCGGAGGTGGTGTTATGAC
1201 ctgtctctggggtctggaaccgaggtggtggtatgaccgcactgattaaacgtaatagc
401 L S L G L E T A G G V M T A L I K R N S
    1-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!
                Glycin GGC
                GATAATCAGCCGGGTGGC
1261 accattccgaccaaacagaccagatTTTTaccacctattccgataatcagccgggtggt
421 T I P T K Q T Q I F T T Y S D N Q P G V
    1-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!
    CTGATTCAGGTTTATG
1321 ctgattcagggtttatgaagggtgaacgtgccatgaccaaagataataatctgctgggtcgt
441 L I Q V Y E G E R A M T K D N N L L G R
    1-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!

```

Abbildung 5-17: Ausschnitt aus der Sequenz von Hsp70A1a (M 11717) mit Lage der Mutationsprimer.

Rot markiert sind die zu mutierenden Basentriplets.

Ergebnisse

Alanin an Position 405 und Valin an Position 437 wurden mittels zielgerichteter Mutagenese jeweils durch Glycin ersetzt (siehe auch Abbildung 5-17). Diese Mutationen werden im Weiteren als A405G und V437G bezeichnet. Zusätzlich wurde aus der synthetisierten DNA die C-terminale Verkürzungsmutation (AS) generiert.

Eine N-terminale Verkürzung war auch mit der verbesserten DNA-Struktur nicht möglich, da die N-terminale ATP-Domäne und Substratbindedomäne zu eng miteinander verflochten sind. Die C-terminale Verkürzung erfolgte mittels PCR mit den Primern HSP70A1forward und HSP70a1aS1632reverse, die jeweils eine Restriktionsschnittstelle für *Bam*HI oder *Xho*I enthalten. Die Klonierung in den Expressionsvektor pET28a(+) verlief analog zu 5.3 Klonierung von Hsp70.

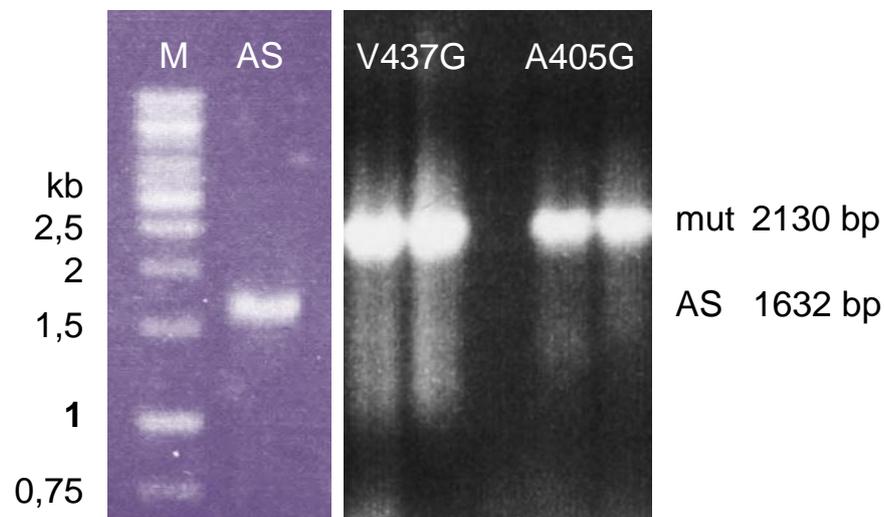


Abbildung 5-18: Kontroll-PCR der Verkürzungsmutation AS und der Punktmutation A405G und V437G

Aufgetragen sind ganze PCR-Ansätze.

Links AS (1632 bp), rechts V437G und A405G (wie Wildtyp, 2130 bp)

M – Marker, mut = mutiertes Hsp70 (A405G bzw. V437G).

Ergebnisse

In Abbildung 5-18 sind die Ergebnisse einer Kontroll-PCR nach erfolgreicher Klonierung der mutierten Vektoren bzw. erfolgreicher Klonierung von AS in einen Transformationsvektor pET28a(+) dargestellt. Alle Klone mit Vektorinsert wurden zur Sequenzierung eingereicht um die Mutation zu bestätigen und die DNA hinsichtlich weiterer Spontanmutationen zu überprüfen.

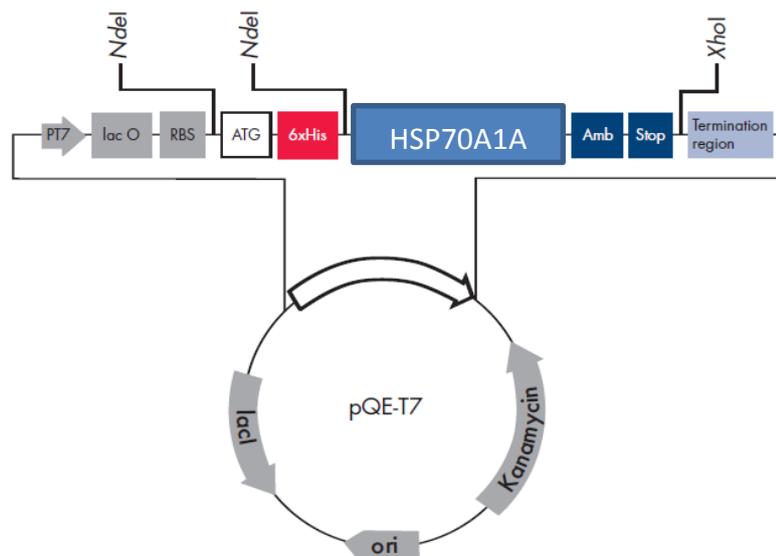


Abbildung 5-19 Schematische Darstellung des Expressionsvektor mit inseriertem HSP70A1A von Qiagen

Nach erfolgreicher Sequenzierung wurden die Vektoren aufgereinigt und zur Expression in *E. coli* BL21 kloniert. Zusätzlich wurde der bereits vorhandene Expressionsvektor des Wildtyp Hsp70 ebenfalls in *E. coli* BL21 kloniert. Abbildung 5-20 zeigt einen Western Blot mit anti-Hsp70-Antikörper SPA-820 von jeweils 10 µl der Elutionsfraktionen der erfolgreichen Aufreinigung. Spur 1 zeigt Wildtyp Hsp70, Spur 2 A405G, Spur 3 V437G, alle auf Höhe von 72 kDa. In Spur 4 ist AS aufgetragen, das wieder bei ca. 55 kDa läuft, anstatt wie errechnet bei 59 kDa.

Ergebnisse

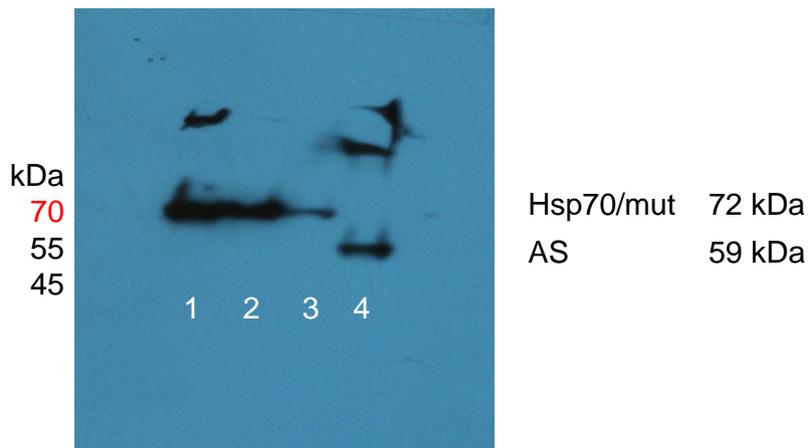


Abbildung 5-20: Western Blot auf Hsp70(1), A405G(2), V437G(3), AS(4)

Aufgetragen sind jeweils 10 μ l der Elutionsfraktionen. mut = punktmutiertes Hsp70, A405G bzw. V437G. Primärer Antikörper anti-Hsp70-Antikörper (SPA-820) sekundärer Antikörper anti-mouse HRP.

5.7 BINDUNGSSTUDIEN MIT A405G

Die neu aufgereinigten Proteine sollten nun über eine höhere Stabilität verfügen, Ihre Bindungsaktivität wurde in den folgenden Versuchen überprüft. Biotin-markiertes HA₃₀₇₋₃₁₉ und CLIP₁₀₅₋₁₁₇ wurden hierzu mit den jeweiligen Proteinen vorinkubiert und dann auf plattengebundenen anti-Hsp70 Antikörper gegeben. Alle Versuche wurden in Dreifachbestimmung durchgeführt, die gezeigten Daten stellen ein repräsentatives Ergebnis von mehreren Wiederholungen dar. Alle statistischen Auswertungen erfolgten mittels *paired student's t-test*.

Zunächst wurde nur die Punktmutation bei der Alanin 405 durch Glycin ersetzt wurde (A405G) mit TT₉₄₇₋₉₆₆ und HA₃₀₇₋₃₁₉ hinsichtlich ihrer Bindungskapazität getestet. Hierzu wurde anti-Hsp70-Antikörper SPA-820 über Nacht in die Vertiefungen einer Mikrotiterplatte gegeben und am nächsten Tag mit über Nacht bei 37 °C mit Hsp70 oder A405G chaperonierten Biotin-markierten HA₃₀₇₋₃₁₉ oder TT₉₄₇₋₉₆₆-Peptiden inkubiert. Als Kontrollen wurden unkomplexierte Proteine über Nacht ebenfalls bei 37 °C inkubiert und wie die Hsp70:Peptid-Komplexe weiterbehandelt. Abbildung 5-21 zeigt das Ergebnis eines von drei unabhängig durchgeführten Experimenten. Es zeigt sich eine Bindung von Biotin-markiertem (°) TT und HA₃₀₇₋₃₁₉ an Hsp70 (Weiß). Die Bindung von sowohl TT₉₄₇₋₉₆₆° als auch HA₃₀₇₋₃₁₉° an A405G (Schwarz) jedoch ist in beiden Fällen signifikant reduziert (** p<0,01). Diese Punktmutation scheint ausreichend zu sein, die Peptidbindung zu reduzieren.

Weiterhin wurde die Bindung von A405G an HLA-DRB1*0401 überprüft. Hierzu wurden die Vertiefungen einer Mikrotiterplatte über Nacht mit anti-HLA-DR-Antikörper (L-243) beschichtet. Die Hälfte der Vertiefungen wurde am nächsten Tag zusätzlich für eine Stunde mit HLA-DRB1*0401 inkubiert, bevor Biotin-markiertes HA₃₀₇₋₃₁₉ oder Biotin-markierte Proteine (Hsp70 oder A405G) zugegeben wurden. In Abbildung 5-22 ist in Weiß der Hintergrundwert der Biotin-markierten Peptide und Proteine ohne plattengebundenen HLA-DR dargestellt, in Schwarz die Bindung an HLA-DRB1*0401.

Ergebnisse

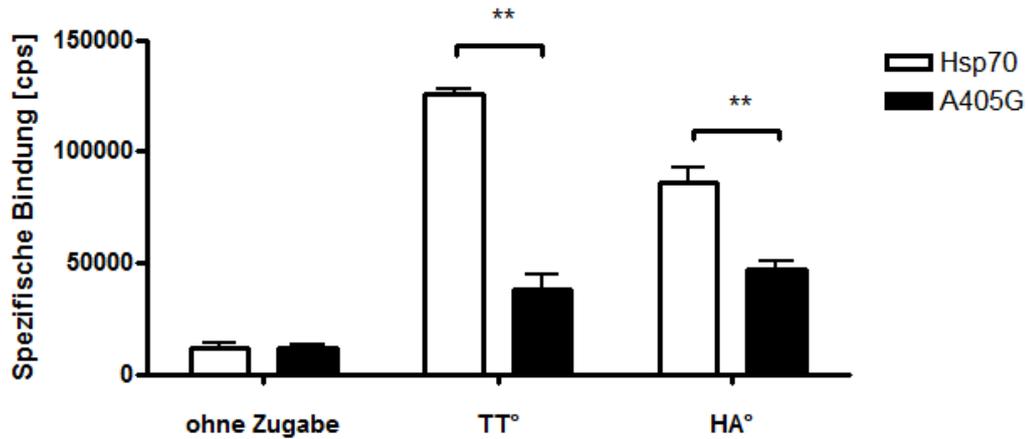


Abbildung 5-21: Bindungsassay von 5 µg/ml Biotin-markiertem(°) TT₉₄₇₋₉₆₆ und HA₃₀₇₋₃₁₉ an Hsp70 (Weiß) und Punktmutation A405G (Schwarz)

Vertiefungen einer Mikrotiterplatte wurden über Nacht mit 10 µg/ml anti-Hsp70-Antikörper (SPA-820) beschichtet, anschließend wurde 5µg/ml Hsp70-Protein (Weiß), oder A405G (Schwarz) welches über Nacht mit 5 µg/ml Biotin-markiertem(°) HA inkubiert wurde, für eine Stunde zugegeben. Kontrolle: Keine Zugabe von Biotin-markiertem Protein (ohne Zugabe). Die Auswertung erfolgte mittels DELFIA (cps - counts per second).

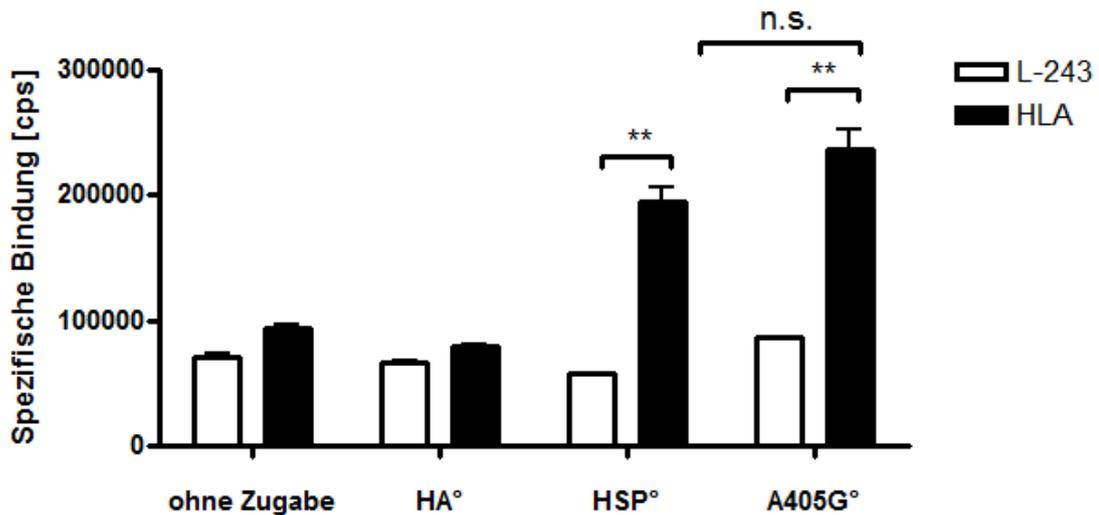


Abbildung 5-22: Bindungsassay von Biotin-markiertem (°) Hsp70 und A405G an HLA-DRB1*0401

Vertiefungen einer Mikrotiterplatte wurden über Nacht mit 10 µg/ml spezifischem anti-HLA-DR Antikörper (L-243) beschichtet (Weiß) und anschließend mit HLA-DRB1*0401 beladen (Schwarz). 5 µg/ml Biotin-markiertes(°) HA oder 5 µg/ml Protein (Hsp70 oder A405G) wurden für eine Stunde zugegeben. Kontrolle: Keine Zugabe von Biotin-markierten Protein oder Peptid (ohne Zugabe). Die Auswertung erfolgte mittels DELFIA (cps - counts per second).

Ergebnisse

Ein signifikanter Anstieg der Bindung von Hsp70 und A405G (**, $p < 0,01$) macht deutlich, dass beide Proteine an HLA-DRB1*0401 binden. Ein relevanter Unterschied zwischen der Bindung von Hsp70 und A405G ist jedoch nicht auszumachen (n.s., $p > 0,5$). Erwartet war allerdings eine höhere Bindung von Biotin-markiertem HA₃₀₇₋₃₁₉. Diese ist ein Indikator für die Funktionalität der Bindestelle von HLA-DRB1*0401. Da sich die Bindung der Proteine aber signifikant vom Hintergrund abhebt kann davon ausgegangen werden, dass es sich nicht um eine Hintergrundbindung handelt, sondern die Bindung der Proteine an HLA-DRB1*0401 erfolgt ist.

5.8 BINDUNGSSTUDIEN MIT WEITEREN MUTANTEN

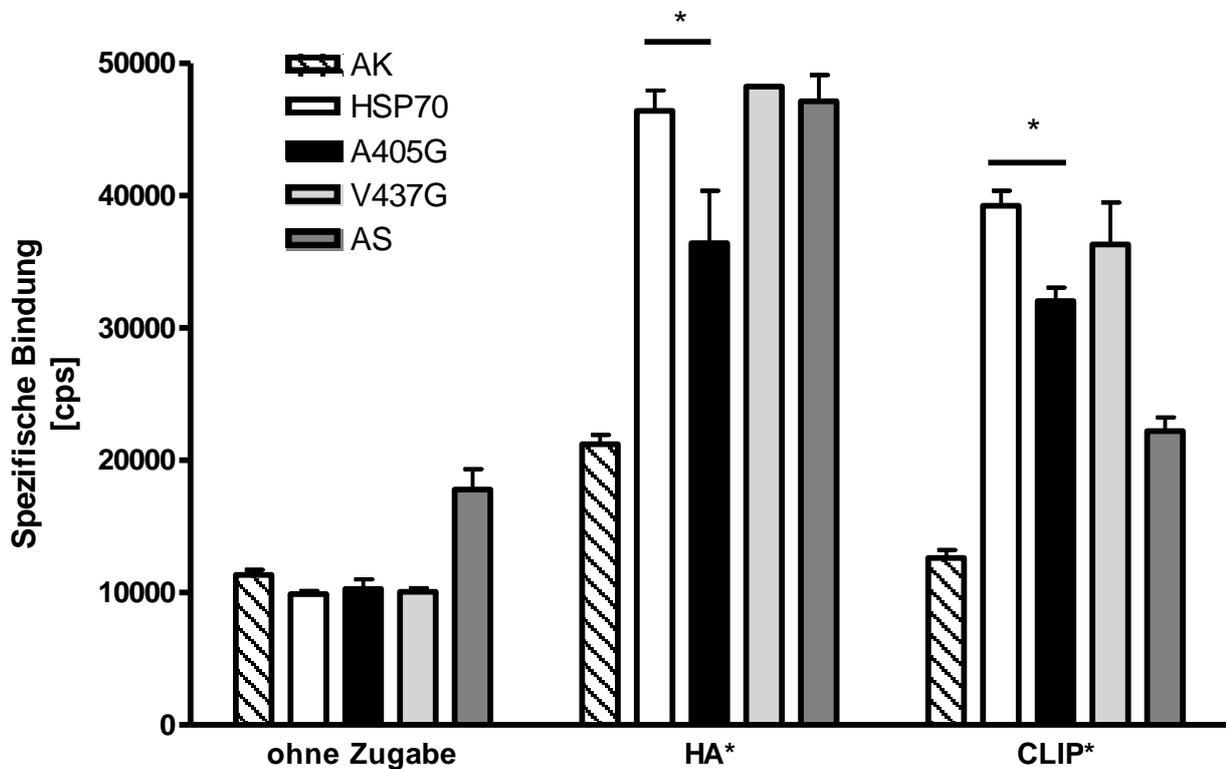


Abbildung 5-23: Bindungsassay von Biotin-markiertem (°) HA₃₀₇₋₃₁₉ und CLIP₁₀₅₋₁₁₇ an Hsp70, A405G, V437G und AS

Mikrotiterplatten wurden über Nacht mit 5 µg/ml anti-Hsp70-Antikörper (SPA-820) beschichtet. Vorinkubierte Komplexe aus Proteinen (Hsp70, A405G, V437G, AS) und biotinylierten Peptiden (°, HA₃₀₇₋₃₁₉, CLIP₁₀₅₋₁₁₇) oder Proteine alleine wurde für eine Stunde zugegeben. Als Kontrolle dienten an anti-Hsp70-Antikörper gebundene Hsp70 Proteine ohne Zugabe von Biotin-markiertem Peptid (ohne Zugabe). Die Auswertung erfolgte mittels DELFIA (cps - counts per second).

Nachdem für A405G eine reduzierte Bindung an Peptide gezeigt werden konnte, sollten auch für das Protein mit der Punktmutation, in der Valin 437 durch Glycin ersetzt wurde (V437G) und die Verkürzungsmutation AS hinsichtlich Ihrer Bindung an Peptide und HLA-DRB1*0401 untersucht werden.

Ergebnisse

In Abbildung 5-23 zeigt sich eine Bindung von Biotin-markiertem HA₃₀₇₋₃₁₉ und CLIP₁₀₅₋₁₁₇ an Hsp70 (weißer Balken). Diese ist in beiden Fällen signifikant höher als die Hintergrundbindung der Peptide (gestreifte Balken, $p < 0,05$). Ebenfalls binden beide Peptide an das mutierte V437G (Hellgrau) und an die Verkürzungsmutante AS (Dunkelgrau). Diese Bindung unterscheidet sich nicht signifikant von der Bindung an Hsp70 ($p > 0,05$). Die Bindung des mutierten Proteins A405G jedoch ist wieder signifikant reduziert (schwarz, $p < 0,01$).

Nachdem mehrfach gezeigt wurde, dass die Punktmutation A405G eine reduzierte Substratbindung aufweist, sollte überprüft werden, ob sich die mutierten Proteine auch in ihrer Bindung an HLA-DR unterscheiden. Wie bereits in Abbildung 5-8 gezeigt, bindet Hsp70 an HLA-DR. HLA-DRB1*0401 wurde für die Versuche direkt in die Vertiefungen einer Mikrotiterplatte gegeben. Analoge Experimente, bei denen zunächst ein anti-HLA-DR-Antikörper (L-243) plattengebunden und später HLA-DR zugegeben wurde, wurden ebenfalls durchgeführt und lieferten, abgesehen von der HA₃₀₇₋₃₁₉ Bindung, vergleichbare Ergebnisse.

Zu Platten-gebundenem HLA-DRB1*0401 wurden die Biotin-markierten Proteine gegeben. Außerdem wurde Biotin-markiertes HA₃₀₇₋₃₁₉ Peptid zugegeben. Dieses ist ein Substrat von HLA-DRB1*0401 und dient somit als positive Kontrolle für eine Bindung [Haug *et al.*, 2007]. Abbildung 5-24 zeigt eine signifikant höhere Bindung der Positivkontrolle HA₃₀₇₋₃₁₉ (Biotin-markiert (°), gepunkteter Balken, $p < 0,1$) im Vergleich zum Hintergrund (gestreifter Balken). Alle Biotin-markierten Proteine zeigen ebenfalls eine signifikant höhere Bindung an HLA-DR. Auch die Punktmutation A405G zeigte wiederum eine gleichbleibende Bindung an HLA-DR.

Ergebnisse

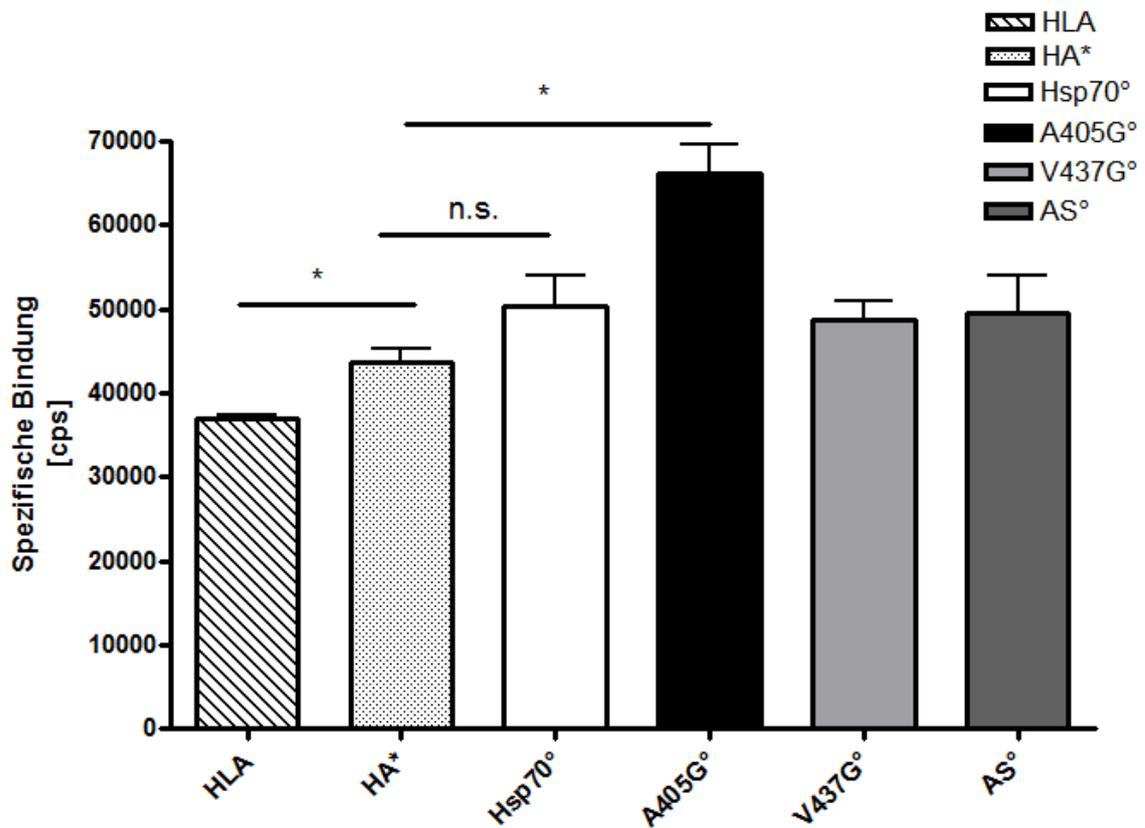


Abbildung 5-24: Bindungsassay von Biotin-markiertem (°) HA₃₀₇₋₃₁₉, Hsp70, A405G, V437G und AS an HLA-DRB1*0401

Mikrotiterplatten wurden über Nacht mit 10 µg/ml HLA-DRB1*0401 beschichtet. Biotin-makierte (°) Proteine oder HA₃₀₇₋₃₁₉ wurden für eine Stunde zugegeben. Als Kontrolle diente unbeladenes HLA-DRB1*0401 (HLA). Die Auswertung erfolgte mittels DELFIA (cps - counts per second).

6 DISKUSSION

6.1 HSP70 IN DER IMMUNANTWORT

Hitzeschockproteine sind als molekulare Chaperone schon lange bekannt und bereits intensiv untersucht worden, hierbei insbesondere die hochkonservierte Familie der HSP70 Proteine. Es wird eine zusätzliche Rolle von Hsp70 bei der adaptiven Immunabwehr diskutiert [Tavaria *et al.*, 1996]. Die ursprüngliche Fähigkeit der Hitzeschockproteine, Peptide von acht bis dreizehn Aminosäuren Länge zu binden, bildete hierfür den Ausgangspunkt. Es konnte gezeigt werden, dass Komplexe aus Hitzeschockproteinen und antigenen Peptiden aus gestressten oder nekrotischen Zellen in den extrazellulären Raum gelangen und chaperonierte Peptide *in vitro* eine erhöhte T-Zellproliferation auslösen können als Peptide alleine [Moseley, 2000].

Die Proliferation von T-Zellen durch Hsp70-chaperonierte Peptide wurde in verschiedenen Arbeitsgruppen untersucht. Antigene Peptide wurden entweder chaperoniert mit Hsp70 oder alleine mit antigenpräsentierenden Zellen inkubiert und nach 3 Stunden zu antigenspezifischen T-Zellen gegeben. Hier konnte, sowohl in einem humanen als auch bovinem Ansatz gezeigt werden, dass insbesondere bei geringen Peptidkonzentrationen (0,01 µg/ml und 0,1 µg/ml) die Komplexierung der Peptide mit Hsp70 zu einer deutlichen Verstärkung der T-Zellproliferation führte [Fischer *et al.*, 2010, Haug *et al.*, 2005, Haug *et al.*, 2007, McLaughlin *et al.*, 2010]. Als ein möglicher Hsp70-Rezeptor wurde CD91 identifiziert. In Monozyten konnte CD91 durch RNA-Interferenz temporär herunterreguliert werden, was zu einem Ausbleiben der verstärkten Proliferation der stimulierten T-Zellen sowie der Produktion von Th1- und Th2-Zytokinen führte [Fischer *et al.*, 2010].

Die Verstärkung der T-Zell-Proliferation durch die Chaperonierung von antigenen Peptiden mit Hsp70, wie sie von Fischer *et al.* [2010] und Haug *et al.* [2005] bereits gezeigt wurde, bildete die Grundlage dieser Arbeit. Untersucht werden sollte der Zusammenhang zwischen Chaperonierung und verstärkter T-Zell

Proliferation. Die intrazellulären Vorgänge hierbei sind aber nur zu einem kleinen Teil charakterisiert. So ist bekannt, dass eine Aufnahme von antigenen Peptiden in Phagolysosomen erfolgt, und eine Übertragung auf MHC-II stattfindet [Lipsker *et al.*, 2002, Singh-Jasuja *et al.*, 2000b]. Die genaueren intrazellulären und molekularbiologischen Vorgänge, die zur Verstärkung der Immunantwort führen, sollen durch verschiedene Assays verdeutlicht werden.

Hierzu wurden mehrere Ansätze verfolgt. Ein Schwerpunkt lag vor allem auf der Aufnahme von Hsp70 in antigenpräsentierende Zellen. Zunächst wurde untersucht, ob die Chaperonierung eine Aufnahme in antigenpräsentierende Zellen durch eine schnellere oder effizientere Aufnahme begünstigt. Die verstärkte Präsentation von Tumorantigenen konnte so bereits gezeigt werden [Bendz *et al.*, 2007]. Zunächst wurde der zeitliche Umfang, anschließend die Quantität der Aufnahme durchflusszytometrisch erfasst. Außerdem wurde die Intrazelluläre Lokalisation und Weitergabe der Peptide innerhalb der Kompartimente einer Zelle mittels konfokaler Mikroskopie untersucht.

Weiterhin wurde untersucht, ob, anstelle einer erhöhten Aufnahme, ein effizienteres Übertragen des Peptides auf MHC-II die Grundlage für eine erhöhte Präsentation und somit bessere Proliferation der T-Zellen darstellt. Hierfür wurde insbesondere die molekulare Struktur des Hsp70 betrachtet, welche sich in eine ATPase-Domäne, Substratbindedomäne und einen C-terminalen Deckel einteilen lässt [Zhu, X. *et al.*, 1996]. Eine klare Unterscheidung in verschiedene Bindestellen für Peptid und HLA-DR sollte so identifiziert werden. Weiterhin wurde die Proteinstruktur von humanem Hsp70 mit der von bovinem Hsp70 und Hsc70 sowie dem bakteriellen DnaK verglichen, um gezielte Mutationen in der Substratbindestelle durchführen zu können. Punktmutationen in der Substratbindestelle sowie eine C-terminale Verkürzung des Proteins sollten neue Einblicke in das Zusammenspiel von Hsp70 und MHC-II bringen. In früheren Studien konnte bereits eine Interaktion zwischen Hsp70 und MHC-II unabhängig von einer Peptidbindung gezeigt werden [Haug *et al.*, 2007].

6.2 KEINE BESCHLEUNIGTE AUFNAHME IN ANTIGENPRÄSENTIERENDE ZELLEN DURCH CHAPERONIERUNG VON PEPTIDEN MIT HSP70

Die Effektivität der Aufnahme Hsp70-chaperonierter Peptide sollte mit Hilfe durchflusszytometrischer Analysen untersucht werden. Peptide wurden dazu FITC-markiert und mit oder ohne Chaperonierung zu antigenpräsentierenden Zellen gegeben.

Zunächst sollte das zeitliche Maximum der Aufnahme festgestellt werden. Dazu wurde TT₉₄₇₋₉₆₆-FITC mit Hsp70 über Nacht vorinkubiert. TT₉₄₇₋₉₆₆-FITC alleine oder die chaperonierten Peptide wurden am nächsten Tag zu frisch isolierten antigenpräsentierenden Zellen gegeben [Haug *et al.*, 2007]. Die intrazelluläre Aufnahme wurde, im Gegensatz zu früheren Studien, nicht nur über wenige Stunden sondern über einen Untersuchungszeitraum von 11 Stunden verfolgt. Um nur intrazelluläre Moleküle zu identifizieren, wurde zu jedem Ansatz vor der Messung 0,16 mg/ml Trypanblau gegeben. Zwar soll eine extrazelluläre FITC-Fluoreszenz schon bei 0,03 mg/ml Trypanblau deutlich reduziert sein, eine vollständige Überlagerung der extrazellulären Fluoreszenz durch Trypanblau ist aber erst zwischen 0,0625 und 0,25 mg/ml Trypanblau erreicht [Hed *et al.*, 1987].

Da die Bindung von chaperonierten Peptiden an Endozytose-vermittelnde Hsp70-Aufnahmerezeptoren innerhalb von 30 Minuten erfolgt, [Therriault *et al.*, 2006] wurde eine schnellere Aufnahme chaperonierter Peptide erwartet. Allerdings waren unchaperonierte Peptide deutlich schneller intrazellulär zu lokalisieren. Die Aufnahmewerte schwankten sowohl für Peptide, als auch für Hsp70:Peptid-Komplexe nach 3 Stunden stark, was darauf hindeutet, dass die Peptide intrazellulär prozessiert wurden, um auf der Oberfläche der Zellen präsentiert zu werden. Dadurch verändert sich die intrazelluläre Fluoreszenz, wobei nicht klar ist, ob die FITC-Markierung dabei ausbleicht, abgespalten wird oder mitpräsentiert und extrazellulär von Trypanblau gequenchet wird.

Diskussion

Die Präsentation aufgenommener Peptide soll bereits nach 30 Minuten stattfinden, was auf einen sehr schnellen und effizienten Prozessvorgang hinweist [Kurotaki *et al.*, 2007]. Eine Präsentation ist in diesem Ansatz aber nicht nachweisbar, ein intrazelluläres Verweilen der FITC-Markierung bei gleichzeitiger Präsentation der Peptide ist aber aufgrund dieser Aussage wahrscheinlich. Eine Sättigung der Aufnahme nach etwa 5 Stunden, wie von Kurotaki *et al.* für Hsp90 beschrieben, scheint hier auch der Fall zu sein.

Zwischen 5 und 11 Stunden schwanken die Werte stark und sind somit nicht mehr aussagekräftig. Die folgenden Versuche wurden daher, wie vergleichbare Experimente von Fischer *et al.* [2010] und Haug *et al.* [2005], in einem Untersuchungszeitraum von maximal 3 Stunden durchgeführt.

Eine Titration der Peptidmenge sollte die Vergleichbarkeit mit bereits durchgeführten T-Zell-Proliferationsassays gewährleisten. Hier wurden vor allem Hsp70-Effekte bei geringen Peptidkonzentrationen von 0,01 µg/ml gezeigt [Fischer *et al.*, 2010]. Dies wurde für das bovine System ebenfalls bestätigt [McLaughlin *et al.*, 2010]. Auch wurde bereits gezeigt, dass zur Auslösung einer Immunreaktion mit Hsp70-komplexierten Molekülen bereits wenige hundert Picogramm Peptid ausreichen [Yewdell *et al.*, 1999].

Allerdings konnte bei den im Proliferationsassays eingesetzten Peptidmengen von 0,1 und 1 µg/ml TT₉₄₇₋₉₆₆ in der durchflusszytometrischen Analyse keine oder nur sehr geringfügige Unterschiede ausgemacht werden. Bei einer Menge von 10 µg/ml Peptid hingegen konnte eine deutliche Zunahme der intrazellulären Fluoreszenz detektiert werden. Jedoch zeigte sich auch hier keine gesteigerte Aufnahme der Komplexe. Bei diesen hohen Peptidkonzentrationen zeigt sich in T-Zell-Proliferationsassays aber ebenfalls kein Unterschied zwischen komplexierten und unkomplexierten Peptiden mehr [Haug *et al.*, 2005]. Durch die schlechte Detektion kleiner Peptidmengen im Durchflusszytometer bleibt allerdings unklar, ob es sich bei der gesteigerten Aufnahme von Peptiden allein im Gegensatz zu Hsp70:Peptid-Komplexen um ein Phänomen der größeren Peptidkonzentration handelt und sich kleinen Peptidmengen anders verhalten.

Diskussion

Für rekombinantes Hsp70 wurden Aufnahmeversuche an B-Lymphoblasten und dendritischen Zellen durchgeführt, die allerdings eine erhöhte Aufnahme von komplexierten Peptiden zum Ergebnis hatten. Eine erhöhte Aufnahme komplexierter antigener Peptide zeigten Bendz *et al.* [2007] in dendritischen Zellen nach 60 Minuten, in B-Lymphoblasten wurde dieser Effekt nach 120 Minuten beobachtet. Allerdings unterschieden sich, neben den eingesetzten Zellen, auch die Konzentrationen von Peptid und Hsp70 zu den hier gezeigten Versuchen. So wurden 10 μM Peptide und 3 μM Hsp70 eingesetzt, (Verhältnis 3 : 1) während in der vorliegenden Arbeit umgerechnet 3,3 μM Peptid und 0,014 μM Hsp70 verwendet wurden (Verhältnis 235 : 1). Ein Vergleich beider Studien ist nur dann möglich, wenn identische Konzentrationen angenommen werden. In unserer Arbeitsgruppe wurden Titrationsversuche mit verschiedenen Konzentrationen von Hsp70 durchgeführt, bei denen sich die Menge von 0,014 μM Hsp70 als am besten detektierbar herausstellte (von Manstein, V. persönliche Mitteilung).

Zudem ist ein rekombinant hergestelltes Hsp70, wie von Bendz *et al.* [2007] eingesetzt, meist mit Endotoxinen verunreinigt. Diese wirken, unter anderem, aktivierend auf antigenpräsentierende Zellen. Eine solche Aktivierung kann dann in einer gesteigerten Peptidaufnahme resultieren [Gao & Tsan, 2003]. Bei der Zugabe von Peptid alleine bestand jedoch keine Endotoxinverunreinigung, daher ist die Vergleichbarkeit der beiden Versuchsteile nicht gegeben. Ebenso wenig kann die Studie von Bendz *et al.* [2007] mit den hier dargestellten Ergebnissen verglichen werden. Für die hier gezeigten Aufnahmeassays und die zitierten Proliferationsassays wurde ausschließlich ein Endotoxin-reduziertes Hsp70 verwendet (*human Hsp70, low-endotoxin*, ESP-555, Stressgene). Weiterhin wurden Kontrollen mit unkomplexiertem Hsp70 und Peptid durchgeführt, die zu demselben Ergebnis führten. Ein Endotoxineffekt kann daher ausgeschlossen werden.

Weiterhin wurde schon eine verstärkte Aufnahme von Komplexen nach 25 Minuten beschrieben, allerdings in Makrophagen. Hierzu wurde DnaK oder Hsp70 aus *Mycobacterium tuberculosis* eingesetzt [Tobian *et al.*, 2004]. Fischer

et al. [2010] postulieren, ebenso wie die hier dargestellten Versuche zeigen, eine erhöhte Aufnahme von Hsp70:Peptid-Komplexen nach 3 Stunden Inkubationszeit, die in einer erhöhten T-Zellproliferation resultiert.

Nachdem eine schnellere oder höhere Aufnahme von Hsp70:Peptid-Komplexen aufgrund der bisherigen Versuche unwahrscheinlich ist, liegt die erhöhte T-Zellproliferation vermutlich an einer schnelleren intrazellulären Prozessierung der Hsp70-chaperonierten Peptide und damit einhergehende effizientere Antigenpräsentation. Hierbei könnte eine schnellere Peptidpräsentation stattfinden, die nach bereits 30 Minuten beschrieben wird [Kurotaki *et al.*, 2007]. Eine Bindung von Hsp70 an HLA-DR Moleküle ist bereits gezeigt worden [Haug *et al.*, 2007]. Eine intrazelluläre schnellere Übertragung der Peptide über eine Hsp70 vermittelte MHC-II Bindung könnte so auch zu einer schnelleren und effizienteren Präsentation der Peptide führen.

Die Beladung der MHC-II Moleküle erfolgt in Endosomen mit niedrigem pH. Es konnte gezeigt werden, dass eine Bindung von MHC-II an Hsp70 bei niedrigem pH stabil bleibt, während die Peptidbindung an Hsp70 mit abnehmendem pH geschwächt wird [Haug *et al.*, 2005]. Eine Übertragung wäre somit bevorteilt. Gestützt wird diese These von der Chaperonfunktion des Hsp70, das ein gebundenes Peptid vor endolytischem Abbau schützt. Eine Übertragung auf MHC-II ist bei einem chaperonierten Peptid wahrscheinlicher, als bei einem unchaperonierten Peptid, das durch niedrigen pH und Proteasen eher abgebaut werden kann.

6.3 GESCHWINDIGKEIT DER AUFNAHME UND LOKALISATION VON PEPTIDEN

Da die durchflusszytometrischen Analysen kein eindeutiges Ergebnis liefern konnten, wurde versucht eine Aufnahme der Peptide mittels konfokaler Laser-Scanning Mikroskopie zu visualisieren. Die Peptidaufnahme von 10 µg/ml TT₉₄₇₋₉₆₆-FITC wurde in Abständen von 30 Sekunden über 60 Minuten dokumentiert. Es konnte dargestellt werden, dass eine Aufnahme zu jedem Zeitpunkt stattfindet und innerhalb kurzer Zeit gesättigt ist.

Allerdings ist bei dieser Aufnahme keine Aussage möglich, ob die Fluoreszenz intra- oder extrazellulär ist. Hierzu wurde die FITC-Fluoreszenz mit der Durchlichtaufnahmen nach 3 Stunden Aufnahme überlagert. Hierbei ist der größte Anteil der FITC-markierten Peptide intrazellulär zu finden. Eine extrazellulär präsentierte Fluoreszenz konnte nicht dargestellt werden. Es ist allerdings unklar, ob dies daher rührt, dass die FITC-Markierung vor der Präsentation der Peptide auf der Oberfläche abgespalten wird und intrazellulär verbleibt, oder ob die Peptide zum Zeitpunkt der Aufnahme noch gar nicht auf der Oberfläche angekommen sind. Eine intrazelluläre Lokalisation der Peptide mit Hilfe verschiedener intrazellulärer Marker sollte näheren Einblick verschaffen.

In weiteren Experimenten mit konfokaler Mikroskopie ist bei der Überlagerung der Kernfärbung (DAPI), mit APC-markiertem anti-CD14 Antikörper und TT₉₄₇₋₉₆₆-FITC inkubierten Monozyten zu sehen, dass sich sowohl intra- als auch extrazellulär TT₉₄₇₋₉₆₆-FITC-Peptide befinden. Die intrazelluläre Lokalisation sollte nun mittels eines weiteren Markers untersucht werden. Die Peptide werden nach 3 Stunden Aufnahme in so genannten späten Endosomen vermutet; Endosomen, die noch nicht mit Lysosomen verschmolzen sind. Erst nach der Verschmelzung zu Endolysosomen werden Proteine oder Peptide proteolytisch zerlegt um auf MHC-II Moleküle geladen und präsentiert werden zu können. Ausgehend von der aufgestellten Hypothese war zu erwarten, dass sich komplexierte Peptide in späten Endosomen nachweisen lassen. Im Gegensatz dazu konnten

Hsp90:Peptid Komplexe bereits in frühen Endosomen gefunden werden (Kurotaki *et al* 2007).

Ein Marker für späte Endosomen ist das Oberflächenantigen CD63, das mittels PE-markiertem Antikörper zur Kolokalisation eingesetzt wurde [Fiola *et al.*, 2010]. Wie erwartet zeigte sich in der Überlagerung der Aufnahme der FITC-Markierung des Peptids und der PE-Markierung von anti-CD63 Antikörper eine Kolokalisation von Peptiden und spätem Endosom. Eine Kolokalisation von HLA-DR mit FITC-markierten Peptiden gibt einen endgültigen Aufschluss über die extrazelluläre Präsentation der FITC-Moleküle und so eine Interpretation der zuvor durchgeführten durchflusszytometrischen Analysen bestätigen. Allerdings war bisher nur eine extrazelluläre Färbung der HLA-DR Moleküle erfolgreich. Eine intrazelluläre Lokalisation muss noch etabliert werden.

Da die konfokalmikroskopischen Versuche bisher nur mit Peptiden erfolgten, ist ein Vergleich mit Hsp70-komplexierten Peptiden noch nicht möglich. Hierbei ist es besonders interessant die Verweildauer der Komplexe in späten Endosomen zu untersuchen, um auch die durchflusszytometrischen Analysen richtig interpretieren zu können. Die Theorie der schnelleren Peptidübertragung nach Chaperonierung wäre wahrscheinlich, wenn die Komplexe schneller durch den endosomalen Weg transportiert werden.

Die Interaktion von Hsp70:Peptid-Komplexen oder Peptiden sollte weiterhin auch an CD91-defizienten Monozyten untersucht werden, um die Rolle des von Fischer *et al.* [2010] postulierten Rezeptors zu bestätigen. Die bereits begonnen Untersuchungen mittels konfokaler Mikroskopie über die Zeit könnten, nach Etablierung, auch mit zwei verschiedenen Markern, beispielsweise mit Alexa Fluor 488 oder das bereits angewendete FITC (grüne Emission) für Peptide und Alexa Fluor 568 (rote Emission) für Hsp70, fortgeführt werden. Der Zeitpunkt der Trennung des Komplexes ist so sichtbar zu machen, sobald zwei Fluoreszenzen erscheinen, statt einer sich überlagernden Doppelfluoreszenz. Eine effektivere Fluoreszenz löst auch das Problem der schlechten Detektion kleiner Mengen FITC-markierter Peptide.

Diskussion

Da die bisherigen Versuche nicht das erhoffte eindeutige Ergebnis lieferten, wurde, anstatt der Aufnahme in die Zellen, die intrazelluläre Bindung von Hsp70 an MHC-II mit Hilfe von Bindungsassays genauer untersucht. Insbesondere wurden dabei die biochemischen und strukturellen Eigenschaften von Hsp70 analysiert.

6.4 OPTIMIERUNG DER DELFIA BINDUNGSASSAYS

In der Arbeitsgruppe lag ein Protokoll für DELFIA-Bindungsassays vor, das für den Gebrauch mit kommerziell hergestellten Proteinen etabliert war. Im Zuge der Umstellung auf die Aufreinigung von Proteinen aus Bakterien, damit einhergehenden schwankenden Reinheiten und der durch Biotin-Markierung womöglich geringeren Fluoreszenzkraft, sollte das Protokoll für geringere Hintergrundwerte etabliert werden [De Silva *et al.*, 2010].

Die Hintergrundbindung der eingesetzten Biotin-markierten Peptide wurde titriert. Hier zeigte sich die geringste Hintergrundbindung bei TT₉₄₇₋₉₆₆ und CLIP₁₀₅₋₁₁₇ für 5 µg/ml. Für 20 und 25 µg/ml lag sie bei CLIP₁₀₅₋₁₁₇ jeweils geringfügig höher, aber immer noch unterhalb des signifikanten Bereichs. Die Höhe der Hintergrundbindung von HA₃₀₇₋₃₁₉ schwankte zwischen 20 und 25 µg/ml entgegen der eingesetzten Menge. So war der Hintergrund für 20 µg/ml HA₃₀₇₋₃₁₉ höher als der von 25 µg/ml, wenngleich auch nicht im signifikanten Bereich. Eine mögliche Erklärung ist, dass die Bindung der Peptide ab einer Konzentration von 20 µg/ml bereits gesättigt ist und eine höhere Konzentration zur gegenseitigen Blockierung führt. Der Hintergrund von 5 µg/ml HA₃₀₇₋₃₁₉ lag aber ungefähr im Bereich des Hintergrundes von 5 µg/ml TT₉₄₇₋₉₆₆ und CLIP₁₀₅₋₁₁₇, daher wurde diese Menge folgend in DELFIA Assays eingesetzt.

Die Bindung der Hitzeschockproteine wurde gleichermaßen titriert, da sich aber zwischen 5 µg/ml und 20 µg/ml keine Unterschiede zeigten, wurde, entgegen des Standardprotokolls von 10 µg/ml, und aufgrund der geringen vorhandenen Proteinmenge, immer eine Konzentration von 5 µg/ml eingesetzt.

Außerdem wurde eine Methode zur besseren Blockierung von ungesättigten Bindestellen gesucht. Dazu wurde untersucht, ob die vorherige Bindung eines spezifischen Antikörpers oder die direkte Bindung der Proteine auf die Oberfläche der Vertiefungen einer Mikrotiterplatte Einfluss auf den Hintergrund hat. Zusätzlich zu verschiedenen Konzentrationen BSA (3 % BSA entsprachen dem

Standardprotokoll) wurde hier auch eine kommerzielle Blockierlösung (Roti-Block[®]), die für die Blockierung von Western Blots entwickelt wurde, getestet.

Die Blockierung mit 5 % BSA zeigte sich in Versuchen mit BSA als die am besten geeignete. Hierbei waren die Hintergrundwerte von unkomplexierten Peptiden, die als Kontrolle eingesetzt wurden, am niedrigsten. Bei höheren BSA-Konzentrationen sanken die Werte der Bindung ebenfalls, was darauf hindeutet, dass die Blockierung auch unspezifisch die Bindung an Antikörper blockierte. Steere *et al.* zeigen in Bindungsassays mit HLA-DRB*0101 und *0401 ähnliche Hintergrundwerte und positive Messwerte bei der Verwendung von 5 % BSA [Steere *et al.*, 2003].

Die Ergebnisse bei der Etablierung der Blockierung waren insofern unerwartet, als dass eine Blockierung mit Roti-block[®] und 5 % BSA bei der vorherigen Plattenbindung eines anti-Hsp70 Antikörpers die gleiche unspezifische Bindung von Biotin-markiertem TT₉₄₇₋₉₆₆ zeigte. Bei der Blockierung ohne vorherige Zugabe von anti-Hsp70 Antikörper hingegen zeigte sich bei Roti-block[®] eine unspezifische Bindung von TT₉₄₇₋₉₆₆, die eine Hintergrundbindung an 5 % BSA um ein vielfaches übertraf und im Bereich einer hohen Bindungsstärke lag. Roti-Block[®] ist laut Hersteller mit Western Blot, ELISA-ähnlichen Sandwich-Assays und Chemilumineszenz kompatibel, ist aber für den Einsatz in einem DELFIA ohne Antikörperbindung nach den gezeigten Ergebnissen vollkommen ungeeignet.

6.5 OPTIMIERUNG DER DNA-STRUKTUR VON HSP70

Die Mitglieder der HSP70 Familie bestehen aus einer N-terminalen ATPase Einheit von 45 kDa und einer C-terminalen Substratbindedomäne von 25 kDa, die weiterhin unterteilt wird in eine β -Sandwich Untereinheit von 15 kDa und eine C-terminale α -helikale Unterdomäne. Die ATPase Untereinheit und Substratbindedomäne sind über ein kurzes α -helikales Element verknüpft [Rojas *et al.*, 2005]. Die C-terminale Subdomäne bildet einen Deckel, der die Peptidbindestelle ATP-abhängig bedeckt oder freigibt. [Jiang *et al.*, 2005, Jiang *et al.*, 2006, Mayer *et al.*, 2000, Rüdiger *et al.*, 2000, Zhu, X. *et al.*, 1996]. Der Substrataustausch an der Substratbindestelle der β -Sandwichuntereinheit ist hierbei, je nach Stellung der α -helikalen Untereinheit der Substratbindedomäne, erleichtert oder behindert.

Die klare Unterteilung in 3 Subdomänen wurde ausgenutzt, um jeweils 2 der 3 Domänen, die ATP-Bindedomäne und Substratbindedomäne (AS) bzw. Substratbindedomäne und C-Terminus (SC), aus humaner DNA zu amplifizieren und in Bakterien zu exprimieren, wie es bereits von Zimmer *et al.* [2001] durchgeführt wurde. Durch die enge Verknüpfung von ATP-Bindedomäne und Substratbindedomäne erwies sich die native Expression des SC-Fragments allerdings als äußerst schwierig. Selbst Bindungsassays, die am selben Tag noch durchgeführt wurden, zeigen keinerlei Proteinaktivität. Allerdings sind auch bisher keine erfolgreichen nativen Aufreinigungen einer solchen Domäne bekannt. Eine ATPase Domäne war bisher von bovinem Hsc70 kommerziell erhältlich (Stressgene). Die Herstellung wurde aber eingestellt. Eine humanes Hsp70 SC-Fragment, sowie ein AS-Fragment und eine eigenständige ATPase Domäne alleine sind von Zimmer *et al.* [2001] neben einem Gesamtlängeprotein von Hsp70 erfolgreich aufgereinigt worden, allerdings nur in denaturierter Form. Diese Proteine wurden nicht in Peptidbindungsassays eingesetzt, sondern sind hinsichtlich ihrer mRNA-Bindung untersucht worden.

Da für den Western Blot keine geeigneten Kontrollen vorhanden waren, wurde die Proteingröße mit Hilfe eines online zugänglichen Programms berechnet (http://web.expasy.org/compute_pi/). Eine Berechnung kann allerdings nur eine ungefähre Größe darstellen, die als Richtwert für die Laufröhre im SDS-Gel herangezogen wurde. Zimmer *et al.* zeigen für ihre Aufreinigung der Fragmente in einem Western Blot Banden nahe der errechneten Größe (60 und 29 kDa). Die Laufröhre im hier gezeigten SDS-Gel und Western Blot sind bei dem AS-Fragment um 4 kDa zu klein, beim SC-Fragment um 7 kDa zu groß. Im Western Blot fand sich in der Spur des SC-Fragments ebenfalls eine zweite, etwas schwächere Bande bei etwa 25 kDa. Der Vergleich mit dem Coomassiegefärbten SDS-Gel macht aber deutlich, dass es sich bei der dickeren, höheren Bande um das gesuchte aufgereinigte Protein handeln muss. Bei der kleineren Bande handelt es sich höchstwahrscheinlich um Degradationsprodukte, wie sie auch im SDS-Gel schon geringfügig zu erkennen sind. Eine vorzeitige Degradation würde auch die nicht vorhandene Bindungsaktivität erklären. Da Zimmer *et al.* denaturierte Proteine aufgereinigt und in ihren Versuchen eingesetzt haben, ist ein Vergleich der Nativität und Bindungseigenschaften nicht möglich [Zimmer & Henics, 2002].

Bei Aufreinigung des Gesamtlänge-Proteins konnte eine konstante Reinheit und Konzentration um 1 mg/ml erreicht werden. Eine Bindung von Hsc70 (*heat shock cognate protein*) an verschiedene HLA-DR Moleküle findet statt [Haug *et al.*, 2005], die Bindung des exprimierten Hsp70 an HLA-DR konnte hier ebenfalls bewiesen werden. Auch die Bindungsexperimente mit CLIP¹⁰⁵⁻¹¹⁷ konnten bestätigt werden [Haug *et al.*, 2007]. Allerdings zeigte auch dieses Protein nach 3 Tagen bereits kleine Niederschläge in der Lösung und verlor die Bindungsaktivität. Eine Woche nach Aufreinigung war keine Aktivität mehr nachweisbar.

Die von vorneherein geringe Expression der Fragmente lässt darauf schließen, dass bereits auf mRNA Ebene eine Degradation erfolgt, beispielsweise durch zu geringe Translation oder die Ausbildung von Sekundärstrukturen, die zum Abbau der mRNA führt. Translationsfehler können die Proteinstruktur zusätzlich

destabilisieren oder eine korrekte Faltung verhindern, so dass ein Proteinkomplex gar nicht erst ausgebildet werden kann und degradiert wird. Abhilfe schaffte eine synthetisierte DNA in einem eigens optimierten Expressionsvektor. In anderen Studien, die Hsp70 und deren Fragmente erfolgreich aufreinigen konnten, finden sich keine Angaben zur Proteinausbeute, der Vergleich mit den hier gezeigten bisherigen Aufreinigungsversuchen aus humaner DNA zeigt aber eine deutliche Verbesserung der Proteinausbeute durch die Verwendung der optimierten DNA.

Diese kommerziell erworbene DNA Struktur wurde mit Hilfe einer Optimierungssoftware (GeneOptimizer[®]) verfeinert, bei der die relevantesten Fehlerquellen für geringe Proteinexpression auf DNA-Ebene ausgeschlossen werden. Erwartungsgemäß zeigte sich, nach erfolgreicher Klonierung des optimierten Vektors in *E. coli*, eine hohe Expression des Wildtyp Hsp70. Die optimierte Sequenz war auch Grundlage für die Verkürzungsmutation AS und für Punktmutationen in der Substratbindestelle. Auf eine weitere Klonierung des SC Fragmentes wurde verzichtet, da eine native Aufreinigung ohne ATP-Bindedomäne bisher nicht gezeigt werden konnte.

Wiederum zeigt sich, dass das AS-Fragment mit einer Laufrhöhe von 55kDa kleiner ist als die berechnete Größe von 59 kDa. Da dieses Protein allerdings eine weitaus längere Aktivität in Bindungsassays zeigt und erst nach über 3 Wochen die ersten Degradationserscheinungen auftraten, kann hier davon ausgegangen werden, dass es sich um die tatsächliche Größe des Proteins und nicht um ein Degradationsprodukt handelt. Das Protein von Zimmer *et al.* zeigte die berechnete Größe von 60 kDa im Western Blot, allerdings wurden hierbei C- und N-terminale Histidin-Tags mittels Primern eingefügt, die zumindest einen kleinen Effekt auf die Größe des Proteins haben. Da die DNA-Sequenz des aufgereinigten Proteins durch Sequenzierung als fehlerfrei analysiert wurde, handelt es sich vermutlich nur um ein Artefakt, herrührend aus der Verwendung unterschiedlicher SDS-Gele. Zimmer *et al.* verwendet 10 % kontinuierliche SDS-Gele während in der vorliegenden Arbeit ausschließlich 4-20 % Gradientengele verwendet wurden [Zimmer & Henics, 2002].

Die Codons GCA (Alanin405) und GTT (Valin 436) wurden durch Ersatz mit den Triplets GGA (A405G) bzw. GGC (V437G) zu Glycin mutiert. Rüdiger *et al.* [2000] und Mayer *et al.* [2000] hatten diese Aminosäuren im DnaK als bindungsrelevant gezeigt. Die punktmutierten Proteine A405G und V437G laufen erwartungsgemäß auf der gleichen Höhe wie Hsp70. Zwar ist die Aminosäure Glycin um einiges kleiner als Alanin oder Valin, bei der Größe des Proteins von 641 AS und einer Lauflänge im SDS-Gel von wenigen Zentimetern fällt dies aber, im wahrsten Sinne des Wortes, nicht ins Gewicht. Rüdiger *et al.* und Mayer *et al.* zeigen bei ihren Aufreinigungen keine vergleichenden SDS-PAGE oder Western Blot Aufnahmen mit dem wildtypischen DnaK, so dass man davon ausgehen kann, dass eine einzelne Punktmutation in einem 72 kDa großen Protein keine großen Auswirkungen auf die Laufhöhe hat.

Durch bakterielle Expression kann es bei bestimmten Basentriplets auch zum Einbau anderer Aminosäuren kommen, so dass eine korrekte Faltung verhindert wird und die Proteine ausfallen. Beispielsweise wird das mRNA Triplet UAG nicht als Stopp-Codon behandelt, sondern baut die Aminosäure Selenocystein ein. Ebenso wird bei UAG das Stopp-Codon überlesen und stattdessen Pyrrolysin eingebaut. Andere Basentriplets in der mRNA (GUG und UUG) sind bei bakterieller Expression auch Start-Codons. Ein falsches Start-Codon führt zur Translation eines zu kurzen Proteins, so dass eine korrekte Faltung und Proteinaktivität nicht gewährleistet ist. Zusätzlich kann das Leseraster verschoben werden und so ein Nonsens-Protein translatiert werden. Dieses wäre allerdings von einem Antikörper nicht mehr zu detektieren und aufgrund der mangelnden Histidin-Markierung auch nicht in der Aufreinigung vorhanden. Die zweite Bande im Western Blot von SC könnte also auch das Produkt einer vom falschen Basentriplet aus gestarteten Translation im richtigen Leseraster sein. Im SDS-Gel ist auf dieser Größe allerdings keine Bande sichtbar, die diesen Verdacht bestätigen könnte.

6.6 DIE PUNKTMUTATION A405G ZEIGT REDUZIERTE SUBSTRATBINDUNG

Wie bereits erwähnt sind die für die Substratbindung verantwortlichen Aminosäuren im bakteriellen Hitzeschockprotein DnaK bereits charakterisiert. Es handelt sich um Methionin 404 und Alanin 429. Diese interagieren miteinander und bilden so eine Brücke, unter der das Substrat fest gebunden wird [Zhu, X. *et al.*, 1996].

Diese Aminosäuren im humanen Homolog Hsp70 zu identifizieren und zu mutieren, sollte Einblicke in die Bindungseigenschaften von Hsp70 geben. Mit Hilfe von Sequenzvergleichen der Substratbindedomänen beider Proteine gelang es, die verantwortlichen Aminosäuren zu finden. Dazu wurden auch die umliegenden Aminosäuren verglichen. Somit konnten die Aminosäuren Alanin 405 und Tyrosin 430 als bindungsgebende Aminosäuren in bovinem Hsp70 identifiziert werden [Zhu, X. *et al.*, 1996]. Sequenzvergleiche zwischen DnaK, bovinem und humanem Hsp70 zeigten, dass es sich im humanen Hsp70 ebenfalls um die Aminosäuren Alanin 405 und Tyrosin 430 handelt. Die hydrophobe, substratbindende Brückenstruktur bleibt erhalten, obwohl mit einer OH-Gruppe am Tyrosin 430 eine andere aktive Gruppe vorhanden ist als mit der Methyl-Gruppe von Methionin 404. Dass diese beiden Aminosäuren sich als die für die Bindung Verantwortlichen herausstellten, ist umso erstaunlicher, als dass sie nicht hoch konserviert sind. Strukturvergleiche mit anderen HSP70 Molekülen zeigten verschiedenste Kombinationen, wie Valin-Alanin, Leucin-Alanin, Threonin-Alanin oder Glutamin-Cystein. Allen Kombinationen liegt jedoch ein hydrophober Charakter der ausgebildeten Brücke zugrunde [Zhu, X. *et al.*, 1996].

Der hydrophobe Charakter der Brücke sollte durch zielgerichtete Mutagenese einer der beiden Bindungspartner zu einer hydrophilen Aminosäure verändert werden. In den meisten der oben aufgeführten Kombinationen war Alanin einer der beiden Bindungspartner. Daher wurde Alanin 405 mittels zielgerichteter Mutation durch Glycin ersetzt. Die aktive, hydrophobe Methylgruppe wird so

durch ein Wasserstoffatom ausgetauscht. Die hydrophobe Gruppe von Tyrosin 430 bleibt allerdings erhalten.

In DELFIA-Bindungsassays eingesetzt, zeigte sich eine nicht nur leicht reduzierte Bindung für alle eingesetzten Peptide TT₉₄₇₋₉₆₆, HA₃₀₇₋₃₁₉ und CLIP₁₀₅₋₁₁₇. Im Vergleich zur Bindung an das Wildtyp Hsp70 aus derselben Aufreinigung war die Bindung in allen Fällen signifikant reduziert. Zwischen den verschiedenen Peptiden gibt es nur geringfügig unterschiedliche Bindungen, die sich so aber auch in ihrer Bindung an Hsp70 widerspiegeln. Studien von Rüdiger *et al.* [2000] und Mayer *et al.* [2000] die vergleichbare Mutationen in der Substratbindestelle von DnaK durchführten (M404A, A429W und V436F) zeigte ein anderes Muster der Substratreduktionen. Hier wurde keine reduzierte Bindung für die Mutation M404A (vergleichbar mit A405G) festgestellt. Allerdings tauschten sie Methionin gegen Alanin aus, eine ebenfalls hydrophobe, wenn auch kleinere Aminosäure aus, sodass der hydrophobe Charakter der Bindestelle erhalten blieb.

Es zeigt sich, dass der Ersatz der Methylgruppe von Alanin durch eine hydrophile Gruppe hinreichend ist, die Brückenbildung zu Tyrosin, unabhängig vom Substrat, zu verhindern. Dadurch wird das Substrat nicht mehr fest gebunden. Dies war die Voraussetzung für Bindungsstudien mit HLA-DR-Molekülen. Eine Mutation des Bindungspartners von Alanin 405, Tyrosin 430 in eine hydrophile Aminosäure, sollte, sofern sich Tyrosin nicht noch zusätzlich auf die Stabilität des Proteins auswirkt, zum gleichen Ergebnis führen. Rüdiger *et al.* [2000] und Mayer *et al.* [2000] konnten allerdings zeigen, dass, im Gegensatz zur Mutation M404A, eine Mutation von Alanin 429 in Tryptophan sowie die Doppelmutation M404A und A429W eine reduzierte Substratbindung zur Folge haben. Es liegt auch hier beiden Mutationen weiterhin ein hydrophober Charakter zu Grunde, so daß sich die Ausbildung einer Brücke oder Verhinderung einer Bindung nicht ausschließlich auf die Hydrophobizität der Aminosäuren beziehen kann.

6.7 VALIN 437 IST KEINE FÜR DIE SUBSTRATBINDUNG RELEVANTE AMINOSÄURE

Im DnaK wurde eine Punktmutation von Valin 436 zu Phenylalanin durchgeführt. Phenylalanin sollte durch seine Größe die Bindungstasche so blockieren, dass eine Substratbindung unspezifisch reduziert werden sollte. Valin 436 wurde deswegen ausgewählt, da dessen aktive Gruppe als einzige direkt in die Substratbindestelle zeigt. Sie ist daher prädestiniert als möglicher Substratbinder [Mayer *et al.*, 2000, Rüdiger *et al.*, 2000]. Valin 436 ist hochkonserviert in allen Hsp70 Proteinen von bakteriellen DnaK über hBip (Hamster), bHsp70 (bovin), mHsp70 (murin) bis hin zum humanen Hsp70 (hier als Valin 437), um nur einige zu nennen [Zhu, X. *et al.*, 1996]. Diese hohe Konservierung im Vergleich zu den für die Substratbindung hochverantwortlichen aber variablen Aminosäuren 405 und 430 spricht für eine entscheidende Rolle in der Substratbindung oder der Stabilität des Proteins. Dass eine Mutation zu Phenylalanin allerdings die Substratbindestelle nicht entscheiden blockiert, wurde bereits gezeigt [Rüdiger *et al.*, 2000]. Die Homologie in der Substratbindestelle lässt vermuten, dass dies im humanen Hsp70 auch der Fall sein dürfte. Die Frage bleibt dennoch, ob Valin 437 an der Substratbindung aktiv beteiligt ist. Daher erfolgte eine zielgerichtete Mutation zu Glycin. Die aktive Gruppe wird hier wieder durch ein einfaches Wasserstoffatom ersetzt und so als Bindungspartner ausgeschlossen.

Bei einer Beteiligung an der Substratbindung sollte daraufhin eine Bindung der Peptide HA₃₀₇₋₃₁₉ und CLIP₁₀₅₋₁₁₇ verhindert werden. Überraschenderweise aber hatte auch diese Mutation keinen Einfluss. Eine Bindung von Clip₁₀₅₋₁₁₇ an V437G scheint zwar auf den ersten Blick reduziert zu sein, jedoch liegt diese Reduktion nicht im signifikanten Bereich. Auch ist keine erhöhte Bindung erkennbar, die darauf rückschließen lässt, dass eine Mutation zu einer kleineren Aminosäure mehr Platz für ein Substrat lässt und somit leichteren Zugang zur Substratbindestelle ermöglicht. Die oben genannten Studien von Rüdiger *et al.* [2000] und Mayer *et al.* [2000] zeigten ebenfalls keine reduzierte Substratbindung für das mutierte DnaK-V436F. Hierbei ist allerdings zu beachten, dass

Diskussion

Phenylalanin aufgrund der Größe die Substratbindung reduzieren sollte, nicht durch die ausgetauschte aktive Gruppe.

Somit scheidet Valin 437 als Bindungspartner für Substrate aus. Seine Wichtigkeit und der Grund für die hohe Konservierung liegen eher in der Stabilisierung des Gesamtproteins. Eine Deletion von Valin 437 kann darüber Aufschluss geben. Weiterhin wurden Bindungsstudien mit HLA-DRB1*0401 durchgeführt um eine mögliche Bindung des HLA-DR an Valin 437 zu zeigen oder auszuschließen.

6.8 DAS C-TERMINAL VERKÜRZTE AS-FRAGMENT VON HSP70 KANN WEITERHIN PEPTIDE BINDEN

Die klare Unterteilung von Hsp70 in 3 Domänen auf DNA-Ebene sollte ausgenutzt werden, um gezielt eine Domäne zu deletieren. Da aber die ATP-Bindedomäne und Substratbindedomäne in der Proteinstruktur eng miteinander verknüpft sind, gelang eine getrennte Aufreinigung dieser beiden Domänen nicht. Eine Aufreinigung wurde versucht, misslang aber (siehe Kapitel 6.5). Auch kommerziell ist ein humanes Hsp70 ATPase-Fragment nicht erhältlich. Es gelang aber die Deletion des C-terminalen Deckels (AS-Fragment), der sich ATP-abhängig über die Substratbindedomäne legt, wie sie bereits sowohl für Hsp70 [Zimmer *et al.*, 2001] als auch schon für Hsc70 und DnaK beschrieben wurde [Flaherty *et al.*, 1990, Mayer *et al.*, 2000, Rüdiger *et al.*, 2000, Zhu, X. *et al.*, 1996]. Daher wurde nur eine C-terminale Deletion der Aminosäuren 544–641 durchgeführt. Dies entspricht der C-terminalen, α -helikalen Deckelstruktur, die sich bei ATP-Bindung über die Substratbindestelle schließt.

Es konnte bereits gezeigt werden, dass eine Deletion des C-terminalen Deckels keine veränderte Substratbindung zur Folge hat [Rüdiger *et al.*, 2000]. Demzufolge war auch keine reduzierte Substratbindung für das AS-Fragment von Hsp70 zu erwarten. Entsprechend fielen die Bindungsexperimente mit HA₃₀₇₋₃₁₉ und CLIP₁₀₅₋₁₁₇ aus (siehe Abbildung 5-23). Es konnte dennoch eine höhere Bindung für AS festgestellt werden, die aber keinen signifikanten Unterschied darstellte. Das C-terminal verkürzte Protein wiegt etwa 21 % weniger als das Wildtypprotein, je nachdem ob man die berechnete oder die im SDS-Gel angezeigte Größe zur Grundlage nimmt. Da alle Proteine in $\mu\text{g/ml}$ eingesetzt wurden, ergeben sich so unterschiedliche molare Stoffmengen. Geht man von den berechneten 59 kDa aus, so ergibt sich bei den eingesetzten 5 $\mu\text{g/ml}$ eine molare Stoffmenge von 0,085 nmol. Bei 55 kDa, wie im SDS-Gel abgelesen, wären es 0,091 nmol. Hsp70 hingegen hat so eine molare Stoffmenge von 0,069 nmol. Es wurden also zwischen 19 % und 24 % zu viele Moleküle AS eingesetzt. Bei einer 24 %igen Reduktion der mittleren Bindung von Biotin-

Diskussion

markiertem HA₃₀₇₋₃₁₉ entspricht diese der Bindung von Hsp70 und V437G. Bei der Bindung von CLIP₁₀₅₋₁₁₇ läge die Bindung entsprechend ungefähr auf Niveau der Bindung von V437G. Ein eindeutiges Ergebnis kann aber nur eine Wiederholung der Assays mit einer reduzierten Menge von AS auf 4,1 µg/ml zeigen. Dies würde dann der korrekten Menge entsprechen, wenn man von der berechneten Größe von 59 kDa ausgeht. Dennoch ist davon auszugehen, dass eine Bindung von Peptiden an AS erfolgt. Eine leichtere Dissoziation von Peptiden aufgrund des mangelnden C-terminalen Deckels, wie sie von unter anderem von Mayer *et al.* [2000] oder Misselwitz *et al.* [1998] beschrieben wurde, konnte nicht beobachtet werden. Zwar wurde eine fehlende Rückfaltungsaktivität für eine vergleichbare DnaK-Mutante beschrieben, allerdings keine veränderte Peptidbindungsaktivität im Vergleich zum Wildtyp, wodurch die hier gezeigten Ergebnisse bestätigt werden [Rüdiger *et al.*, 2000].

6.9 DIE HLA-DR BINDUNG WIRD VON KEINER DER UNTERSUCHTEN MUTATION IM HSP70-PROTEIN BEEINFLUSST

Der Hintergrund von Verkürzungs- und Punktmutanten von Hsp70 war die Identifizierung einer möglichen Bindung bzw. der Bindestelle von Hsp70 an HLA-DR, die zu einer verbesserten intrazellulären Peptidübertragung und MHC-II Beladung führen könnte und so die verstärkte Proliferation von antigenspezifischen T-Zellen erklären kann. Die mutierten Hsp70-Proteine wurden mittels DELFIA Bindungsassays hinsichtlich ihrer Bindung an HLA-DR Moleküle untersucht.

Die Punktmutante V437G und das AS-Fragment zeigten keine reduzierte Peptidbindung im Vergleich zu Hsp70, wohl aber die Punktmutante A405G. Vergleicht man die Bindung von A405G und Hsp70 an HLA-DRB*0401, so lässt sich kein signifikanter Unterschied ausmachen. Verschiedene Assays machten dies deutlich. Die Mutation in der Substratbindestelle hat keinen Einfluss auf eine Bindung an HLA-DR. Eine Studie zeigte bereits, dass endozytierte Peptide von intrazellulärem Hsp70 chaperoniert und auf HLA Moleküle übertragen werden können [Stocki *et al.*, 2011]. Die Abhängigkeit von einer Substratbindung ist hier aber nicht gezeigt worden. Weder die Hsp70 Proteine, noch HLA-DR waren peptidbeladen, dennoch zeigte sich eine eindeutige, signifikante Bindung. Durch die unterbundene Bindung eines Substrates bei A405G kann auch davon ausgegangen werden, dass die Interaktion zwischen HLA-DR und Hsp70 unabhängig von der Substratbindung ist.

Die Proteine V437G und das C-terminal verkürzte AS-Fragment wurden ebenfalls hinsichtlich ihrer HLA-DR Bindung untersucht. Beide zeigten keine signifikant reduzierte Bindung eines Substrates. Somit können die Aminosäure Alanin 405 und Valin 437 aus der Substratbindedomäne als mögliche Bindungspartner von HLA-DR ausgeschlossen werden. Der C-terminale Deckel über der Substratbindestelle ist ebenfalls nicht die Bindestelle für HLA-DR. Zwar wird der C-Terminus als möglicher Bindungspartner für die rezeptorvermittelte

Internalisierung diskutiert [Zitzler *et al.*, 2008], für die intrazelluläre HLA-DR Bindung ist er allerdings nicht verantwortlich

HA₃₀₇₋₃₁₉ sollte als positive Kontrolle für die Aktivität des HLA-DRB1*0401 dienen, in dessen Bindungsgrube es *in vivo* präsentiert werden kann [Valli *et al.*, 1993]. Allerdings zeigte sich, dass HA₃₀₇₋₃₁₉ bei vorheriger anti-HLA-DR-Antikörperbindung (L-243) nicht ausreichend an HLA-DR bindet. Die Bindung von HA₃₀₇₋₃₁₉ an HLA-DR übersteigt die Hintergrundwerte von HLA-DR nicht. Dies kann damit erklärt werden, dass der anti-HLA-DR-Antikörpers L-243 ein komplexes Epitop aus α - und β - Kette erkennt. Er erkennt somit nur ein intaktes HLA-DR-Molekül und erlaubt während dieser Bindung keinen Austausch eines Peptids. Bei einer Bindung von L-243 kommt es zu einer Blockierung der Beladung des MHCs. L-243 blockiert vermutlich die Bindestelle des HLA-DR derart, dass Peptide, in diesem Fall HA₃₀₇₋₃₁₉, nicht mehr binden können. Dies konnte mittlerweile mit Peptidassays ebenfalls gezeigt werden [Kalbacher, H., persönliche Mitteilung]. Auch die Blockierung der Peptidbindestelle von HLA-DR durch den Antikörper L-243 und dennoch erfolgreiche Bindung von Hsp70 und A405G spricht für eine substratunabhängige Bindung.

Da sowohl die Substratbindestelle und der C-Terminus ausscheiden, als auch die Bindung als substratunabhängig bewiesen wurde, bleibt als Bindestelle an HLA-DR nur noch die Region der ATP-Bindedomäne. Ein isoliertes ATPase-Domänen Fragment von Hsp70 wurde bereits als möglicher Bindungspartner an der Oberfläche von Makrophagen diskutiert, ohne allerdings näher auf einen Rezeptor einzugehen [Zitzler *et al.*, 2008]. Eine ATPase-Domänen vermittelte Bindung an HLA-DR scheint daher wahrscheinlich. Auch am bovinen Hsc70 wurde dies bereits gezeigt. Ein kommerziell hergestelltes Fragment von bovinem Hsc70, laut Angaben der Hersteller (Stressgene) nur bestehend aus einer intakten ATPase-Domäne, wurde mit Hsp70 und Hsc70 in DELFIA-Bindungsassays mit HLA-DR eingesetzt [Haug, M. persönliche Mitteilung].

Dabei zeigte sich ein eindeutiges Bindungsmuster von HLA-DR an Hsp70, Hsc70 und das Hsc70-ATPase-Fragment, das sich signifikant von der negativen Kontrolle sowie dem Hintergrund unterschied. Eine Bindung der ATPase-Domäne

Diskussion

des bovinen Hcs70 konnte somit bewiesen werden. Die 99 %ige Homologie zwischen humanem und bovinem Hsc70 lässt darauf schließen, dass im humanen Protein ebenfalls die ATPase-Domäne der Bindungspartner für HLA-DR ist. Um die ATP-Bindedomäne eindeutig als Bindestelle an HLA-DR zu beweisen sollten Experimente mit einem isolierten humanen Hsp70-ATPase Fragment durchgeführt werden. Ein solches ist aber leider weder kommerziell erhältlich, noch bisher korrekt gefaltet nativ aufzureinigen. Bisherige Studien haben lediglich denaturiertes Hsp70-ATPase Fragment aufgereinigt und eingesetzt [Zimmer *et al.*, 2001]. Eine Möglichkeit bestünde in der Aufteilung der ATP-Bindedomäne in kurze Peptidfragmente. Eingesetzt in HLA-DR Bindungsassays mit blockierter HLA-Bindegrube könnte so eventuell ein Bindungsmotiv gefunden werden. Auch Punktmutationen in der ATP-Bindedomäne oder sukzessive N-terminale Verkürzungen können in weiteren Studien Einblick in die involvierten Strukturen bringen.

6.10 WEITERFÜHRENDE UNTERSUCHUNGEN UND AUSBLICK

Die in dieser Arbeit gezeigten Daten weisen auf eine Interaktion zwischen HLA-DR und Hsp70 hin, die von der Substratbindung unabhängig ist. Der Ort der Interaktion konnte auf die ATP-Bindedomäne von Hsp70 eingeschränkt werden. Eine Interaktion mit dem C-terminalen Deckel oder der Substratbindedomäne, in Form einer substratabhängigen oder substratvermittelten Bindung konnte eindeutig ausgeschlossen werden. Die vorliegenden Daten deuten auf folgenden Mechanismus zur verstärkten Proliferation von antigenspezifischen T-Zellen hin:

Nicht eine verstärkte Aufnahme von Hsp70:Peptid-Komplexen, sondern die intrazelluläre Bindung eines Hsp70:Peptid-Komplexes an ein MHC-II und eine damit einhergehende effektivere Übertragung des Peptides in die Bindungsgrube führt zu einer erhöhten und schnelleren Präsentation des Peptides auf der Zelloberfläche.

Zunächst sollten die Bindungsstudien mit A405G im T-Zellproliferationsassay bestätigt werden. Wie bereits gezeigt wurde, steigert eine vorherige Komplexierung von Peptiden mit Hsp70 vor der Zugabe zu antigenpräsentierenden Zellen die Proliferation von zugegebenen T-Zellen [Fischer *et al.*, 2010, Haug *et al.*, 2005]. Zu erwarten wäre beim Einsatz von A405G keine gesteigerte Proliferation, sondern eine Proliferation vergleichbar mit der nach Stimulation mit Peptid alleine. Da das mutierte Protein keine Peptide mehr bindet, wäre die Präsentation von Peptiden auf MHC-II nur die einer normalen Peptidaufnahme. Für eine Stimulation mit V437G oder AS, komplexiert mit antigenspezifischen Peptiden hingegen, sollte die Proliferation der stimulierten T-Zellen der gesteigerten Proliferation wie bei Stimulation mit Hsp70:Peptid-Komplexen entsprechen.

Zu beachten ist bei diesen Experimenten, dass die Proteine in *E. coli* exprimiert wurden. Vor einem Einsatz in T-Zell-Proliferationsassays müssen also diverse Aufreinigungsschritte gegen Endotoxine durchgeführt werden, da diese

aktivierend auf antigenpräsentierende Zellen wirken [Gao & Tsan, 2003]. Eine absolute Endotoxinfreiheit kann jedoch nicht erreicht werden.

Zu überlegen ist die Umklonierung in ein eukaryotisches System und damit eine Endotoxin-freie Aufreinigung. Alternativ kann der Endotoxinlevel mit Hilfe eines LAL-Tests (Limulus-Amöbozytenlysate) bestimmt werden und eine Kontrolle mit zugegebenem Endotoxin der bestimmten Menge durchgeführt werden. Nimmt man die Proliferation der von Endotoxin stimulierten T-Zellen als Nullpunkt an, so können Proliferationswerte, die darüber liegen, dem Vorhandensein der eingesetzten Proteine zugeschrieben werden. Vorversuche hierzu wurden bereits durchgeführt, aufgrund der noch zu hohen Endotoxinkonzentration konnte allerdings nur eine verstärkte Proliferation aufgrund von LPS Verunreinigungen festgestellt werden.

Ebenso ist es möglich, das hier beschriebene bovine Hsc70 ATPase-Fragment einzusetzen. Dieses hat keine substratbindende Eigenschaften mehr, sollte also eine Reaktion entsprechend der Stimulation mit Peptid alleine hervorrufen. Sinnvollerweise sollten dazu aber auch antigenpräsentierende Zellen und T-Lymphozyten aus dem bovinen System verwendet werden, um eventuelle Kreuzreaktionen zu vermeiden. Bovine Zellen lassen sich gleichermaßen mit bovinem Hsp70 stimulieren, wie dies auch im humanen System gezeigt wurde [Haug *et al.*, 2005, McLaughlin *et al.*, 2010].

Eine weitere Möglichkeit die Bindestelle zwischen den beiden Proteinen eindeutig zu identifizieren, besteht in der Ko-Kristallisation von HLA-DR mit gebundenem, peptidbeladenem Hsp70. Sowohl HLA-DR als auch verschiedene Hitzeschockproteine konnten schon kristallisiert werden [Hennecke & Wiley, 2002, Jiang *et al.*, 2006]. Ebenso wurden bereits zwei aneinander gebundene Hitzeschockproteine gemeinsam kristallisiert [Schuermann *et al.*, 2008]. Grundsätzlich sollte dies also möglich sein. Ein Problem besteht allerdings in der Reinheit und Konzentration der aufgereinigten MHC-II Moleküle. Mit maximal 0,3 mg/ml, wie sie bei der Aufreinigung von B-Lymphozyten bisher erreicht wurde, ist die Konzentration für eine alleinige Kristallisation schon nicht ausreichend genug. Die geringe Ausbeute rührt von der eingeschränkten

Bindekapazität der Sephadex-Säulen her, die nur mit einer gewissen Menge an spezifischen Antikörper beladen werden können.

Die erforderliche Reinheit konnte aufgrund der Aufreinigung von B-Zellen ebenfalls nicht erreicht werden. Auch über diverse Aufreinigungs- und Konzentrationsschritte wie Gelfiltration, Dialyse und Ultrafiltration konnte sich den erforderlichen Parametern zwar angenähert werden, aber noch nicht im ausreichenden Maße. Es wurde daher der Versuch gestartet ein MHC-II, HLA-DRB1*0101, rekombinant in Bakterien herzustellen. Ein entsprechendes Plasmid zur Aufreinigung der α -Kette wurde auch hergestellt. Das zugehörige Plasmid mit der β -Kette wurde in Kooperation kloniert. Einzelnen lassen sich die beiden Ketten exprimieren und aufreinigen, eine gemeinsame Expression beider Ketten mit korrekter Faltung hingegen war nicht möglich.

Die einzige Möglichkeit besteht in einer Entfaltung der beiden einzelnen Ketten und einer gemeinschaftlichen Rückfaltung in Anwesenheit von Histidin-markierten CLIP. Ausschließlich korrekt gefaltete Proteine binden das Peptid und können dann über eine Nickel-NTA-Säule von den nicht korrekt gefalteten getrennt werden [Justesen *et al.*, 2009]. Die Praxis zeigt aber, dass somit zwar eine höhere Reinheit, allerdings keine größere Konzentration an Protein gewonnen wird. Die maximale Ausbeute aus einer 2 Liter *E. coli* Kultur beträgt lediglich 300 $\mu\text{g/ml}$ [Buus, S., persönliche Mitteilung]. Sie ist somit zu vergleichen mit der Konzentration der von BLS gereinigten Komplexe. Verunreinigung mit Endotoxinen durch die rekombinante Aufreinigung aus Bakterien stellen hier ebenfalls ein zusätzliches Problem dar, das bei der Kristallisation berücksichtigt werden muss. Auch hier wäre eine Expression im eukaryotischen System empfehlenswert, allerdings ist die Ausbeute hier deutlich geringer als bei einer rekombinanten Aufreinigung aus Bakterien. Für eine Kristallisation kann aber auch eine Reduktion des Endotoxinlevels ausreichend sein, wie sie bereits mit verschiedenen Endotoxinaffinen Säulen durchgeführt wird.

7 ANHANG

7.1 SEQUENZEN

7.1.1 SEQUENZVERGLEICH HUMANES UND BOVINES HSP70A1A

Query Human Hsp70A1A

41182 Bovine Hsp70A1A 100%

Query	1	MAKAAAIGIDLGTTYSCVGVFQHGKVEI IANDQGNRTTPSYVAFTDTERLIGDAAKNQVA	60
41182	1	...NM.....	60
Query	61	LNPQNTVFDKRLIGRKFQDPVVQSDMKHWPQVINDGDKPKVQVSYKGETKAFYPPEEIS	120
41182	61R.....	120
Query	121	SMVLTKMKEIAEAYLGYPVTNAVITVPAYFNDSQRQATKDAGVIAGLNVLRIINEPTAAA	180
41182	121H.....	180
Query	181	IAYGLDRTGKGERNVLI FDLGGGTFDVSILTIDDGIFEVKATAGDTHLGGEDFDNRLVNH	240
41182	181	.T.....	240
Query	241	FVEEFKRKHKKDISQNKRAVRRRLTACERAKRTLSSSTQASLEIDSLFEGIDFYTSITRA	300
41182	241	300
Query	301	RFEELCSDLFRSTLEPVEKALRDAKLDKAQIHDLVLVGGSTRI PKVQKLLQDFFNDRDLN	360
41182	301	360
Query	361	KSINPDEAVAYGAAVQAAILMGDKSENVQDLLLLDVAPLSLGLETAGGVM TALIKRNSTI	420
41182	361	420
41183	361	420
Query	421	PTKQTQIFTTYSDNQPGVLIQVYEGERAMTKDNNLLGRFELSGIPPAPRGVPQIEVTFDI	480
41182	421R.....	480
Query	481	DANGILNVTATDKSTGKANKITITNDKGRLSKEEIERMVQEAKEYKAEDVQRERVS AKN	540
41182	481	540
Query	541	ALESYAFNMKSAVEDEGLKGGKISEADKKKVLDKCQEVI SWLDANTLAEKDEFEHKRKELE	600
41182	541	600
Query	601	QVCNPIISGLYQGAGGPGPGGFGAQGPKGGSGSGPTIEEVD	641
41182	601R.....A.....	641

Anhang

7.1.2 SEQUENZVERGLEICH HUMANES HSP70 UND BAKTERIELLES HSP70 HOMOLOG DnaK

>Query: DnaK

Subject: Human hsp70

Length=640

Score = 551 bits (1419), Expect = 4e-161, Method: Compositional matrix
adjust.

Identities = 311/611 (51%), Positives = 403/611 (66%), Gaps = 27/611 (4%)

```
Query 5 IGIDLGTTNSCVAIMDGTTPRVLENAEGDRTPPSIIAYTQDGETLVGQPAKRQAVTNPQN 64
      IGIDLGTT SCV + ++ N +G+RTTPS +A+T D E L+G AK Q V NPQN
Sbjct 7 IGIDLGTTYSVGVFQHGKVEIIANQGNRTTPSYVAFT-DTERLIGDAAKNQ-VANPQN 64

Query 65 TLFAIKRLIGRRFQDEEVQRDVSIMPFKIIA-ADNGDAWVEVKGQKMA--PPQISAEVLK 121
      T+F KRLIGR+F D VQ D+ PF++I D V KG+ A P +IS+ VL
Sbjct 65 TVFDAKRLIGRKFGDPVVQSDMKHWPFPQVINDGDKPKVQVSYKGETKAFYPPEISSMVL 124

Query 122 KMKKTAEDYLGEVTEAVITVPAYFNDAQRQATKDAGRIAGLEVKRIINEPTAAALAYGL 181
      KMK+ AE YLG PVT AVITVPAYFND+QRQATKDAG IAGL V RIINEPTAAA+AYGL
Sbjct 125 KMKEIAEAYLGYPVTNAVITVPAYFNDSQRQATKDAGVIAGLNVLRIINEPTAAAIAYGL 184

Query 182 DK-GTGNRTIAVYDLGGGTFDISIIIEIDEVDGEKTFEVLATNGDTHLGGEDFDSRLINYL 240
      D+ G G R + ++DLGGGTFD+SI+ ID DG FEV AT GDTHLGGEDFD+RL+N+
Sbjct 185 DRTGKGERNVLI FDLGGGTFDVSILTID--DG--IFEVKATAGDTHLGGEDFDNRLVNHF 240

Query 241 VEEFKKQDQIGDLRNDPLAMQRLKEAAEKAKIELSSAQQTVDVNLPIYITADATGPKHMNIKV 300
      VEEFK+ D+ + A++RL+ A E+AK LSS+ Q + + + +
Sbjct 241 VEEFKRKHKKDISQNKRAVRRRLTACERAKRTLSSSTQASLEIDSLFEGI----DFYTSI 296

Query 301 TRAKLESLVEDLVNRSIEPLKVALQDAGLSVSDIDDVILVGGQTRMPMVQKKVAEFF-GK 359
      TRA+ E L DL ++EP++ AL+DA L + I D++LVGG TR+P VQK + +FF G+
Sbjct 297 TRARFEELCSDLFRSTLEPVEKALRDAKLDKAQIHDLVLVGGSTRIPKVQKLLQDFENGR 356

Query 360 EPRKDVNPDEAVAIGAAVQGGVLTGD----VKDVLVLLDVTPLSLGIETMGGVMTTLIAKN 415
      + K +NPDEAVA GAAVQ +L GD V+D+LLLDV PLSLG+ET GGVMT LI +N
Sbjct 357 DLNKSINPDEAVAYGAAVQAAAILMGDKSENVQDLLLLDVAPLSLGLETAGGVMTALIKRN 416

Query 416 TTIPTKHSQVFSTAEEDNQSAVTIHLVQGERKRAADNKSLGQFNLDGINPAPRGMPIEVT 475
      +TIPTK +Q+F+T DNQ V I V +GER DN LG+F L GI PPRG+PQIEVT
Sbjct 417 STIPTKQTQIFTTYSQDNQPGVLIQVYEGERAMTKDNNLLGRFELSGIPPAPRGPVQIEVT 476

Query 476 FDIDADGILHVSADKNSGKEQKITIKASSG-LNEDEIQKMVRDAEANA EADRKFEEELVQ 534
      FDIDA+GIL+V+A DK++GK KITI G L+++EI++MV++AE D E V
Sbjct 477 FDIDANGILNVTATDKSTGKANKITITNDKGRLSKEEIERMVQEA EKYKA EDEVQREFRS 536

Query 535 TRNQGDHLLHSTRKQVEEAGDK---LPADDKTAIESA---LTALETALKGEDKAAIEAKM 588
      +N + + + VE+ G K AD K ++ ++ L+ E K E K
Sbjct 537 AKNALESYAFNMKSAVEDEGLKGI SEADKKKVLDKCQEVISWLDANTLAE-KDEF EHKR 595

Query 589 QELAQVSQKLM 599
      +EL QV ++
Sbjct 596 KELEQVCNPII 606
```

Rot markiert sind die in der Einleitung erwähnten und für diese Arbeit relevanten Aminosäuren (DnaK: M404, A439, V436, und Hsp70: A405, Y430, V437)

Anhang

7.1.3 SEQUENZVERGLEICH DNA-SEQUENZ WILD TYPISCHES GEN M11717 (HSPA1A) UND DNA-SEQUENZ HSP70 AUS EXPRESSIONSVEKTOR (QIAGENE)

```
> Query: Sequenz des Genes M11717 HSP70A1A
> Subject Hs_HSPA1A_1_EC QIAGENes Expression Kit E. coli (EEC0108451)
Length=1920

Score = 1252 bits (1388), Expect = 0.0
Identities = 1430/1920 (74%), Gaps = 3/1920 (0%)
Strand=Plus/Plus

Query 4      GCCAAAGCCGCGGCAGTCGGCATCGACCTGGGCACCACCTACTCCTGCGTGGGGGTGTTC 63
          || ||||| || ||| || || || ||||| ||||| || || || || || ||
Sbjct 1      GCAAAAGCAGCAGCAATTGGTATTGATCTGGGCACCACCTATAGCTGTGTTGGTGTTTTT 60

Query 64     CAACACGGCAAGGTGGAGATCATCGCCAACGACCAGGGCAACCGCACCACCCAGCTAC 123
          || || ||||| ||||| || || ||||| || ||||| || ||||| |||||
Sbjct 61     CAGCATGGCAAAGTGAAATTATTGCCAATGATCAGGGCAATCGTACCACCCGAGCTAT 120

Query 124    GTGGCCTTCACGGACACCGAGCGGCTCATCGGGGATGCGGCCAAGAACCAGGTGGCGCTG 183
          || || || || || ||||| || || || || ||||| ||||| || ||||| || ||
Sbjct 121    GTTGCAATTTACCGATACCGAACGTCTGATTGGTGATGCAGCCAAAAATCAGGTTGCACTG 180

Query 184    AACCCGCAGAACACCGTGTGTTGACGCGAAGCGCCTGATCGGCCGCAAGTTCGGCGACCCG 243
          || ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| || || || || || || || ||
Sbjct 181    AATCCGCAGAATACCGTTTTTGTATGCGAAACGCTGATTGGTCGTAATTTGGTGATCCG 240

Query 244    GTGGTGCAGTCGGACATGAAGCACTGGCCTTTCCAGGTGATCAACGACGGAGACAAGCCC 303
          || || ||| || ||||| || ||||| || ||||| || || || || || || || ||
Sbjct 241    GTTGTTCAGAGCGATATGAAACATTTGGCCGTTTCAGGTGATTAATGATGGCGATAAACCG 300

Query 304    AAGGTGCAGGTGAGCTACAAGGGGGAGACCAAGGCATTCTACCCCGAGGAGATCTCGTCC 363
          || || ||||| ||||| || || || ||||| || || || || || || || || ||
Sbjct 301    AAAGTTCAGGTGAGCTATAAAGGTGATACCAAAGCCTTTTATCCGGAAGAAATTAGCAGC 360

Query 364    ATGGTGCTGACCAAGATGAAGGAGATCGCCGAGGCGTACCTGGGCTACCCGGTGACCAAC 423
          ||||| ||||| ||||| || || ||||| || || ||||| || ||||| |||||
Sbjct 361    ATGGTGCTGACCAAAATGAAAGAAATGCCGAAGCCTATCTGGGTTATCCGGTTACCAAT 420

Query 424    GCGGTGATCACCGTGCCGGCCTACTTCAACGACTCGCAGCGCCAGGCCACCAAGGATGCG 483
          || || || ||||| ||||| || || || || ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct 421    GCCGTTATTACCGTTCGGGCATATTTAATGATAGCCAGCGTCAGGCAACCAAGATGCA 480

Query 484    GGTGTGATCGCGGGGCTCAACGTGCTGCGGATCATCAACGAGCCCACGGCCGCCGCATC 543
          ||||| || || || || || ||||| || || ||||| || || || || || || || ||
Sbjct 481    GGTGTTATTGCAGGTCTGAATGTGCTGCGCATTATTAATGAACCGACCGCAGCAGCCATT 540

Query 544    GCCTACGGCCTGGACAGAACGGGCAAGGGGAGCGCAACGTCCTGATCTTTGACCTGGGC 603
          ||||| || ||||| || || || || || || || || || ||||| ||||| |||||
Sbjct 541    GCCTATGGTCTGGATCGTACCGGTAAGGTGAACGTAATGTGCTGATTTTTGATCTGGGT 600

Query 604    GGGGACACCTTCGACGTGTCCATCTGACGATCGACGACGGCATCTTCGAGGTGAAGGCC 663
          || ||||| || || || ||||| || || || ||||| || || || || || || || ||
Sbjct 601    GGTGGCACCTTTGATGTTAGCATTCTGACCATTGATGATGGCATTTTTGAAGTTAAAGCC 660

Query 664    ACGGCCGGGACACCCACCTGGGTGGGAGGACTTTGACAACAGGCTGGTGAACCACTTC 723
          || || || || ||||| ||||| || || ||||| || || ||||| || || ||
Sbjct 661    ACCGAGGTGATACCCATCTGGGTGGCGAAGATTTTGATAATCGCCTGGTGAATCATTTT 720

Query 724    GTGGAGGAGTTCAAGAGAAAACACAAGAAGGACATCAGCCAGAACAAGCGAGCCGTGAGG 783
          ||||| || || || || ||||| || || || || ||||| || || || || || ||
```

Anhang

Sbjct	721	GTGGAAGAATTTAAACGCAAACATAAAAAAGATATTAGCCAGAATAAACGTGCAGTTCGT	780
Query	784	CGGCTGCGCACC GCCTGCGAGAGGGCCAAGAGGACCCTGTCTGCCAGCACCCAGGCCAGC	843
Sbjct	781	CGTCTGCGTACC GCATGTGAACGTGCAAAACGTACCCTGAGCAGCAGCACCCAGGCAAGC	840
Query	844	CTGGAGATCGACTCCCTGTTT GAGGGCATCGACTTCTACACGTCCATCACCAGGGCGAGG	903
Sbjct	841	CTGGAAATTGATAGCCTGTTT GAAGGCATTGATTTTATAACCAGCATTACCCGTGCACGT	900
Query	904	TTCGAGGAGCTGTGCTCCGACCTGTTCCGAAGCACCCCTGGAGCCCGTGGAGAAGGCTCTG	963
Sbjct	901	TTTGAAGAACTGTGCAGCGACCTGTTTCGTAGCACCCCTGGAACCGGTTGAAAAAGCACTG	960
Query	964	CGCGACGCCAAGCTGGACAAGGCCAGATTACGACCTGGTCCCTGGTCGGGGGCTCCACC	1023
Sbjct	961	CGTGATGCCAAACTGGATAAAGCCAGATT CATGATCTGGTTCCTGGTTGGTGGTAGCACC	1020
Query	1024	CGCATCCCCAAGGTGCAGAAGCTGCTGCAGGACTTCTTCAACGGGCGCGACCTGAACAAG	1083
Sbjct	1021	CGTATTCCGAAAGTGCAGAACTGCTGCAAGATTTT TTAATGGTCGCGATCTGAATAAA	1080
Query	1084	AGCATCAACCCCGACGAGGCTGTGGGCTACGGGGCGGGCGGTGCAGGCGGCCATCCTGATG	1143
Sbjct	1081	AGCATTAATCCGGATGAAGCAGTTGCCTATGGTGCAGCAGTTCAGGCAGCAATTCTGATG	1140
Query	1144	GGGACAAGTCCGAGAACGTGCAGGACCTGCTGCTGCTGGACGTGGCTCCCCTGTCTGCTG	1203
Sbjct	1141	GGTGATAAAAAGCGAAAATGTGCAGGATCTGCTGCTGCTGGATGTTGCACCGCTGTCTCTG	1200
Query	1204	GGGCTGGAGACGGCCGGAGGCGTGATGACTGCCCTGATCAAGCGCAACTCCACCATCCCC	1263
Sbjct	1201	GGTCTGGAAACCGCAGGTGGTGTATGACCGCACTGATTAACGTAATAGCACCATTCCG	1260
Query	1264	ACCAAGCAGACGCAGATCTTACCACCTACTCCGACAACCAACCCGGGTGCTGATCCAG	1323
Sbjct	1261	ACCAAACAGACCAGATTTTTACCACCTATTCCGATAATCAGCCGGGTGTTCTGATTCAG	1320
Query	1324	GTGTACGAGGGCGAGAGGGCCATGACGAAAGACAACAATCTGTTGGGGCGCTTCGAGCTG	1383
Sbjct	1321	GTTTATGAAGGTGAACGTGCCATGACCAAAGATAATAATCTGCTGGGTGCTTTTGAAC TG	1380
Query	1384	AGCGGCATCCCTCCGGCCCC---AGGCGTGCCCCAGATCGAGGTGACCTTCGACATCGAT	1440
Sbjct	1381	AGCGGTATTCCGCCGGCACCGCTGGTGTCCGCAGATTGAAGTGACCTTTGATATTGAT	1440
Query	1441	GCCAACGGCATCCTGAACGTACGGCCACGGACAAGAGCACCGGCAAGGCCAACAAGATC	1500
Sbjct	1441	GCCAATGGCATTCTGAATGTTACCGCAACCGATAAAAGCACCGGCAAGGCCAATAAAATT	1500
Query	1501	ACCATACCAACGACAAGGGCCGCTGAGCAAGGAGGAGATCGAGCGCATGGTGCAGGAG	1560
Sbjct	1501	ACCATTACCAATGATAAAGGTGCGCTGTCTAAGGAAGAAATTGAACGCATGGTTCAGGAA	1560
Query	1561	GCGGAGAAGTACAAAGCGGAGGACGAGGTGCAGCGCAGAGGGTGTGAGCCAAGAACGCC	1620
Sbjct	1561	GCCGAAAAATATAAAGCCGAAGATGAAGTT CAGCGTGAACGTGTTAGCGCAAAAAATGCC	1620
Query	1621	CTGGAGTCTTACGCCTTCAACATGAAGAGCGCCGTGGAGGATGAGGGGCTCAAGGGCAAG	1680
Sbjct	1621	CTGGAAAGCTATGCCTTTAATATGAAAAGCGCAGTGGAAGATGAAGGTCTGAAAGGCAAA	1680
Query	1681	ATCAGCGAGGCCGACAAGAAGAAGGTGCTGGACAAGTGTCAAGAGGTCATCTCGTGCTG	1740
Sbjct	1681	ATTAGCGAAGCCGATAAAAAAAGTGCTGGATAAATGCCAGGAAGTTATTAGCTGGCTG	1740

Anhang

```
Query 1741 GACGCCAACACCTTGGCCGAGAAGGACGAGTTTGGAGCACAAGAGGAAGGAGCTGGAGCAG 1800
          || ||||| ||| |||| | | | | | |||| | | | | | |||| |||
Sbjct 1741 GATGCCAATACCCTGGCAGAAAAAGATGAATTTGAACATAAACGCCAAAGAAGCTGGAACAG 1800

Query 1801 GTGTGTAACCCCATCATCAGCGGACTGTACCAGGGTGCCGGTGGTCCCGGGCCTGGGGC 1860
          || || | | | | | | | |||| | |||| | |||| | | | | | |
Sbjct 1801 GTTTGCAATCCGATTATTAGCGGTCTGTATCAGGGTGCAGGTGGTCCCGGTCCGGTGGT 1860

Query 1861 TTCGGGGCTCAGGGTCCCAAGGGAGGGTCTGGGTCAGGCCCCACCATTGAGGAGGTAGAT 1920
          || | | | ||||| | | | | | | | | | | | | | | | |
Sbjct 1861 TTTGGTGCACAGGGTCCGAAAGGTGGTAGCGGTAGCGGTCCGACCATTGAAGAAGTTGAT 1920
```

7.1.4 SEQUENZVERGLEICH DER PROTEINSEQUENZEN VON HSP70 UND HSP70 AUS EXPRESSIONSVEKTOR (QIAGENE)

```
> Query: Sequenz des Genes M11717 HSP70A1A
> 40407: Hs_HSPA1A_1_EC QIAGENes Expression Kit E. coli ( EEC0108451 )
Length=640
```

```
Score = 1310 bits (3390), Expect = 0.0, Method: Compositional matrix adjust.
Identities = 639/640 (99%), Positives = 640/640 (100%), Gaps = 0/640 (0%)
```

```
Query 2 AKAAAIGIDLGTTYSCVGVFQHGKVEIIANDQGNRTTPSYVAFTDTERLIGDAAKNQVAL 61
          AKAAAIGIDLGTTYSCVGVFQHGKVEIIANDQGNRTTPSYVAFTDTERLIGDAAKNQVAL
Sbjct 1 AKAAAIGIDLGTTYSCVGVFQHGKVEIIANDQGNRTTPSYVAFTDTERLIGDAAKNQVAL 60

Query 62 NPQNTVFDAKRLIGRKFQVQSDMKHWPVQVINDGDKPKVQVSYKGETKAFYPEEISS 121
          NPQNTVFDAKRLIGRKFQVQSDMKHWPVQVINDGDKPKVQVSYK+TKAFYPEEISS
Sbjct 61 NPQNTVFDAKRLIGRKFQVQSDMKHWPVQVINDGDKPKVQVSYKGDTKAFYPEEISS 120

Query 122 MVLTKMKEIAEAYLGYPVTNAVITVPAYFNDSQRQATKDAGVIAGLNLVRIINEPTAAAI 181
          MVLTKMKEIAEAYLGYPVTNAVITVPAYFNDSQRQATKDAGVIAGLNLVRIINEPTAAAI
Sbjct 121 MVLTKMKEIAEAYLGYPVTNAVITVPAYFNDSQRQATKDAGVIAGLNLVRIINEPTAAAI 180

Query 182 AYGLDRTGKGERNVLIFDLGGGTFDVSILTIIDDGIFEVKATAGDTHLGGEDFDNRLVNHF 241
          AYGLDRTGKGERNVLIFDLGGGTFDVSILTIIDDGIFEVKATAGDTHLGGEDFDNRLVNHF
Sbjct 181 AYGLDRTGKGERNVLIFDLGGGTFDVSILTIIDDGIFEVKATAGDTHLGGEDFDNRLVNHF 240

Query 242 VEEFKRKHKKDISQNKRAVRRRLTACERAKRTLSSSTQASLEIDSLFEGIDFYTSITRAR 301
          VEEFKRKHKKDISQNKRAVRRRLTACERAKRTLSSSTQASLEIDSLFEGIDFYTSITRAR
Sbjct 241 VEEFKRKHKKDISQNKRAVRRRLTACERAKRTLSSSTQASLEIDSLFEGIDFYTSITRAR 300

Query 302 FEELCSDLFRSTLEPVEKALRDAKLDKAQIHDLVLVGGSTRIPKVQKLLQDFFNGRDLNK 361
          FEELCSDLFRSTLEPVEKALRDAKLDKAQIHDLVLVGGSTRIPKVQKLLQDFFNGRDLNK
Sbjct 301 FEELCSDLFRSTLEPVEKALRDAKLDKAQIHDLVLVGGSTRIPKVQKLLQDFFNGRDLNK 360

Query 362 SINPDEAVAYGAAVQAAILMGDKSENVQDLLLDDVAPLSLGLTAGGVMTALIKRNSTIP 421
          SINPDEAVAYGAAVQAAILMGDKSENVQDLLLDDVAPLSLGLTAGGVMTALIKRNSTIP
Sbjct 361 SINPDEAVAYGAAVQAAILMGDKSENVQDLLLDDVAPLSLGLTAGGVMTALIKRNSTIP 420

Query 422 TKQTQIFTTYSDNQPGVLIQVYEGERAMTKDNNLLGRFELSGIPPAPRGVQPQIEVTFDID 481
          TKQTQIFTTYSDNQPGVLIQVYEGERAMTKDNNLLGRFELSGIPPAPRGVQPQIEVTFDID
Sbjct 421 TKQTQIFTTYSDNQPGVLIQVYEGERAMTKDNNLLGRFELSGIPPAPRGVQPQIEVTFDID 480

Query 482 ANGILNVTATDKSTGKANKITITNDKGRLSKEEIERMVQEAKEYKAEDEVQRERVSAKNA 541
          ANGILNVTATDKSTGKANKITITNDKGRLSKEEIERMVQEAKEYKAEDEVQRERVSAKNA
Sbjct 481 ANGILNVTATDKSTGKANKITITNDKGRLSKEEIERMVQEAKEYKAEDEVQRERVSAKNA 540
```

Anhang

```
Query 542 LESYAFNMKSAVEDEGLKGGKISEADKKKVLDKCQEVISWLDANTLAEKDEFEHKRKELEQ 601
        LESYAFNMKSAVEDEGLKGGKISEADKKKVLDKCQEVISWLDANTLAEKDEFEHKRKELEQ
Sbjct 541 LESYAFNMKSAVEDEGLKGGKISEADKKKVLDKCQEVISWLDANTLAEKDEFEHKRKELEQ 600

Query 602 VCNPIISGLYQGAGGPGGGFQAQGPKGSGSGPTIEEVD 641
        VCNPIISGLYQGAGGPGGGFQAQGPKGSGSGPTIEEVD
Sbjct 601 VCNPIISGLYQGAGGPGGGFQAQGPKGSGSGPTIEEVD 640
```

7.1.5 MUTATIONEN IN DER DNA-/ PROTEIN-SEQUENZ VON HSP70A1A AUS EXPRESSIONSVEKTOR (QIAGENE) MIT PRIMERSEQUENZEN

```
1-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!
1 atgaaacaggcaaaagcagcagcaattggattgatctgggaccacctatagctgtgtt
1 M K Q A K A A A I G I D L G T T Y S C V
1-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!
61 ggtgtttttcagcatggcaagtggaaattattgccaatgatcagggcaatcgaccacc
21 G V F Q H G K V E I I A N D Q G N R T T
1-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!
121 ccgagctatggttcatttaccgataccgaacgtctgattggatgcagccaaaaatcag
41 P S Y V A F T D T E R L I G D A A K N Q
1-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!
181 gttgactgaatccgcagaataaccgtttttgatgcaaacgcctgattggctgtaaat
61 V A L N P Q N T V F D A K R L I G R K F
1-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!
241 ggtgatccggttggttcagagcgaatgaaacattggccggttcaggtgattaatgatggc
81 G D P V V Q S D M K H W P F Q V I N D G
1-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!
301 gataaaccgaaagttcaggtgagctataaaggtgataccaaagccttttatccggaagaa
101 D K P K V Q V S Y K G D T K A F Y P E E
1-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!
361 attagcagcatggtgctgacccaaatgaaagaaattgccgaagcctatctgggttatccg
121 I S S M V L T K M K E I A E A Y L G Y P
1-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!
421 gttaccaatgccggttattaccggttccggcatattttaatgatagccagcgtcaggcaacc
141 V T N A V I T V P A Y F N D S Q R Q A T
1-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!
481 aaagatgcaggtggttattgcaggtctgaatgtgctgctgattattaatgaaccgaccgca
161 K D A G V I A G L N V L R I I N E P T A
1-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!
541 gcagccattgcctatggtctggatcgtaccggtaaaggtgaacgtaatgtgctgattttt
181 A A I A Y G L D R T G K G E R N V L I F
1-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!
601 gatctgggtgggtggcacctttgatggttagcattctgaccattgatgatggcatttttgaa
201 D L G G G T F D V S I L T I D D G I F E
1-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!
661 gttaaagccaccgcaggtgatacccatctgggtggcgaagattttgataatcgctgggtg
221 V K A T A G D T H L G G E D F D N R L V
1-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!
721 aatcattttgtggaagaatttaaacgcaaacataaaaaagatattagccagaataaacgt
241 N H F V E E F K R K H K K D I S Q N K R
1-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!
781 gcagttcgtcgtctgctgctaccgcatgtgaacgtgcaaacgtaccctgagcagcagcacc
261 A V R R L R T A C E R A K R T L S S S T
```

Anhang

1-----!-----!-----!-----!-----!-----!
841 caggcaagcctggaattgatagcctgtttgaaggcattgatttttataaccagcattacc
281 Q A S L E I D S L F E G I D F Y T S I T
1-----!-----!-----!-----!-----!-----!
901 cgtgcacgttttgaagaactgtgcagcgacctgtttcgtagcacctggaaccggttgaa
301 R A R F E E L C S D L F R S T L E P V E
1-----!-----!-----!-----!-----!-----!
961 aaagcactgctgatgccaactggataaagcccagattcatgatctggttctggttggt
321 K A L R D A K L D K A Q I H D L V L V G
1-----!-----!-----!-----!-----!-----!
1021 ggtagcaccggtattccgaaagtgcagaaactgctgcaagatttttttaagtgtcgcgat
341 G S T R I P K V Q K L L Q D F F N G R D
1-----!-----!-----!-----!-----!-----!
1081 ctgaataaaagcattaatccggatgaagcagttgcctatggtgcagcagttcaggcagca
361 L N K S I N P D E A V A Y G A A V Q A A
1-----!-----!-----!-----!-----!-----!
1141 attctgatgggtgataaaagcgaaaatgtgcaggatctgctgctgctggatggtgcaccg
381 I L M G D K S E N V Q D L L L L D V A P
1-----!-----!-----!-----!-----!-----!
Glycin GGA
TGGGTCTGGAAACCGGAGGTGGTGTATGAC
1201 ctgtctctgggtctggaaccgcaagggtggttatgaccgcactgattaacgtaatagc
401 L S L G L E T A G G V M T A L I K R N S
1-----!-----!-----!-----!-----!-----!
Glycin GGC
GATAATCAGCCGGGTGGC
1261 accattccgaccaaacagaccagatttttaccacctattccgataatcagccgggtggt
421 T I P T K Q T Q I F T T Y S D N Q P G V
1-----!-----!-----!-----!-----!-----!
CTGATTCAGGTTTATG
1321 ctgattcaggtttatgaaggatgaacgtgccatgaccaaagataataatctgctgggtcgt
441 L I Q V Y E G E R A M T K D N N L L G R
1-----!-----!-----!-----!-----!-----!
1381 tttgaactgagcggatttccgccggcaccgcgtgggtggttccgcagattgaagtgccttt
461 F E L S G I P P A P R G V P Q I E V T F
1-----!-----!-----!-----!-----!-----!
1441 gatattgatgccaatggcattctgaatggtaccgcaaccgataaaaagcaccggcaaagcc
481 D I D A N G I L N V T A T D K S T G K A
1-----!-----!-----!-----!-----!-----!
1501 aataaaattaccattaccaatgataaaggctgcctgtctaaggaagaaattgaacgcatg
501 N K I T I T N D K G R L S K E E I E R M
1-----!-----!-----!-----!-----!-----!
1561 gttcaggaagccgaaaaatataaagccgaagatgaagttcagcgtgaacgtggttagcgca
521 V Q E A E K Y K A E D E V Q R E R V S A
1-----!-----!-----!-----!-----!-----!
1621 aaaaatgccctggaaagctatgcctttaatatgaaaagcgcagtggaagatgaaggtctg
541 K N A L E S Y A F N M K S A V E D E G L
1-----!-----!-----!-----!-----!-----!
1681 aaaggcaaaattagcgaagccgataaaaaaaagtgctggataaatgccaggaagttatt
561 K G K I S E A D K K K V L D K C Q E V I
1-----!-----!-----!-----!-----!-----!
1741 agctggctggatgccaataccctggcagaaaaagatgaatttgaacataaacgcaaagaa
581 S W L D A N T L A E K D E F E H K R K E
1-----!-----!-----!-----!-----!-----!
1801 ctggaacaggtttgcaatccgattattagcggctctgtatcaggtgacaggtggtccgggt
601 L E Q V C N P I I S G L Y Q G A G G P G

Anhang

```
1-----!-----!-----!-----!-----!-----!  
1861 ccgggtgggttttgggtgcacaggggtccgaaaggtggtagcggtagcgggtccgaccattgaa  
621 P G G F G A Q G P K G G S G S G P T I E  
1-----!-----  
1921 gaagttgattagtaa  
641 E V D - -
```

7.2 VERZEICHNISSE

7.2.1 LITERATURVERZEICHNIS

Akira, S., Takeda, K., & Kaisho, T. (2001). Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity. *Nat Immunol*, 2(8), 675-680.

Akira, S., & Takeda, K. (2004). Toll-like receptor signalling. *Nat Rev Immunol*, 4(7), 499-511.

Asea, A., Rehli, M., Kabingu, E., Boch, J. A., Bare, O., Auron, P. E., Stevenson, M. A., & Calderwood, S. K. (2002). Novel signal transduction pathway utilized by extracellular HSP70: role of toll-like receptor (TLR) 2 and TLR4. *J Biol Chem.*, 277(17), 15028-15034.

Auger, I., & Roudier, J. (1997). A function for the QKRAA amino acid motif: mediating binding of DnaJ to DnaK. Implications for the association of rheumatoid arthritis with HLA-DR4. *J Clin. Invest.*, 99(8), 1818-1822.

Basu, S., Binder, R. J., Ramalingam, T., & Srivastava, P. K. (2001). CD91 is a common receptor for heat shock proteins gp96, hsp90, hsp70, and calreticulin. *Immunity*, 14(3), 303-313.

Bendz, H., Ruhland, S. C., Pandya, M. J., Hainzl, O., Riegelsberger, S., Brauchle, C., Mayer, M. P., Buchner, J., Issels, R. D., & Noessner, E. (2007). Human heat shock protein 70 enhances tumor antigen presentation through complex formation and intracellular antigen delivery without innate immune signaling. *J Biol Chem.*, 282(43), 31688-31702.

Berwin, B., Hart, J. P., Pizzo, S. V., & Nicchitta, C. V. (2002). Cutting edge: CD91-independent cross-presentation of GRP94(gp96)-associated peptides. *J Immunol*, 168(9), 4282-4286.

Berwin, B., Hart, J. P., Rice, S., Gass, C., Pizzo, S. V., Post, S. R., & Nicchitta, C. V. (2003). Scavenger receptor-A mediates gp96/GRP94 and calreticulin internalization by antigen-presenting cells. *EMBO J*, 22(22), 6127-6136.

Berwin, B., Delneste, Y., Lovingood, R. V., Post, S. R., & Pizzo, S. V. (2004). SREC-I, a type F scavenger receptor, is an endocytic receptor for calreticulin. *J Biol Chem.*, 279(49), 51250-51257.

Bhatia, S., Edidin, M., Almo, S. C., & Nathenson, S. G. (2006). B7-1 and B7-2: similar costimulatory ligands with different biochemical, oligomeric and signaling properties. *Immunol Lett.*, 104(1-2), 70-75.

Binder, R. J., Vatner, R., & Srivastava, P. (2004). The heat-shock protein receptors: some answers and more questions. *Tissue Antigens.*, 64(4), 442-451.

Binder, R. J. (2009). CD40-independent engagement of mammalian hsp70 by antigen-presenting cells. *J Immunol*, 182(11), 6844-6850.

Bjerknes, R., & Basso, C. F. (1984). Phagocyte C3-mediated attachment and internalization: flow cytometric studies using a fluorescence quenching technique. *Blut*, 49(4), 315-323.

Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 72, 248-254.

Buchberger, A., Theyssen, H., Schroder, H., McCarty, J. S., Virgallita, G., Milkereit, P., Reinstein, J., & Bukau, B. (1995). Nucleotide-induced conformational changes in the ATPase and substrate binding domains of the DnaK chaperone provide evidence for interdomain communication. *J Biol Chem*, 270(28), 16903-16910.

Bukau, B., & Horwich, A. L. (1998). The Hsp70 and Hsp60 chaperone machines. *Cell*, 92(3), 351-366.

Calderwood, S. K., Theriault, J. R., & Gong, J. (2005). Message in a bottle: role of the 70-kDa heat shock protein family in anti-tumor immunity. *Eur.J Immunol*, 35(9), 2518-2527.

Castellino, F., Boucher, P. E., Eichelberg, K., Mayhew, M., Rothman, J. E., Houghton, A. N., & Germain, R. N. (2000). 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.*, 191(11), 1957-1964.

Daugaard, M., Rohde, M., & Jaattela, M. (2007). The heat shock protein 70 family: Highly homologous proteins with overlapping and distinct functions. *FEBS Lett*, 581(19), 3702-3710.

De Silva, C. R., Vagner, J., Lynch, R., Gillies, R. J., & Hruby, V. J. (2010). Optimization of time-resolved fluorescence assay for detection of europium-tetraazacyclododecyltetraacetic acid-labeled ligand-receptor interactions. *Anal Biochem*, 398(1), 15-23.

Delneste, Y., Magistrelli, G., Gauchat, J., Haeuw, J., Aubry, J., Nakamura, K., Kawakami-Honda, N., Goetsch, L., Sawamura, T., Bonnefoy, J., & Jeannin, P. (2002). Involvement of LOX-1 in dendritic cell-mediated antigen cross-presentation. *Immunity*, 17(3), 353-362.

DeNagel, D. C., & Pierce, S. K. (1992). A case for chaperones in antigen processing. *Immunol Today*, 13(3), 86-89.

Dengjel, J., Schoor, O., Fischer, R., Reich, M., Kraus, M., Muller, M., Kreyborg, K., Altenberend, F., Brandenburg, J., Kalbacher, H., Brock, R.,

- Driessen, C., Rammensee, H. G., & Stevanovic, S.** (2005). Autophagy promotes MHC class II presentation of peptides from intracellular source proteins. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, 102(22), 7922-7927.
- Doody, A. D., Kovalchin, J. T., Mihalyo, M. A., Hagymasi, A. T., Drake, C. G., & Adler, A. J.** (2004). Glycoprotein 96 can chaperone both MHC class I- and class II-restricted epitopes for in vivo presentation, but selectively primes CD8+ T cell effector function. *J Immunol*, 172(10), 6087-6092.
- Fiola, S., Gosselin, D., Takada, K., & Gosselin, J.** (2010). TLR9 contributes to the recognition of EBV by primary monocytes and plasmacytoid dendritic cells. *J Immunol*, 185(6), 3620-3631.
- Fischer, N., Haug, M., Kwok, W. W., Kalbacher, H., Wernet, D., Dannecker, G. E., & Holzer, U.** (2010). Involvement of CD91 and scavenger receptors in Hsp70-facilitated activation of human antigen-specific CD4+ memory T cells. *Eur.J.Immunol.*, 40(4), 986-997.
- Flaherty, K. M., DeLuca-Flaherty, C., & McKay, D. B.** (1990). Three-dimensional structure of the ATPase fragment of a 70K heat-shock cognate protein. *Nature*, 346(6285), 623-628.
- Flajnik, M. F.** (2002). Comparative analyses of immunoglobulin genes: surprises and portents. *Nat Rev Immunol*, 2(9), 688-698.
- Fuse, S., Tsai, C. Y., Rommereim, L. M., Zhang, W., & Usherwood, E. J.** (2011). Differential requirements for CD80/86-CD28 costimulation in primary and memory CD4 T cell responses to vaccinia virus. *Cell Immunol*, 266(2), 130-134.
- Gao, B., & Tsan, M. F.** (2003). Endotoxin contamination in recombinant human heat shock protein 70 (Hsp70) preparation is responsible for the induction of tumor necrosis factor alpha release by murine macrophages. *J Biol Chem.*, 278(1), 174-179.
- Gerlach, C., van Heijst, J. W., & Schumacher, T. N.** (2011). The descent of memory T cells. *Ann.N.Y.Acad.Sci.*, 1217, 139-153.
- Gething, M. J., & Sambrook, J.** (1992). Protein folding in the cell. *Nature*, 355(6355), 33-45.
- Haas, I. G.** (1991). BiP--a heat shock protein involved in immunoglobulin chain assembly. *Curr.Top.Microbiol.Immunol*, 167, 71-82.
- Hartl, F. U., & Hayer-Hartl, M.** (2002). Molecular chaperones in the cytosol: from nascent chain to folded protein. *Science*, 295(5561), 1852-1858.
- Haug, M., Dannecker, L., Schepp, C. P., Kwok, W. W., Wernet, D., Buckner, J. H., Kalbacher, H., Dannecker, G. E., & Holzer, U.** (2005). The heat shock

protein Hsp70 enhances antigen-specific proliferation of human CD4+ memory T cells. *Eur.J Immunol.*, 35(11), 3163-3172.

Haug, M., Schepp, C. P., Kalbacher, H., Dannecker, G. E., & Holzer, U. (2007). 70-kDa heat shock proteins: specific interactions with HLA-DR molecules and their peptide fragments. *Eur.J Immunol.*, 37(4), 1053-1063.

Hed, J., Hallden, G., Johansson, S. G., & Larsson, P. (1987). The use of fluorescence quenching in flow cytofluorometry to measure the attachment and ingestion phases in phagocytosis in peripheral blood without prior cell separation. *J Immunol Methods*, 101(1), 119-125.

Hendrick, J. P., & Hartl, F. U. (1993). Molecular chaperone functions of heat-shock proteins. *Annu.Rev Biochem.*, 62, 349-384.

Hennecke, J., & Wiley, D. C. (2002). Structure of a complex of the human alpha/beta T cell receptor (TCR) HA1.7, influenza hemagglutinin peptide, and major histocompatibility complex class II molecule, HLA-DR4 (DRA*0101 and DRB1*0401): insight into TCR cross-restriction and alloreactivity. *J Exp Med*, 195(5), 571-581.

Houlihan, J. L., Metzler, J. J., & Blum, J. S. (2009). HSP90alpha and HSP90beta isoforms selectively modulate MHC class II antigen presentation in B cells. *J.Immunol.*, 182(12), 7451-7458.

Janeway, C. A., Jr., & Medzhitov, R. (2002). Innate immune recognition. *Annu.Rev Immunol*, 20, 197-216.

Javid, B., MacAry, P. A., & Lehner, P. J. (2007). Structure and function: heat shock proteins and adaptive immunity. *J.Immunol.*, 179(4), 2035-2040.

Jiang, J., Prasad, K., Lafer, E. M., & Sousa, R. (2005). Structural basis of interdomain communication in the Hsc70 chaperone. *Mol.Cell.*, 20(4), 513-524.

Jiang, J., Lafer, E. M., & Sousa, R. (2006). Crystallization of a functionally intact Hsc70 chaperone. *Acta Crystallogr.Sect.F.Struct.Biol.Cryst.Commun.*, 62(Pt 1), 39-43.

Justesen, S., Harndahl, M., Lamberth, K., Nielsen, L. L., & Buus, S. (2009). Functional recombinant MHC class II molecules and high-throughput peptide-binding assays. *Immunome Res*, 5, 2.

Kawai, T., & Akira, S. (2010). The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nat Immunol*, 11(5), 373-384.

Kruse, E., & Kloppstech, K. (1992). Integration of early light-inducible proteins into isolated thylakoid membranes. *Eur J Biochem*, 208(1), 195-202.

- Kurotaki, T., Tamura, Y., Ueda, G., Oura, J., Kutomi, G., Hirohashi, Y., Sahara, H., Torigoe, T., Hiratsuka, H., Sunakawa, H., Hirata, K., & Sato, N.** (2007). Efficient cross-presentation by heat shock protein 90-peptide complex-loaded dendritic cells via an endosomal pathway. *J Immunol*, 179(3), 1803-1813.
- Laemmli, U. K.** (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259), 680-685.
- Landry, S. J., Jordan, R., McMacken, R., & Gierasch, L. M.** (1992). Different conformations for the same polypeptide bound to chaperones DnaK and GroEL. *Nature*, 355(6359), 455-457.
- Lindquist, S.** (1986). The heat-shock response. *Annu.Rev Biochem.*, 55, 1151-1191.
- Lindquist, S., & Craig, E. A.** (1988). The heat-shock proteins. *Annu.Rev Genet.*, 22, 631-677.
- Lipsker, D., Ziylan, U., Spehner, D., Proamer, F., Bausinger, H., Jeannin, P., Salamero, J., Bohbot, A., Cazenave, J. P., Drillien, R., Delneste, Y., Hanau, D., & de la, S. H.** (2002). Heat shock proteins 70 and 60 share common receptors which are expressed on human monocyte-derived but not epidermal dendritic cells. *Eur.J.Immunol.*, 32(2), 322-332.
- Maier, J. T., Haug, M., Foll, J. L., Beck, H., Kalbacher, H., Rammensee, H. G., & Dannecker, G. E.** (2002). Possible association of non-binding of HSP70 to HLA-DRB1 peptide sequences and protection from rheumatoid arthritis. *Immunogenetics.*, 54(2), 67-73.
- Mayer, M. P., Schroder, H., Rudiger, S., Paal, K., Laufen, T., & Bukau, B.** (2000). Multistep mechanism of substrate binding determines chaperone activity of Hsp70. *Nat Struct Biol.*, 7(7), 586-593.
- McCarty, J. S., Buchberger, A., Reinstein, J., & Bukau, B.** (1995). The role of ATP in the functional cycle of the DnaK chaperone system. *J Mol Biol*, 249(1), 126-137.
- McLaughlin, K., Seago, J., Robinson, L., Kelly, C., & Charleston, B.** (2010). Hsp70 enhances presentation of FMDV antigen to bovine CD4+ T cells in vitro. *Vet Res*, 41(3), 36.
- Misselwitz, B., Staeck, O., & Rapoport, T. A.** (1998). J proteins catalytically activate Hsp70 molecules to trap a wide range of peptide sequences. *Mol Cell*, 2(5), 593-603.
- Moseley, P.** (2000). Stress proteins and the immune response. *Immunopharmacology*, 48(3), 299-302.

Mosmann, T. R., Cherwinski, H., Bond, M. W., Giedlin, M. A., & Coffman, R. L. (1986). Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J Immunol*, 136(7), 2348-2357.

Mulisch, M., & Welsch, U. (2009). *Romeis- Mikroskopische Technik*: Springer.

Murphy, K., Travers, P., Walport, M., & Janeway, C. (2009). *Janeway's immunobiology* (7th ed.). New York: Garland Science.

Mycko, M. P., Cwiklinska, H., Szymanski, J., Szymanska, B., Kudla, G., Kilianek, L., Odyniec, A., Brosnan, C. F., & Selmaj, K. W. (2004). Inducible heat shock protein 70 promotes myelin autoantigen presentation by the HLA class II. *J.Immunol.*, 172(1), 202-213.

Mycko, M. P., Cwiklinska, H., Walczak, A., Libert, C., Raine, C. S., & Selmaj, K. W. (2008). A heat shock protein gene (Hsp70.1) is critically involved in the generation of the immune response to myelin antigen. *Eur J Immunol*, 38(7), 1999-2013.

Panjwani, N., Akbari, O., Garcia, S., Brazil, M., & Stockinger, B. (1999). The HSC73 molecular chaperone: involvement in MHC class II antigen presentation. *J.Immunol.*, 163(4), 1936-1942.

Panjwani, N., Popova, L., Febbraio, M., & Srivastava, P. K. (2000). The CD36 scavenger receptor as a receptor for Gp96. *Cell Stress Chaperones*, 5 391.

Parsell, D. A., & Lindquist, S. (1993). The function of heat-shock proteins in stress tolerance: degradation and reactivation of damaged proteins. *Annu.Rev Genet.*, 27, 437-496.

Reed, R. C., Berwin, B., Baker, J. P., & Nicchitta, C. V. (2003). GRP94/gp96 elicits ERK activation in murine macrophages. A role for endotoxin contamination in NF-kappa B activation and nitric oxide production. *J Biol Chem.*, 278(34), 31853-31860.

Renart, J., Reiser, J., & Stark, G. R. (1979). Transfer of proteins from gels to diazobenzyloxymethyl-paper and detection with antisera: a method for studying antibody specificity and antigen structure. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 76(7), 3116-3120.

Ritossa, F. (1962). A new puffing pattern induced by temperature shock and DNP in drosophila. *Experientia*, 18, 571-573.

Rocha, N., & Neefjes, J. (2008). MHC class II molecules on the move for successful antigen presentation. *EMBO J*, 27(1), 1-5.

Rojas, J. M., McArdle, S. E., Horton, R. B., Bell, M., Mian, S., Li, G., Ali, S. A., & Rees, R. C. (2005). Peptide immunisation of HLA-DR-transgenic mice permits

the identification of a novel HLA-DRbeta1*0101- and HLA-DRbeta1*0401-restricted epitope from p53. *Cancer Immunol Immunother*, 54(3), 243-253.

Roth, S., Willcox, N., Rzepka, R., Mayer, M. P., & Melchers, I. (2002). Major differences in antigen-processing correlate with a single Arg71<-->Lys substitution in HLA-DR molecules predisposing to rheumatoid arthritis and with their selective interactions with 70-kDa heat shock protein chaperones. *J Immunol*, 169(6), 3015-3020.

Rüdiger, S., Buchberger, A., & Bukau, B. (1997). Interaction of Hsp70 chaperones with substrates. *Nat Struct Biol*, 4(5), 342-349.

Rüdiger, S., Mayer, M. P., Schneider-Mergener, J., & Bukau, B. (2000). Modulation of substrate specificity of the DnaK chaperone by alteration of a hydrophobic arch. *J Mol Biol.*, 304(3), 245-251.

Sahlin, S., Hed, J., & Rundquist, I. (1983). Differentiation between attached and ingested immune complexes by a fluorescence quenching cytofluorometric assay. *J Immunol Methods*, 60(1-2), 115-124.

Santoro, M. G. (2000). Heat shock factors and the control of the stress response. *Biochem.Pharmacol.*, 59(1), 55-63.

Schuermann, J. P., Jiang, J., Cuellar, J., Llorca, O., Wang, L., Gimenez, L. E., Jin, S., Taylor, A. B., Demeler, B., Morano, K. A., Hart, P. J., Valpuesta, J. M., Lafer, E. M., & Sousa, R. (2008). Structure of the Hsp110:Hsc70 nucleotide exchange machine. *Mol Cell*, 31(2), 232-243.

Singh-Jasuja, H., Scherer, H. U., Hilf, N., Arnold-Schild, D., Rammensee, H. G., Toes, R. E., & Schild, H. (2000a). The heat shock protein gp96 induces maturation of dendritic cells and down-regulation of its receptor. *Eur.J Immunol*, 30(8), 2211-2215.

Singh-Jasuja, H., Toes, R. E., Spee, P., Munz, C., Hilf, N., Schoenberger, S. P., Ricciardi-Castagnoli, P., Neefjes, J., Rammensee, H. G., Arnold-Schild, D., & Schild, H. (2000b). Cross-presentation of glycoprotein 96-associated antigens on major histocompatibility complex class I molecules requires receptor-mediated endocytosis. *J.Exp.Med.*, 191(11), 1965-1974.

Smith, D. R., Rossi, C. A., Kijek, T. M., Henchal, E. A., & Ludwig, G. V. (2001). Comparison of dissociation-enhanced lanthanide fluorescent immunoassays to enzyme-linked immunosorbent assays for detection of staphylococcal enterotoxin B, Yersinia pestis-specific F1 antigen, and Venezuelan equine encephalitis virus. *Clin Diagn Lab Immunol*, 8(6), 1070-1075.

Smyth, M. J., Hayakawa, Y., Takeda, K., & Yagita, H. (2002). New aspects of natural-killer-cell surveillance and therapy of cancer. *Nat Rev Cancer*, 2(11), 850-861.

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

Srivastava, P. (2002b). Roles of heat-shock proteins in innate and adaptive immunity. *Nat.Rev.Immunol.*, 2(3), 185-194.

Steere, A. C., Falk, B., Drouin, E. E., Baxter-Lowe, L. A., Hammer, J., & Nepom, G. T. (2003). Binding of outer surface protein A and human lymphocyte function-associated antigen 1 peptides to HLA-DR molecules associated with antibiotic treatment-resistant Lyme arthritis. *Arthritis Rheum*, 48(2), 534-540.

Steinman, R. M., & Cohn, Z. A. (1973). Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution. *J Exp Med*, 137(5), 1142-1162.

Stocki, P., Wang, X. N., Morris, N. J., & Dickinson, A. M. (2011). HSP70 natively and specifically associates with an N-terminal dermcidin-derived peptide that contains an HLA-A*03 antigenic epitope. *J Biol Chem*, 286(14), 12803-12811.

Tavaria, M., Gabriele, T., Kola, I., & Anderson, R. L. (1996). A hitchhiker's guide to the human Hsp70 family. *Cell Stress.Chaperones.*, 1(1), 23-28.

Theriault, J. R., Mambula, S. S., Sawamura, T., Stevenson, M. A., & Calderwood, S. K. (2005). Extracellular HSP70 binding to surface receptors present on antigen presenting cells and endothelial/epithelial cells. *FEBS Lett.*, 579(9), 1951-1960.

Theriault, J. R., Adachi, H., & Calderwood, S. K. (2006). Role of scavenger receptors in the binding and internalization of heat shock protein 70. *J Immunol*, 177(12), 8604-8611.

Tissi eres, A., Mitchell, H. K., & Tracy, U. M. (1974). Protein Synthesis in Salivary Glands of *Drosophila melanogaster* : Relation to Chromosome Puffs. *Journal of Molecular Biology*, 84 389-398.

Tobian, A. A., Canaday, D. H., & Harding, C. V. (2004). Bacterial heat shock proteins enhance class II MHC antigen processing and presentation of chaperoned peptides to CD4+ T cells. *J.Immunol.*, 173(8), 5130-5137.

Tobian, A. A., Harding, C. V., & Canaday, D. H. (2005). Mycobacterium tuberculosis heat shock fusion protein enhances class I MHC cross-processing and -presentation by B lymphocytes. *J Immunol.*, 174(9), 5209-5214.

Trombetta, E. S., & Mellman, I. (2005). Cell biology of antigen processing in vitro and in vivo. *Annu.Rev Immunol*, 23, 975-1028.

Udono, H., & Srivastava, P. K. (1993). Heat shock protein 70-associated peptides elicit specific cancer immunity. *J.Exp.Med.*, 178(4), 1391-1396.

Vabulas, R. M., Ahmad-Nejad, P., Da Costa, C., Miethke, T., Kirschning, C. J., Hacker, H., & Wagner, H. (2001). Endocytosed HSP60s use toll-like receptor 2 (TLR2) and TLR4 to activate the toll/interleukin-1 receptor signaling pathway in innate immune cells. *J Biol Chem.*, 276(33), 31332-31339.

Vabulas, R. M., Braedel, S., Hilf, N., Singh-Jasuja, H., Herter, S., Ahmad-Nejad, P., Kirschning, C. J., Da Costa, C., Rammensee, H. G., Wagner, H., & Schild, H. (2002). The endoplasmic reticulum-resident heat shock protein Gp96 activates dendritic cells via the Toll-like receptor 2/4 pathway. *J.Biol.Chem.*, 277(23), 20847-20853.

Valli, A., Sette, A., Kappos, L., Oseroff, C., Sidney, J., Miescher, G., Hochberger, M., Albert, E. D., & Adorini, L. (1993). Binding of myelin basic protein peptides to human histocompatibility leukocyte antigen class II molecules and their recognition by T cells from multiple sclerosis patients. *J Clin Invest*, 91(2), 616-628.

Wang, R., Kovalchin, J. T., Muhlenkamp, P., & Chandawarkar, R. Y. (2006). Exogenous heat shock protein 70 binds macrophage lipid raft microdomain and stimulates phagocytosis, processing, and MHC-II presentation of antigens. *Blood*, 107(4), 1636-1642.

Wieten, L., van der Zee, R., Spiering, R., Wagenaar-Hilbers, J., van Kooten, P., Broere, F., & van Eden, W. (2010). A novel heat-shock protein coinducer boosts stress protein Hsp70 to activate T cell regulation of inflammation in autoimmune arthritis. *Arthritis Rheum*, 62(4), 1026-1035.

Yewdell, J. W., Norbury, C. C., & Bennink, J. R. (1999). Mechanisms of exogenous antigen presentation by MHC class I molecules in vitro and in vivo: implications for generating CD8+ T cell responses to infectious agents, tumors, transplants, and vaccines. *Adv Immunol*, 73, 1-77.

York, I. A., & Rock, K. L. (1996). Antigen processing and presentation by the class I major histocompatibility complex. *Annu.Rev Immunol*, 14, 369-396.

Zhu, X., Zhao, X., Burkholder, W. F., Gragerov, A., Ogata, C. M., Gottesman, M. E., & Hendrickson, W. A. (1996). Structural analysis of substrate binding by the molecular chaperone DnaK. *Science.*, 272(5268), 1606-1614.

Zhu, Y., Rudensky, A. Y., Corper, A. L., Teyton, L., & Wilson, I. A. (2003). Crystal structure of MHC class II I-Ab in complex with a human CLIP peptide: prediction of an I-Ab peptide-binding motif. *J Mol Biol*, 326(4), 1157-1174.

Zietara, N., Lyszkiewicz, M., Gekara, N., Puchalka, J., Dos Santos, V. A., Hunt, C. R., Pandita, T. K., Lienenklaus, S., & Weiss, S. (2009). Absence of

IFN-beta impairs antigen presentation capacity of splenic dendritic cells via down-regulation of heat shock protein 70. *J Immunol*, 183(2), 1099-1109.

Zimmer, C., von Gabain, A., & Henics, T. (2001). Analysis of sequence-specific binding of RNA to Hsp70 and its various homologs indicates the involvement of N- and C-terminal interactions. *RNA*, 7(11), 1628-1637.

Zimmer, C., & Henics, T. (2002). Surface binding and uptake of heat shock protein 70 by antigen-presenting cells require all 3 domains of the molecule. *Cell Stress.Chaperones*, 7(3), 243-249.

Zitzler, S., Hellwig, A., Hartl, F. U., Wieland, F., & Diestelkötter-Bachert, P. (2008). Distinct binding sites for the ATPase and substrate-binding domain of human Hsp70 on the cell surface of antigen presenting cells. *Mol Immunol*, 45(15), 3974-3983.

7.2.2 *ABBILDUNGS- UND TABELLENVERZEICHNIS*

Abbildung 2-1 Schematische Struktur von Hsp70.....13

Abbildung 2-2: Schematische Darstellung der Aufnahme und Prozessierung von Hsp70-gebundenem Peptid in einer antigenpräsentierende Zelle17

Abbildung 2-3: Hypothese der Interaktion HSP:Peptid-Komplexe und MHC-II.22

Abbildung 3-1: Vektorkarte von pCR ®2.1-Topo.....38

Abbildung 3-2: Vektorkarte von pET-28a(+)......39

Abbildung 4-1: Schematische Darstellung von Temperatur und Dauer der einzelnen Schritte einer PCR.40

Abbildung 5-1 Aufnahmeversuch über einen Untersuchungszeitraum von 0-11 Stunden62

Abbildung 5-2:Aufnahme verschiedener TT₉₄₇₋₉₆₆ Peptid-Konzentrationen durch Monozyten63

Abbildung 5-3: Aufnahme von chaperonierten Peptiden vs. Peptide nach Optimierung der Versuchsbedingungen.....65

Abbildung 5-4: Aufnahme von FITC markiertem TT₉₄₇₋₉₆₆ in Monozyten.....66

Abbildung 5-5: Durchlichtaufnahme mit FITC-markiertem TT₉₄₇₋₉₆₆68

Abbildung 5-6: Visualisierung der Peptidaufnahme mittels konfokaler Laser Scanning Mikroskopie.....69

Abbildung 5-7 Ko-Lokalisation FITC-markierter Peptide mit dem späten Endosomenmarker CD6371

Abbildung 5-8: Bindung von Biotin-markiertem Hsp70 (°) an HLA-DRB1*0401 ...73

Abbildung 5-9: Schematische Darstellung der Domänen von Hsp70 und Primerlage zur Amplifikation verschiedener Genabschnitte75

Abbildung 5-10: Amplifikation von Hsp70 und Verkürzungsmutationen von Hsp70 mittels PCR.....76

Anhang

Abbildung 5-11 schematische Abbildung der Klonierung von Hsp70, AS und SC in den Expressionsvektor pET28a(+)	77
Abbildung 5-12 Aufreinigung von Hsp70 mittels HPLC und dazugehörige Coomassie-gefärbte SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese	79
Abbildung 5-13: SDS Gele und Western Blot der Aufreinigung der Verkürzungsmutanten AS und SC von Hsp70	80
Abbildung 5-14 Untersuchung der Hintergrundbindung von Biotin-markierten Peptiden	81
Abbildung 5-15: Unterschiedliche Blockierungsmethoden mit und ohne spezifischem anti-Hsp70-Antikörper	83
Abbildung 5-16: Peptid-Bindungsassay der Verkürzungsmutationen AS und SC im Vergleich zu Hsp70 mit Biotin-markiertem (°) CLIP105-117 und HA307–319	84
Abbildung 5-17: Ausschnitt aus der Sequenz von Hsp70A1a (M 11717) mit Lage der Mutationsprimer	86
Abbildung 5-18: Kontroll-PCR der Verkürzungsmutation AS und der Punktmutation A405G und V437G	87
Abbildung 5-19 Schematische Darstellung des Expressionsvektor mit inseriertem HSP70A1A von Qiagen	88
Abbildung 5-20: Western Blot auf Hsp70(1), A405G(2), V437G(3), AS(4)	89
Abbildung 5-21: Bindungsassay von 5 µg/ml Biotin-markiertem(°) TT ₉₄₇₋₉₆₆ und HA307–319 an Hsp70 (Weiß) und Punktmutation A405G (Schwarz)	91
Abbildung 5-22: Bindungsassay von Biotin-markiertem (°) Hsp70 und A405G an HLA-DRB1*0401	91
Abbildung 5-23: Bindungsassay von Biotin-markiertem (°) HA307–319 und CLIP105-117 an Hsp70, A405G, V437G und AS	93
Abbildung 5-24: Bindungsassay von Biotin-markiertem (°) HA307–319, Hsp70, A405G, V437G und AS an HLA-DRB1*0401	95

Anhang

Tabelle 1: Die humanen Hitzeschockproteine der 70kDa Familie.....	12
Tabelle 2: Übersicht über Elongationszeiten und Annealingtemperaturen der angegebenen Primerkombinationen	41

7.2.3 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

°	Biotin-Markierung
%	Prozent
°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
Abb.	Abbildung
AK	Antikörper
APC	Allophycocyanin
APZ	antigenpräsentierende Zelle
Aqua dest.	destilliertes Wasser (<i>Aqua destillata</i>)
AS	Aminosäure(n) oder ATP-Bindedomänen und Substratbindedomänen-Fragment
Biotin-NHS	Biotin-N-Hydroxysuccinimidester
B-LCL	B-Zelllinie (<i>B-lymphoblastoid cell line</i>)
Bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serumalbumin
c	Zenti-
CD	Differenzierungsmarker an der Oberfläche von Zellen (<i>cluster of differentiation</i>)
CIAP	alkalische Phosphatase (<i>calf intestinal alkaline phosphatase</i>)
CLIP	<i>class II-associated invariant chain peptide</i>
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
DC	dendritische Zelle
dCTP	Desoxycytidintriphosphat
DELFLIA	Europium Fluoreszenz Assay (<i>dissociation-enhanced lanthanide fluorescent immunoassay</i>)

Anhang

dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
DMF	Dimethylformamid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DnaK	bakterielles Hsp70, Holomog zu Hsp70
dNTPs	Desoxyribonukleosidtriphosphate
DTT	Dithiothreitol
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
E. coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ER	Endoplasmatisches Retikulum
et al.	und andere (<i>et alii/et aliae</i>)
EU	Endotoxin Unit
FACS	Durchflusszytometrie (<i>fluorescence activated cell sorting</i>)
FBS	Fetales Kälberserum (<i>fetal bovine serum</i>)
FEEL-1	<i>fasciclin, EGF-like, laminin-type EGF-like, and link domain-containing scavenger receptor-1</i>
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FL	Fluoreszenz
FMDV	Maul-und-Klauenseuche Virus (<i>Foot-and-mouth disease virus</i>)
Fmoc	9-Fluorenyl-Methoxycarbonyl
FSC	Vorwärtsstreulicht (<i>forward scatter</i>)
G	Gramm
<i>g</i>	relative Zentrifugalkraft (<i>g-Force</i>)
GAD	Glutaminsäuredecarboxylase
geo mean	Geometrisches Mittel
h	Stunde
HA	Influenza Hämagglutinin

Anhang

HCl	Salzsäure
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-1-Piperazinethansulfonsäure
HLA	humane Leukozytenantigene
HRP	Meerrettichperoxidase (<i>horseradish peroxidase</i>)
HAS	humanes Serumalbumin
HSC	konstitutiv exprimiertes Hitzeschockprotein (<i>heat shock cognate protein</i>)
HSF	Hitzeschocktranskriptionsfaktoren
HSP	Hitzeschockprotein
Ig	Immunglobulin
IHW	<i>International Histocompatibility Congress</i>
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
KLSM	konfokale Laser Scanning Mikroskopie
LB	Nährmedium zur Bakterienaufzucht (<i>lysogeny broth</i>)
LOX-1	<i>lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor-1</i>
LPS	Lipopolysaccharid
M	Molar
M	Milli-
MACS	magnetische Zellsortierung (<i>magnetic cell sorting</i>)
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex (<i>Major Histocompatibility Complex</i>)
min	Minute(n)
ml	Milliliter
N	Nano-
nmol	Nanomol
N	Normalität
n.s.	nicht signifikant
NaN3	Natriumazid

Anhang

Ng	Nanogramm
Ni-NTA	Nickel-Nitrilotriessigsäure
nm	Nanometer
o. g.	oben genannt
PBMCs	periphere mononukleäre Zellen aus dem Blut (<i>peripheral blood mononuclear cells</i>)
PBS	Phosphat-gepufferte Saline (<i>phosphate buffered saline</i>)
PCR	Polymerasekettenreaktion
PE	Phycoerythrin
PerCP	Peridinin-Chlorophyll-Protein Komplex
pH	Säuregrad (potentia Hydrogenii), definiert als der negative dekadische Logarithmus der Wasserstoffionen-Aktivität.
PHS	gepooltes humanes Serum (<i>pooled human serum</i>)
PI	Propidiumiodid
PRR	Oberflächenprotein (<i>pattern recognition receptor</i>)
p-Wert	Signifikanzwert
RNA	Ribonucleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute (<i>rotations per minute</i>)
RPMI	Rosewell Park Memorial Institute
SC	Substratbindedomänen und C-terminus Fragment
SCARF-1	Scavenger receptor class F, member 1
SDS	Natriumlaurylsulfat (<i>sodium dodecyl sulfate</i>)
SDS-PAGE	Natriumlaurylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (<i>sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i>)
SOC	Nährmedium zur Bakterienaufzucht (<i>Super Optimal Broth</i>)
SR	Scavenger Rezeptor

Anhang

SSC	Seitwärtsstreulicht (<i>side scatter</i>)
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TB	Trypanblau
TBS	Tris-gepufferte Salzlösung (<i>Tris-buffered saline</i>)
TFA	Trifluoressigsäure
Th	T-Helfer Zellen
TLR	" <i>toll-like</i> "-Rezeptor
TT	Tetanustoxin
U	Unit
UV	Ultraviolett
vgl.	Vergleiche
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen (<i>weight per volume</i>)
z. B.	zum Beispiel

7.2.4 EINBUCHSTABENCODER DER AMINOSÄUREN

A	Alanin
C	Cystein
D	Asparaginsäure
E	Glutaminsäure
F	Phenylalanin
G	Glycin
H	Histidin
I	Isoleucin
K	Lysin
L	Leucin
M	Methionin
N	Asparagin
P	Prolin
Q	Glutamin
R	Arginin
S	Serin
T	Threonin
V	Valin
W	Tryptophan
Y	Tyrosin

8 ANLAGEN

AUS DIESER ARBEIT HERVORGEGANGENE VERÖFFENTLICHUNGEN:

Schwörer D., Haug M., Kalbacher H., Holzer U. Mutations in the substrate binding site of human heat shock protein 70 (Hsp70) indicate specific interaction with HLA-DR outside the peptide binding groove, *Manuskript zum Einreichen vorbereitet*

KONGRESSBEITRÄGE

Schwörer D., von Manstein V., Holzer U. Uptake of Heat shock protein 70:peptide complexes in antigen-presenting cells and their interaction with MHC II molecules

11th Annual Meeting of the Federation of Clinical Immunology Societies, Washington D.C. USA, 2011,

Schwörer D., Holzer U. Aufnahme von Hsp70:Peptid-Komplexe in antigenpräsentierende Zellen und deren Interaktion mit MHC II-Molekülen

Jährliches Forschungskolloquium der Medizinischen Fakultät, CRONA, Tübingen, 2010

FÖRDERUNGEN

Reisekostenbeihilfe der GlaxoSmithKline Stiftung zur Teilnahme am 11. jährlichen Treffen der *Federation of Clinical Immunology Societies* (FOCIS) in Washington D.C., USA

WISSENSCHAFTLICHE LEHRER

Meine Wissenschaftlichen Lehrer waren die Damen und Herren

Prof. Beifuß, Prof. Binder, Prof. Brennicke, Prof. Dürre, Prof. Ehret, Prof. Eikmanns, Prof. Gottsberger, Prof. Gross, Prof. Kalko (†), Prof. Kazda, Prof. Klotz, Prof. Kuhn, Prof. Mackenstedt, Prof. Marti, Prof. Pfitzner, Prof. Preiss, Prof. Rammensee, Prof. Rassow, Prof. Schaller, Prof. Spindler, Prof. Spindler-Barth, Prof. Steiner, Prof. Strassdeit, Prof. Tschapka, Prof. Wolf.

LEBENS LAUF

Daniela Schwörer	Geburtsdatum:	25. Januar 1983
	Geburtsort:	Stuttgart-Bad Cannstatt
September 1993 – Juni 2002	Johannes-Kepler-Gymnasium, Leonberg	
25. Juni 2002	Allgemeine Hochschulreife	
Oktober 2002 – Juli 2004	Studium der Biologie an der Universität Ulm	
Oktober 2004 – September 2007	Studium der Biologie an der Universität Hohenheim	
Juli 2005 – Oktober 2005	Praktikum bei der Fraunhofer Gesellschaft Stuttgart-Vaihingen im Institut für Grenzflächen- und Bioverfahrenstechnik IGB unter Betreuung von Dr. Kai Sohn	
	Thema: „Knock-out des Gens RBT4 bei Candida albicans“	
Januar 2007 – September 2007	Diplomarbeit an der Universität Hohenheim, Institut für Physiologie und Biotechnologie der Pflanzen	
	Thema: „Analyse der Struktur-Funktions- Beziehungen des Proteins OPR3 durch zielgerichtete Mutationen“	
27. September 2007	Diplom in Biologie	
Oktober 2007 – März 2008	Anstellung als Wissenschaftler bei Professor Arnd G. Heyer an der Universität Stuttgart, Botanisches Institut	

Mai 2008 – Juni 2012	Wissenschaftlicher Angestellter an der Klinik für Kinder- und Jugendmedizin Tübingen, Abteilung I Anfertigung der Naturwissenschaftlichen Doktorarbeit unter Betreuung von Frau Dr. Ursula Holzer Thema „Einfluss von Hitzeschockproteinen auf die MHC II-vermittelte T-Zellantwort - Identifizierung einer weiteren molekularen Bindestelle an Hsp70
Mai 2008 – April 2010	Förderung durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft
Mai 2010 – Oktober 2010	Förderung durch <i>fortune</i>
Seit November 2010	Förderung durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft

WISSENSCHAFTLICHE ZUSAMMENARBEIT

Die Abbildungen 5-1, 5-2, 5-3, 5-7 und 5-8 wurden von Frau Dipl. Biol. Viktoria von Manstein im Zuge der Erarbeitung ihrer Diplomarbeit erstellt und für diese Arbeit teilweise modifiziert. Das Studiendesign dieser Diplomarbeit sowie ihre Betreuung oblagen der Verfasserin dieser Dissertation. Frau Dipl. Biol. Viktoria von Manstein hat einer Verwendung dieser Abbildungen ausdrücklich zugestimmt.

DANKSAGUNG

Herzlichen Dank an Professor Rammensee für die Betreuung und Übernahme des Gutachtens, fachliche Diskussionen, allgegenwärtige Unterstützung in allen Lebenslagen und so manches aufmunternde Wort.

Auch Professor Bruchelt danke ich sehr herzlich für die Übernahme des Zweitgutachters und seine Betreuung, sowie viele gute Hinweise in biochemischen Belangen.

Dr. Hubert Kalbacher danke ich vielmals für die Überlassung von Peptiden, MHCs und die Möglichkeit in seiner Arbeitsgruppe die Aufreinigung von HLA-DR und Herstellung von Peptiden zu erlernen.

Meiner Familie kann ich gar nicht sagen, wie dankbar ich Ihnen für Ihre Hilfe bin. Mama und Papa, Sebastian, der jegliche Kommaregel beherrscht: Danke für eure Korrekturhilfe, Motivation, Layouten, Kaffee und Kippen-Pausen, Asyl, warmes Mittagessen, Fussballsamstage und eure Unterstützung. Hab euch lieb!

Liebster Stephan, danke fürs Da sein, Lesen, Kommentieren, Nackenmassieren, Kaffeeoptimieren, Händchenhalten, dafür, dass Du so geduldig warst, meine Launen ausgehalten und immer daran geglaubt hast, dass ich es schaffe.

Weiterhin danke ich:

- Den Kellerkindern Susanne und Nadja für jedes aufmunternde Wort, Lächeln, diverse Tee- oder Eispausen, Süßigkeitenspenden, Mittagessen-Klatsch und Tratsch, Gespräche zwischen Tür und Angel, Wegweiser aus dem Chaos und gegenseitige Motivation. Und natürlich für dancing Paul!
- Den PedRegMeds und Exil-Tübingern in Hamburg für die Aufnahme in Ihrem Kreis, Diskussionen rund um König Fußball, das herrliche Extraktionsgerät und ihre stets offene Türe.
- Sabine, die niemals müde wurde mir zum hundertsten Mal zu erklären, das man antigenpräsentierende Zellen klein schreibt. Vielen Dank für Korrekturhilfe, offenen Ohren und Taschentücher.
- Meinen kleinen Lieblingen, den Schlawinern Charlie, Lizzy, Sophie, Bobby und Ana für ihre Ablenkung.
- Opeth, Incubus, MoL, Saliva, Adele und Queen für Ihre wundervolle Musik und den Antrieb bei nächtlichen Schreibphasen und im einsamen Baki-Labor.
- All meinen Freunden, die mich die letzten Jahre begleitet haben: Dr. Martin, Sandra, Corinna und ihre Rasselbande u.v.m.
- Vicky, der rasenden Diplomandin, und Aline, der fleißigen Biene, für Ihre Unterstützung.
- dem Meer, denn es trägt den Blick,
den Sternen, denn es lohnt sich nach ihnen zu greifen
und dem Wind, denn er treibt das Boot immer weiter.