

---

Aus dem Institut für Immunologie der Ludwig-Maximilians-Universität  
München

Vorstand: Prof. Dr. rer. nat. Thomas Brocker

**Interaktionen des rekombinanten humanen  
Hitzeschock-Proteins 70 mit dendritischen Zellen  
und deren Funktionen bei  
der Antigenpräsentation und dem T-Zell Priming**

Dissertation zum Erwerb des Doktorgrades der Humanbiologie an der  
Medizinischen Fakultät der Ludwig-Maximilians Universität München

vorgelegt von Henriette Bendz  
aus Zittau

2008

---

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Ludwig-Maximilians Universität  
München

Berichterstatter: Prof. Dr. Judith Johnson  
2. Berichterstatter: Prof. Dr. Josef Müller-Höcker  
Mitberichterstatter: Priv. Doz. Dr. Hans-Joachim Stemmler  
Priv. Doz. Dr. Rudolf A. Rupec

Mitbetreuung durch: Priv. Doz. Dr. Elfriede Nößner  
Dekan: Prof. Dr. med. D. Reinhardt

Tag der mündlichen Prüfung: 31.01.2008

## Inhaltsverzeichnis

<b>1. Einleitung</b> .....	1
1.1. Dendritische Zellen.....	1
1.1.1. Funktionen der dendritischen Zellen im Immunsystem.....	1
1.1.2. Präsentation der Antigene durch dendritische Zellen.....	5
1.1.2.1. MHC-Klasse-II Präsentation.....	5
1.1.2.2. MHC-Klasse-I Präsentation und Kreuzpräsentation.....	6
1.1.3. Dendritische Zellen in der Tumorthherapie.....	8
1.2. Hitzeschock-Protein 70.....	10
1.2.1. Intrazelluläre Funktionen des Hsp70.....	10
1.2.2. Rolle des extrazellulären Hsp70 im Immunsystem.....	11
1.2.2.1. Funktionen des Hsp70 als „Danger Signal“ in der innate Immunstimulation....	11
1.2.2.2. Funktionen von Hsp70 in der adaptiven Immunstimulation.....	11
1.3. Aufgabenstellungen dieser Arbeit.....	13
<b>2. Ergebnisse</b> .....	15
2.1. Reinigung des rekombinanten humanen Hsp70 aus E.coli.....	15
2.2. Proteinchemische Charakterisierung des rekombinanten rhuHsp70.....	16
2.2.1. Identität des gereinigten Proteins.....	16
2.2.2. Reinheit des rhuHsp70.....	17
2.2.3. ATPase Aktivität.....	17
2.2.4. Endotoxingehalt des rhuHsp70.....	18
2.2.5. Surface Plasmon Resonance Spektroskopie.....	19
2.3. Charakterisierung der IL-4/GM-CSF generierten dendritischen Zellen.....	20
2.4. Signalfunktionen des rhuHsp70 bei myeloischen dendritischen Zellen.....	22
2.4.1. Induktion des intrazellulären Calciumioneneinstroms.....	22
2.4.1.1. Nukleotide in den rhuHsp70 Präparationen induzieren in IL-4/GM-CSF generierten DCs ein Calciumsignal.....	22
2.4.1.2. Calciumioneneinstroms durch Nukleotide oder der Nukleotid-haltigen rhuHsp70 Präparation in Monozyten, nicht maturierten und maturierten DCs	31
2.4.1.3. CD32 als Marker für die Sensitivität der DCs hinsichtlich der Aktivierung des Calciumioneneinstroms durch ADP oder der Nukelotid-haltigen rhuHsp70 Präparation.....	34
2.4.2. RhuHsp70 stimuliert nicht die phänotypische Maturierung der DCs.....	37
2.4.2.1. Klassische Oberflächenmarker.....	37

## Inhaltsverzeichnis

---

2.4.2.2. Chemokinrezeptoren.....	40
2.4.3. RhuHsp70 stimuliert DCs nicht zur Sekretion von Zytokinen.....	42
2.4.3.1. LPS Verunreinigungen in den rhuHsp70 Präparationen induzieren die Sekretion von Zytokinen.....	43
2.4.4. RhuHsp70 verändert nicht die Makropinozytosekapazität der DCs.....	44
2.5. RhuHsp70 in der Kreuzpräsentation von exogenen Peptidantigenen.....	46
2.5.1. RhuHsp70 verstärkt die Kreuzpräsentation von b-pep70-MART-1 und b-pep70-Tyr durch DCs.....	47
2.5.2. RhuHsp70 verstärkt die Kreuzpräsentation von b-pep70-MART-1 und b-pep70-Tyr durch eine B-Lymphozyten-Zelllinie.....	51
2.5.3. Die rhuHsp70 vermittelte Verstärkung der Kreuzpräsentation ist proximal von Antigen-Prozessierung und intrazellulären Präsentationswegen .....	52
2.5.4. ADP inhibiert die Kreuzpräsentation des b-pep70-MART-1 Peptides.....	56
2.6. Quantifizierung der intrazellulären Menge an Peptidantigen in DCs und B-LCL... 59	
2.7. T- Zell Priming mit rhuHsp70:Peptid Komplexen.....	61
2.7.1. Quantifizierung der IFN- $\gamma$ sezernierenden Zellen nach dem Priming mittels Elispot.....	62
2.7.2. Quantifizierung der Perforin sezernierenden Zellen nach dem Priming mittels Elispot.....	67
2.7.3. Quantifizierung der MART-1 spezifischen CD8 <sup>+</sup> T-Zellen mittels Tetramer Färbung.....	68
2.7.4. Zusammensetzung der geprimten Zellpopulation.....	70
2.7.4.1. Prozentualer Anteil der CD3 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup> T-Zellen nach dem Priming.....	70
2.7.4.2. Prozentualer Anteil der CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> Zellpopulationen nach dem Priming.....	73
2.7.4.3. Anteil der FOXP3 <sup>+</sup> Zellen innerhalb der CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> T-Zellpopulation .....	75
2.7.4.4. Anteil der CD25 <sup>++</sup> FOXP3 <sup>+</sup> T-Zellen innerhalb der CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> T-Zellpopulation.....	77
2.7.4.5. Quantifizierung der NK-Zellen.....	78
<b>3. Diskussion.....</b>	<b>80</b>
3.1. Reinigung und Analyse des Hsp70.....	80
3.2. Nukleotide in der rhuHsp70 Präparationen induzieren ein Calciumsignal in DCs.....	81
3.3. Funktionen von rhuHsp70 in der innaten Aktivierung von DCs und der Kreuzpräsentation von Peptidantigenen.....	83
3.4. Funktionen von rhuHsp70 bei dem Priming von T-Zellen.....	88
3.5. Bewertung des rhuHsp70 für den Einsatz in der Therapie und Perspektiven.....	92

<b>4. Zusammenfassung</b> .....	94
<b>5. Methoden</b> .....	96
5.1. Proteinchemische Methoden.....	96
5.1.1. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-Page).....	96
5.1.2. Coomassie-Färbung von Proteingelen.....	97
5.1.3. Silberfärbung von Proteingelen.....	97
5.1.4. Proteinbestimmung nach Bradford.....	98
5.1.5. Western Blot.....	99
5.2. Herstellung des rekombinanten humanen Hsp70.....	100
5.2.1. E.coli Kultur .....	100
5.2.2. Aufschluss der E.coli Bakterien.....	100
5.2.3. Fällung der wasserlöslichen Proteine.....	100
5.2.4. Reinigung der Proteine durch Säulenchromatographie.....	101
5.2.4.1. Anionenaustauschchromatographie.....	101
5.2.4.2. Affinitätschromatographie.....	101
5.2.5. Aufkonzentrierung von Proteinen.....	102
5.2.6. Pufferaustausch.....	102
5.2.7. Entfernung der Endotoxine.....	102
5.2.8. Puffer für die Reinigung des rhuHsp70.....	103
5.3. Biochemische Charakterisierung des rhuHsp70.....	104
5.3.1. Bestimmung des Endotoxingehaltes.....	104
5.3.2. Bestimmung der freien Nukleotide.....	104
5.3.3. Bestimmung der ATPase-Aktivität.....	104
5.3.4. Surface Plasmon Resonance Spectroscopy (BIACORE Messung).....	105
5.4. RhuHsp70:Peptide Komplexes für die Kreuzpräsentation.....	106
5.4.1. Bildung des rhuHsp70:Peptide Komplexes für die Kreuzpräsentation.....	106
5.4.2. Berechnung des Peptidanteiles in Komplex mit rhuHsp70.....	106
5.5. Zellbiologische Methoden.....	107
5.5.1. Allgemeine Bemerkungen.....	107
5.5.2. Bestimmung der Zellzahl.....	107
5.5.3. Einfrieren von Zellen.....	107
5.5.4. Auftauen von Zellen.....	107
5.5.5. Gewinnung von Monozyten aus Vollblut .....	107
5.5.5.1. Gewinnung von Monozyten aus Vollblut durch positive Isolierung.....	107
5.5.5.2. Gewinnung von Monozyten aus Vollblut durch negative Isolierung.....	108

## Inhaltsverzeichnis

---

5.5.6. Generierung der dendritischen Zellen.....	109
5.5.7. Maturierung der dendritischen Zellen.....	109
5.5.8. Kultivierung der zytotoxischen T-Zellen MART A42 und TyrF8.....	109
5.5.9. Herstellung CCR5 positiver Monozyten.....	110
5.5.10. Kultivierung der B-Zelllinien.....	110
5.5.11. Kultivierung der Tumorzelllinien.....	110
5.6. Analytische Methoden der zellbiologischen Versuche.....	110
5.6.1. Quantifizierung der Zytokine nach Stimulation der DCs.....	110
5.6.2. Durchflusszytometrie.....	111
5.6.2.1. Allgemeines.....	111
5.6.2.2. Färbung der Moleküle auf der Zelloberfläche.....	112
5.6.2.3. Indirekte Färbung der MHC-Klasse I Oberflächenmoleküle.....	112
5.6.2.4. Indirekte Färbung der CCR7 Oberflächenmoleküle.....	112
5.6.2.5. Intrazelluläre Färbung von FOXP3.....	112
5.6.2.6. Markierung der toten Zellen.....	113
5.6.2.7. Analyse der intrazellulären Menge des b-pep70-Tyr Peptides.....	113
5.6.2.8. Intrazelluläre Calcium Analyse.....	113
5.6.2.9. Untersuchung der Makropinozytose der DCs.....	114
5.6.3. Kreuzpräsentation.....	114
5.6.4. Priming von T-Zellen.....	115
5.6.4.1. Quantifizierung von IFN- $\gamma$ und Perforin sezernierenden Zellen mit dem Elispot.....	115
5.6.4.2. FACS Analyse.....	116
5.6.4.3. Tetramer Färbung.....	116
5.7. Statistik.....	116
<b>6. Material.....</b>	<b>117</b>
6.1. Geräte und Verbrauchsmaterial.....	117
6.1.1. Geräte.....	117
6.1.2. Verbrauchsmaterial.....	118
6.2. Reagenzien.....	119
6.2.1. Reagenzien für die E.coli Kultur.....	119
6.2.2. Reagenzien für die Reinigung und Analytik der Proteine.....	119
6.2.3. Reagenzien für die zellbiologischen Versuche.....	120
6.2.4. Medien, Medienzusätze.....	121
6.2.5. Testkits.....	121

## Inhaltsverzeichnis

---

6.2.6. Antikörper und sekundäre Färbereagenzien.....	122
6.3. Proteine und Peptide.....	123
6.4. Zytokine.....	123
6.5. Zelllinien.....	123
<b>7. Literaturverzeichnis.....</b>	<b>125</b>
<b>8. Abkürzungen.....</b>	<b>158</b>
<b>9. Danksagung.....</b>	<b>160</b>
<b>10. Lebenslauf.....</b>	<b>161</b>

---





## 1. Einleitung

### 1.1. Dendritische Zellen

Dendritische Zellen (*dendritic cells*; DCs) sind multifunktionelle Antigen-präsentierende Zellen (*antigen presenting cells*, APCs), die in lymphoiden, nicht-lymphoiden Geweben, in peripherem Blut und afferenten Blutgefäßen vorkommen [1]. Sie wurden zum ersten Mal 1973 von Steinman und Cohn [2] beschrieben, die in den peripheren Lymphgeweben eine Zelle identifizierten, die sich durch einzigartige dendritenähnlichen Extensionen von den anderen Zellen unterschied. DCs stammen von hämatopoetischen Stammzellen des Knochenmarks. Die Vorläuferzellen aus dem Knochenmark gelangen mit dem Blut in die peripheren Gewebe, wo sie durch Wachstumsfaktoren wie GM-CSF, IL-4, IL-15, TNF- $\alpha$  oder TGF- $\beta$  zu bestimmten DCs differenziert werden. Diese Wachstumsfaktoren werden von verschiedenen Zelltypen wie den Endothelzellen, Mastzellen, Keratinozyten oder Fibroblasten sezerniert. Allgemein werden Langerhans DCs, interstitiale DCs und plasmazytoide DCs unterschieden, die sich abhängig von den vorhandenen Zytokinen entwickeln [3,4,5].

#### 1.1.1. Funktionen der dendritischen Zellen im Immunsystem

Der Schutz und die Abwehr von Pathogenen ist das Ergebnis aus dem Zusammenspiel zwischen den innaten und adaptiven Reaktionen des Immunsystems.

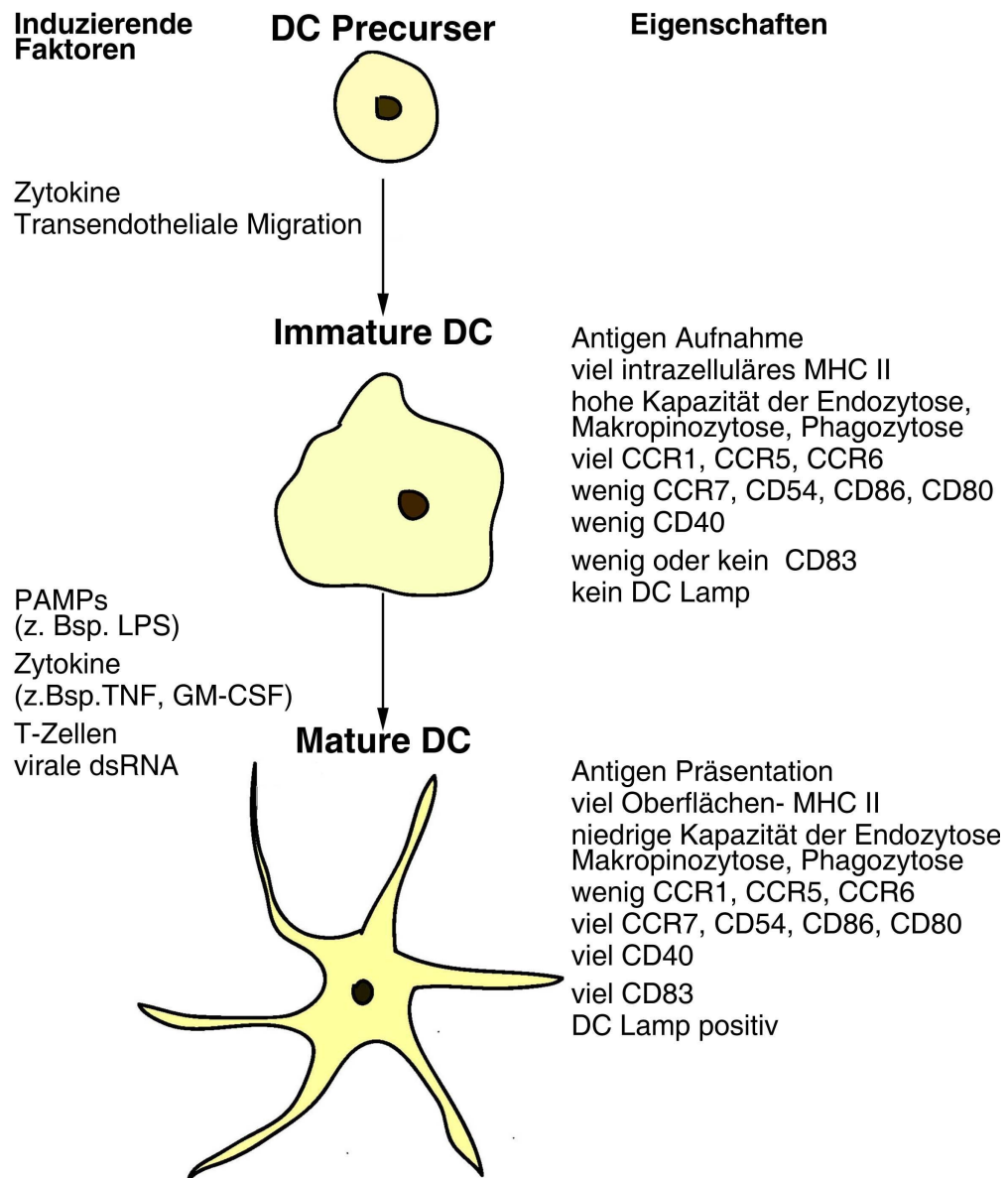
Die DCs sind zentrale Mediatoren, die durch die Integration der innaten und adaptiven Signale die Art der Immunantwort bestimmen [6]. Sie haben umfassende Funktionen beim Priming der T-Zellen und sind an Prozessen zur Aufrechterhaltung der Toleranz beteiligt. Unter Priming versteht man die Aktivierung und klonale Vermehrung naiver T-Zellen nach erstmaligem Antigenkontakt. Außerdem spielen die DCs beim Überleben naiver CD4<sup>+</sup> T-Zellen und der Bildung von T-Gedächtniszellen eine Rolle [7,8]. Auf die humorale Immunantwort haben die DCs über direkte oder indirekte Aktivierung von den B-Zellen Einfluss. Sie vermitteln die Interaktion von CD4<sup>+</sup> T-Zellen und B-Zellen, können die Differenzierung der B-Zellen zu IgG sezernierenden Zellen und Plasmazellen fördern und sind an der Induktion des Isotypenwechsels beteiligt [9-11]. Darüber hinaus können DCs die natürlichen Killer-Zellen (NK-Zellen) aktivieren. Durch Freisetzung von Zytokinen, wie IL-12, können sie die Zytotoxizität dieser Zellen steuern [12,13]. Aktivierte NK-Zellen können wiederum Signale an die DCs geben, die deren Maturierung fördern.

Nach dem allgemeinen Paradigma werden die Funktionen der DCs abhängig von ihrem Maturierungszustand erklärt. Im immunologischen *steady-state* überwachen immature

DCs in den peripheren Geweben die Umgebung und signalisieren durch Pathogene ausgelöste Gefahren anderen immun-kompetenten Effektorzellen wie den T-Zellen oder NK-Zellen [1,6]. DCs sind die Zellen, die am effizientesten Antigene präsentieren. Durch Rezeptor vermittelte Endozytose, Phagozytose oder Makropinozytose nehmen sie Antigene aus der Peripherie auf und laden sie nach intrazellulärer Prozessierung auf die Haupt-Histokompatibilitäts-Moleküle (*major histocompatibility complex*, MHC-Moleküle). Über eine Reihe von Rezeptoren (PRRs: *Pattern recognition receptors*), die die von Pathogenen stammenden Moleküle erkennen, können DCs maturiert werden. Zu diesen Rezeptoren gehören die *Toll-like* Rezeptoren TLR-2, TLR-3, TLR-4, TLR-5, TLR-5, TLR-8 und 9, die spezifisch die als PAMPS (*pathogen-associated molecular patterns*) bezeichneten Moleküle wie LPS, Flagellin, CpG DNA und Lipoproteine binden [14,15]. Über bestimmte C-Typ Lektine, wie den Mannoserezeptoren, DEC-205 und DC-Sign (CD209) werden Kohlenhydratstrukturen auf den Pathogenen erkannt [16]. Die Maturierung kann auch durch proinflammatorische Signale wie TNF, IL-6 oder Prostaglandine in der lokalen Umgebung induziert werden. Hierbei spielt das Gleichgewicht zwischen den proinflammatorischen und antiinflammatorischen Zytokinen eine wesentliche Rolle. Die maturen DCs migrieren anschließend in die lymphatischen Gewebe und aktivieren dort naive T-Zellen, die darauf klonal proliferieren und sich zu Effektorzellen entwickeln.

Die durch die Maturierung veränderten Eigenschaften der DCs betreffen die Expression von Oberflächenmolekülen, die Zytokinsekretion, Makropinozytoseeigenschaften und Migrationsfähigkeiten [6]. Wie in Abbildung 1.1 dargestellt, lassen sich die maturen DCs phänotypisch durch hohe Expression von CD80, CD86, CD40, CD83 und den MHC-Molekülen beschreiben. CD80 und CD86 aktivieren durch Bindung an CD28 die klonale Vermehrung der naiven T-Zellen [17]. CD40Ligand (CD40L) der T-Zellen steigert über CD40 auf den DCs in einem positiven *Feed back loop* die Aktivierung. Bei der Aktivierung der zytotoxischen Effektorzellen kann eine hohe Expression von CD40 die erforderlichen T-Helferzellen ersetzen [18].

Außerdem exprimieren die maturen DCs Moleküle, die ihre Migration regulieren, wie CCR7 und CD38 [19]. Die Makropinozytose der maturen DCs ist im Vergleich zu den immaturren DCs stark reduziert.



**Abbildung 1.1** Aktivierung der DCs nach Banchereau et al. [6]. Die linke Seite zeigt Faktoren wodurch die Entwicklung der DCs induziert wird. Die rechte Seite zeigte die Eigenschaften der DCs in dem jeweiligen Differenzierungs- bzw. Maturierungsstatus.

Die Art und Funktion der durch das Priming sich entwickelnden T-Zellen wird durch drei Signale bestimmt, die von den DCs gegeben werden [20]. Signal 1 erhält die T-Zelle über die Erkennung des MHC-Peptid Komplexes durch den T-Zell Rezeptor. Signal 2 beinhaltet die Costimulation und spielt eine Rolle bei der klonalen Proliferation, der Differenzierung in die Effektorzellen und Entstehung der Gedächtniszellen. Als Signal 2 werden zum Beispiel die auf den maturated DCs hoch exprimierten B7-Moleküle, CD80 und CD86, bezeichnet [21]. Die Differenzierung in eine bestimmte Effektorzelle ( $T_H1$ -Helferzelle,  $T_H2$ -Helferzelle oder zytotoxische T-Zelle) wird durch das Signal 3 [22,23]

bestimmt. Signal 3 wird zum Beispiel durch bestimmte Zytokine bereitgestellt. So aktiviert Interleukin-12 (IL-12) die Differenzierung in  $T_H1$ -Zellen und IL-4 die Differenzierung in  $T_H2$ -Zellen. Auch Oberflächenmoleküle, wie der Notch Ligand für die  $T_H2$  Entwicklung, können als Signal 3 die Differenzierung bestimmen [24,25].

DCs aktivieren nicht nur T-Zellen, sondern spielen auch eine wichtige Rolle bei der Aufrechterhaltung der peripheren Toleranz [1,6]. Die DCs, die zur peripheren Toleranz beitragen, werden zur Unterscheidung zu den immunogenen Zellen als regulatorische DCs bezeichnet und umfassen verschiedene Subtypen, die sich durch phänotypische Charakteristika, Funktionen und Lokalisationen unterscheiden [26].

Einige Studien zeigten, dass auch ohne die Pathogen induzierte Maturierung CD11c positive DCs kontinuierlich zu den Lymphknoten wandern [27-30]. Diese immaturen oder semimaturen DCs können die Entwicklung der regulatorischen  $CD4^+$  T-Zellen steuern. Diese Funktion zur Aufrechterhaltung der peripheren Toleranz ist jedoch nicht an den immaturen Phänotyp der DCs gebunden. Die Entwicklung adaptiver regulatorischer T-Zellen kann auch durch mature DCs mit hoher Expression der costimulatorischen Moleküle und den typischen Migrationseigenschaften gesteuert werden [20,31,32]. Aus der hohen Expression der Maturierungsmarker CD40, CD80, CD86 und den MHC Molekülen lässt sich demnach nicht auf die immunogene Funktion der DCs schließen. Daher ist es als kritisch zu bewerten, aus dem Phänotyp der DCs bestimmte Funktionen abzuleiten [20].

Die Funktionen der DCs sind durch eine hohe Plastizität gekennzeichnet. Viele costimulatorischen Moleküle, einschließlich CD80 und CD86, können die Aktivierung der T-Zellen nicht nur induzieren sondern auch eindämmen. Bis jetzt ist kein Marker beschrieben, der ausschließlich immunogene DCs charakterisiert [20]. Auch eine bestimmte Kombination der bereits bekannten Marker und Eigenschaften, die einzigartig für die Induktion einer bestimmten Immunantwort ist, ist nicht bekannt. Da sich die finale Funktion nicht aus dem Phänotyp oder der Lokalisation der DCs ableiten lässt, ist es notwendig diese Zellen durch die eingesetzten Signale und der daraus resultierenden Immunantwort zu beschreiben.

Möglicherweise bestimmt nicht der qualitative Phänotyp, sondern feine quantitative Unterschiede in der Expression bestimmter Marker und die Kombination aus diesen, die resultierende Modulation des Immunsystems [20]. Wahrscheinlich können auch von den DCs unabhängige Faktoren, wie ein spezielles Milieu in dem betreffenden Kompartiment und Interaktionen mit verschiedenen Zellen, die durch die DCs induzierte Immunantwort modifizieren [33-36].

### 1.1.2. Präsentation der Antigene durch dendritische Zellen

Signal 1, die Präsentation von Antigenen, ist für die Induktion der Immunität als auch der Toleranz nötig. Die Antigenpräsentation erfolgt nach der Prozessierung der aufgenommenen Proteine und der Beladung der daraus resultierenden Peptide auf Glykoproteine, den MHC-Molekülen. MHC-Moleküle treten in zwei Klassen auf. Die MHC-Klasse-I Moleküle kommen auf allen kernhaltigen Zellen vor und präsentieren Antigenpeptide (9-11 Aminosäuren), die von intrazellulären Proteinen stammen, den CD8<sup>+</sup> T-Zellen. MHC-Klasse-II Moleküle werden nur von den Antigen-präsentierenden Zellen (DCs, Makrophagen und B-Zellen) gebildet und präsentieren von exogenen Proteinen stammende Peptide (10-30 Aminosäuren) den CD4<sup>+</sup> T-Zellen. Die humanen MHC Moleküle werden als Humanes-Leukozyten-System (HLA) bezeichnet.

#### 1.1.2.1. MHC-Klasse-II Präsentation

Lösliche und partikuläre Proteinantigene werden von den DCs aufgenommen und in endosomalen/lysosomalen Kompartimenten zu Peptiden abgebaut. Die Endosomen und Lysosomen enthalten Proteasen, die bei niedrigem pH-Wert aktiv sind und die Proteinantigene spalten. Bei dieser Prozessierung der aufgenommenen Antigene spielen Cysteinproteasen, die Cathepsine, eine wichtige Rolle. Die aus der Prozessierung resultierenden Peptide werden in den Kompartimenten auf MHC-Klasse-II Moleküle geladen [37-39].

Die von den DCs synthetisierten MHC-Klasse-II Moleküle befinden sich wie andere Glykoproteine der Zelloberfläche zunächst im Endoplasmatischem Retikulum (ER). Im ER erfolgt die Assoziation der MHC-Klasse-II Moleküle mit einem Protein, das als invariante Kette bezeichnet wird [40,41]. Die invariante Kette verhindert, dass Peptide aus dem ER an die MHC-Klasse-II Moleküle binden und ist an dem Transport von MHC-Klasse-II Moleküle zu dem endosomalen/lysosomalen Kompartimenten beteiligt. Die MHC-II-haltigen Kompartimente werden als MIIC (*MHC class II containing compartments*) bezeichnet [42,43]. Dort wird die invariante Kette von Proteasen abgebaut. Zurück bleibt ein kurzes Peptidfragment, das noch an die MHC-Klasse-II Moleküle gebunden ist. Dieses Fragment wird als Clip bezeichnet. Mit Hilfe eines MHC-II ähnlichen Moleküls, HLA-DM, erfolgte nach Verdrängung des Clip-Fragmentes die Bindung des Antigenpeptides an die MHC-Klasse-II Moleküle. Anschließend wird der Peptid:MHC-II Komplex an die Zelloberfläche gebracht.

Die MHC-Klasse-II Präsentation ist vom Maturierungsstatus der DCs abhängig [44,45].

Unter anderem wird der proteolytische Abbau der invarianten Kette und der Protein-

antigene durch die Maturierung beeinflusst. So wird ein Inhibitor der Cathepsine nach Stimulation der Maturierung abreguliert und dadurch die proteolytische Aktivität gesteigert, was zur erhöhten Degradation der invarianten Kette und der aufgenommenen Proteine führt [46,47]. Viele endolysosomale Proteasen haben ihr Aktivitätsoptimum bei einem niedrigen pH-Wert. Durch Maturierung wird der endolysosomale pH-Wert unter 5 abgesenkt, was somit ebenfalls zu einer gesteigerten proteolytischen Aktivität führt [48].

### 1.1.2.2. MHC-Klasse-I Präsentation und Kreuzpräsentation

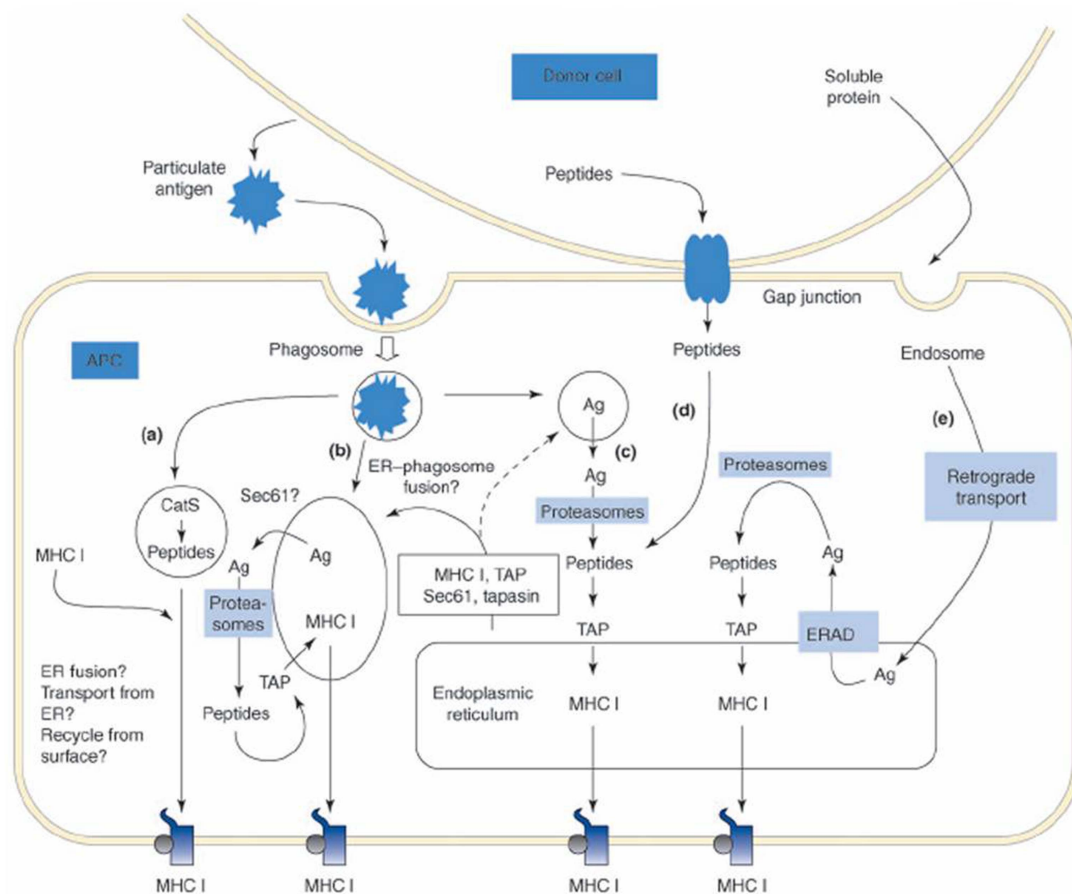
#### MHC-Klasse-I Präsentation

Peptide, die normalerweise über MHC-Klasse-I Moleküle auf der Zelloberfläche präsentiert werden, stammen aus endogenen Proteinen. Ein großer Anteil dieser Peptide entsteht bei dem proteolytischen Abbau von Proteinen durch das Proteasom. Die resultierenden Peptide werden aktiv aus dem Zytosol über die TAP-Moleküle (*transporter associated with antigen presentation*) in das ER transportiert. Dort werden sie an die MHC-Klasse-I Moleküle gebunden [49]. Dieser Peptid:MHC-I Komplex wird an die Zelloberfläche gebracht.

#### Kreuzpräsentation

Die DCs sind in der Lage neben den Peptiden aus eigenen endogenen Proteinen auch Peptide aus exogenen aufgenommenen Proteinen auf die MHC-Klasse-I Moleküle zu laden und den CD8<sup>+</sup> T-Zellen zu präsentieren. Dieser Prozess wird Kreuzpräsentation genannt. Besondere Relevanz hat die Kreuzpräsentation bei der Induktion von Immunität gegen Pathogene, deren Antigene nicht von den DCs selbst synthetisiert werden. Bei einer Virusinfektion von nicht-hämatopoetischen Zellen können von diesen infizierten Zellen freigesetzte virale Antigene über diesen Weg von den DCs aufgenommen und präsentiert werden, was zur Induktion der spezifischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen führt [50]. Eine zweite Situation, für die die Kreuzpräsentation von Bedeutung ist, liegt vor, wenn die DCs bei der Virusinfektion in ihren Funktionen gestört werden [51]. Gesunde DCs können durch Phagozytose die infizierten Zellen aufnehmen und zytotoxische CD8<sup>+</sup> T-Zellen aktivieren. Somit kann die Inhibition durch den Virus umgangen werden.

Exogene Antigene können auf verschiedenen Wegen auf MHC-Klasse-I geladen werden [52,53] (Abb. 1.2).



Shen et al.; Current Opinion Immunology ,Vol.18; 1; Feb. 2006

**Abbildung 1.2** Mechanismen der Kreuzpräsentation nach Shen et al.. (a) Vakuolärer Weg (b) Phagosom-Zytosol-Phagosom Weg mit ER-Phagosomen Fusion (c) Phagosom-Zytosol Weg (d) Gap junction Weg (e) Endosom-ER Weg mit Beteiligung des ERAD-Systems.

Ein Hauptweg führt das Antigen aus dem Phagosom oder Endosom ins Zytosol (Phagosom-Zytosol-Weg). Dort wird es durch das Proteasom hydrolysiert und die resultierenden Peptide werden über die TAP-Moleküle in das ER transferiert, wo sie auf das MHC-Klasse-I Molekül geladen werden [54]. Der Mechanismus, wie das Antigen ins Zytosol gelangt, ist unklar.

Einige Gruppen beschrieben, dass das ER mit den Phagosomen fusionieren kann und so ein Kompartiment entsteht, das alle für die MHC-Klasse-I Beladung wichtigen Moleküle enthält (Phagosom-Zytosol-Phagosom-Weg) [55-58]. Das aufgenommene Antigen muss auch bei diesem Weg zunächst in das Zytosol gelangen, um durch das Proteasom gespalten zu werden. Die ER-Phagosomen Fusion ist umstritten [59].

Für einige Antigene ist gezeigt, dass sie unabhängig von TAP und dem Proteasom präsentiert werden können [60]. Bei diesem vakuolären Weg werden die Peptide durch



Proteasen, wie Cathepsin S, direkt in den Endosomen bzw. Phagosomen generiert. Die so entstandenen Peptide können anschließend von MHC-Klasse-I gebunden werden, das durch Recycling von der Zelloberfläche in das Endosom gelangt.

Bei der Kreuzpräsentation von löslichen Antigenen können auch Komponenten, die mit dem ERAD-System (*ER-associated degradation*) assoziiert sind, involviert sein [61]. Die Antigene gelangen zunächst in das ER und von dort aus erfolgt eine Retrotranslokation in das Zytosol (Endosom-ER-Weg). Diese Retrotranslokation, die bei dem Abbau von mißgefalteten Proteinen von Bedeutung ist, ist auch als relevant für die Kreuzpräsentation von Antigenen beschrieben [62]. Untersuchungen belegen, dass für den Transport vom ER in das Zytosol der Sec61 Kanal benutzt wird [63].

Die Kapazität der Kreuzpräsentation wird durch die Aktivierung/ Maturierung der DCs modifiziert. Wilson et al. zeigten, dass einmal aktivierte DCs nicht mehr nach erneuter Antigengabe über Kreuzpräsentation CD8<sup>+</sup> T-Zellen primen konnten [64]. Als physiologischer Sinn dieser Beobachtung wird diskutiert, dass der Fokus auf Antigene gelegt wird, die von dem Pathogen stammen, das auch die Aktivierung der DCs auslöste [64]. Die Kreuzpräsentation weiterer nicht Pathogen assoziierter Antigene ist nach der Aktivierung nicht mehr möglich. Hierbei ist das Zeitfenster, in dem die Antigenaufnahme und Aktivierung erfolgte, von entscheidender Bedeutung. Die Inhibition der Kreuzpräsentation von exogenen Antigenen steht im engen Zusammenhang mit verschiedenen Prozessen, die im Laufe der DC-Maturierung verändert werden. Zum Beispiel werden wichtige Aufnahmeprozesse wie Makropinozytose und Phagozytose durch Maturierung stark reduziert [6]. Zusätzlich zu den Aufnahmeprozessen sind weitere Mechanismen an der Regulierung beteiligt. So erfolgt der erforderliche Transport der Antigene aus dem Endosom in das Zytosol vorzugsweise in frühen immaturen, nicht aber in maturen DCs [65]. Außerdem weisen die maturen DCs eine gesteigert proteolytische Aktivität in den endolysosomalen Kompartimenten auf, was zu vermehrten Degradation von Proteinen und Peptiden führt [48]. Somit können die erforderlichen Peptide bereits abgebaut sein, bevor sie auf die MHC-Klasse-I Moleküle geladen werden konnten.

### 1.1.3. Dendritische Zellen in der Tumorthherapie

Ein Ziel von Immuntherapien gegen Tumore ist die Induktion von tumorspezifischen CD8<sup>+</sup> Effektor T-Zellen. Diese sollen Peptide, die auf den Tumorzellen im Komplex mit MHC-Klasse-I präsentiert werden, erkennen und daraufhin die Tumorzellen abtöten. Tumorzellen können im Komplex mit MHC-Klasse-I Peptide aus spezifischen Tumor assoziierte Antigenen (TAAs) auf ihrer Oberfläche den CD8<sup>+</sup> T-Zellen präsentieren. Diese

TAAAs lassen sich in mindestens sechs verschiedene Klassen einteilen. Dazu gehören tumorspezifische mutierte Onkogene oder Tumorsuppressoren, Proteine, deren Gene nur in Keimzellen exprimiert werden, Differenzierungsantigene, Proteine, die nach der Translation anomal modifiziert sind, und onkovirale Proteine [66,67]. Peptide aus diesen spezifischen Proteinen werden normalerweise nicht oder nicht in für die T-Zell-Erkennung notwendigen Konzentrationen auf gesunden Zellen präsentiert.

Bei der Generierung von CD8<sup>+</sup> Effektor T-Zellen, die spezifisch für diese TAAAs sind, ist eine Schwierigkeit, dass Tumorzellen normalerweise als körpereigene Strukturen nicht vom immunkompetenten Zellen angegriffen werden. Mit einer DC-basierten Immuntherapie wird versucht die Toleranz gegenüber dem Tumor zu brechen [68-70]. Wesentlich dabei sind die effiziente Präsentation der Peptide von den TAAAs und eine Aktivierung der DCs, die letztlich zur Aktivierung von zytotoxischen tumorspezifischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen führt. Daher liegt der Fokus der derzeitigen Entwicklungen einer durch DCs vermittelten Therapie unter anderem auf der Administration der Antigene und der adjuvanten Aktivierung der DCs. Da die DCs sehr effizient Peptide von exogenen Antigenen über Kreuzpräsentationswege auf MHC-Klasse-I laden, ist es eine Möglichkeit, das Tumorantigen den DCs direkt zur Aufnahme zu geben.

Im Tiermodell wurde gezeigt, dass DCs, die mit TAAAs beladen wurden, eine protektive Immunantwort gegen den Tumor induzierten [71-75]. Vorläufige positive Daten gibt es aus den ersten DC-basierten Anwendungen im Menschen [76-79]. Aber die klinische Effizienz dieser Therapie ist noch nicht befriedigend. Um diese zu verbessern, wird versucht, die Prozesse der Antigenaufnahme und die DC-Aktivierung zu optimieren.

## 1.2. Hitzeschock-Protein 70

### 1.2.1. Intrazelluläre Funktionen des Hsp70

Hitzeschock-Proteine (Hsp) sind phylogenetisch konservierte Proteine, die in verschiedenen Kompartimenten aller prokaryotischen und eukaryotischen Zellen vorkommen. Hsps sind molekulare Chaperone mit umfassenden Funktionen bei der Faltung und intrazellulärem Transport von Proteinen. Sie werden entsprechend ihrer molekularen Massen als Hsp40, Hsp70, Hsp90 usw. bezeichnet. In Eukaryoten sind die Mitglieder der Hsp70-Familie im Zytosol, in den Mitochondrien und dem Endoplasmatischen Retikulum lokalisiert. Das zytosolische Protein hat zwei Isoformen, eine 73-kD Form, die konstitutiv exprimiert wird (=Hsc70) und eine 72-kD Stress-induzierte Form (=Hsp70) [80]. Hsp70 Proteine sind zentrale Komponenten in dem Netzwerk der Chaperone. Bei der Faltung von Proteinen sind für Hsp70 drei hauptsächliche Funktionen beschrieben: Verhinderung von Aggregation, Unterstützung der Faltung und Auflösung und Rückfaltung von aggregierten Proteinen [80,81]. Durch die Bindung von Hsp70 an kurze hydrophobe Segmente in partiell gefalteten Polypeptiden wird Aggregation verhindert und der Faltungsprozess arretiert [82,83]. Speziell Hsp70 kann an Sequenzen der aus dem Ribosom kommende Polypeptidkette binden, wodurch sich das bereits synthetisierte Polypeptid nicht mehr spontan allein aufgrund der energetischen Bilanz falten kann. Darüber hinaus spielt Hsp70 bei der Auflösung von funktionellen Proteinkomplexen wie den *clathrin coats*, viralen Kapsiden und Nukleotidprotein-Komplexen eine Rolle [81,84].

Intensiv untersuchte Strukturen, durch die die Funktionen des Hsp70 reguliert werden, sind die N-terminale ATPase-Domäne und eine kleinere C-terminale Peptid-Bindungs-Domäne. Die meisten Daten über die Struktur der Peptid-Bindungs-Domäne existieren für das Hsp70 aus *E.coli*, das als DnaK bezeichnet wird. Kristallstrukturdaten zeigen, dass diese Domäne aus zwei strukturellen Einheiten besteht [85-87]. Das Peptid wird durch hydrophobe Wechselwirkungen und Wasserstoffbrückenbindungen in einem durch eine  $\beta$ -Sandwich-Struktur gebildeten Spalt gehalten, der durch eine  $\alpha$ -helikale Subdomäne verschlossen werden kann. Es ist sehr wahrscheinlich, dass diese „geschlossene“ Struktur vorliegt, wenn ADP gebunden ist. Das würde erklären, warum Hsp70 mit gebundenem ADP eine hohe Affinität zu Peptiden aufweist und der Austausch dieser Substrate sehr langsam abläuft. Im Gegensatz dazu binden und dissoziieren die Peptide sehr schnell, wenn ATP gebunden ist [88-90]. Der Mechanismus der durch die Nukleotide kontrollierten Öffnung und Schließung der Bindungsdomäne ist nicht vollständig geklärt. An der Regulation der Bindung und Dissoziation der Peptide sowie dem Austausch der

Nukleotide sind Cochaperone, wie das Hsp40, beteiligt [91-93].

## **1.2.2. Rolle des extrazellulären Hsp70 im Immunsystem**

### **1.2.2.1. Funktionen des Hsp70 als „Danger Signal“ in der innate Immunstimulation**

Unter normalen Bedingungen ist Hsp70 intrazellulär lokalisiert und kommt in größeren Mengen nicht extrazellulär vor. Basu et al. zeigten, dass nekrotische aber nicht apoptotische Zellen Hsp-Proteine, wie gp96, Hsp90 und Hsp70, freisetzen und dass diese Proteine DCs aktivieren [94]. Eine ganze Reihe von weiteren Experimenten belegten, dass verschiedene Hsp-Proteine (gp96, Hsp60, Hsp70, Hsp110) DCs, Makrophagen oder Monozyten zur Hochregulierung von costimulatorischen Molekülen und der Sekretion von inflammatorischen Zytokinen wie TNF und IL-12 stimulierten [95-103]. Darauf gründete sich die Schlussfolgerung, dass die Hsp-Proteine zu einer großen Familie der endogenen *Danger* Signale gehören [104]. Endogene *Danger* Signale sind eine zentrale Komponente der von Matzinger postulierten *Danger*-Theorie, nach der die Immunantwort dadurch bestimmt wird, ob eine Gefahr für den Organismus vorliegt [105]. Die innate Aktivierung wird demnach nicht durch die Unterscheidung von Eigen und nicht-Eigen, wie nach dem Modell von Janeway [106], reguliert, sondern durch Moleküle, die unabhängig ihrer Herkunft Gefahr signalisieren. Da einige Hsps, wie Hsp70, durch Stress und Gefahren induziert und freigesetzt werden, schienen sie als Signal besonders geeignet [107-109]. Da für Hsp70 gezeigt wurde, dass es inflammatorische Zytokine oder Mediatoren, wie NO, induzierte und stimulatorische Moleküle auf immunkompetenten Zellen wie den DCs erhöhte, sah man die Kapazität von Hsp70 bestätigt, dem Immunsystem eine Gefahr anzuzeigen. Bekräftigt wurde die Signalfunktion durch detaillierte Untersuchungen der beteiligten Rezeptoren. Die innate Aktivierung der DCs durch Hsp70 wird nach Literaturangaben durch Bindung an verschiedene Rezeptoren, wie TLR1, TLR2 und TLR4, vermittelt [110-112]. Außerdem wurde die Bindung von Hsp70 an CD40 [113], LOX-1 [114,115], CD91 [116] und Lipidrafts [117] nachgewiesen.

### **1.2.2.2. Funktionen von Hsp70 in der adaptiven Immunstimulation**

Eine wichtige Beobachtung war, dass Hsp-Isolate aus Tumorzellen eine Immunantwort gegen den Tumor auslösten [118,119]. Eine solche Antwort konnte nicht mit den korrespondierenden Isolaten aus gesunden Zellen induziert werden. Die Studien wurden unter anderem mit gp96, Hsp70, Hsp90 und Hsp110 durchgeführt [120-124]. Die Spezifität der gegen den Tumor gerichteten Immunität wurde auf das an die Chaperone gebundene Peptid zurückgeführt.

Peptide aus den Komplexen mit den Hsps, die aus Tumorzellen isoliert oder in vitro hergestellt werden, können von APCs aufgenommen und auf MHC-Klasse-I präsentiert werden [125-128]. Die Rolle der Hsps in der Kreuzpräsentation wurde durch Versuche bestätigt, die zeigten, dass Hsp-gebundene aber nicht freie Peptide effizient präsentiert werden [129]. Darüber hinaus wurde postuliert, dass die an den Hsp gebundenen Peptide die wichtige Quelle der kreuzpräsentierten Antigene sind [130]. Die effiziente Kreuzpräsentation der Hsp:Peptid Komplexe wird unter anderem durch Rezeptor vermittelte Aufnahme erklärt [131], woran CD91 und LOX-1 beteiligt sind [116,132,133].

Eine Reihe von Arbeiten zeigte, dass durch Einsatz von Hsp70:Peptid Komplexen eine starke Peptid-spezifische Antwort der zytotoxischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen induziert wird. Durch den Einsatz von hoch-affinen Hsp70:Peptid Komplexen wurde die CD8<sup>+</sup> T-Zellantwort gegen verschiedene Antigenepitope auch in Abwesenheit von konventionellen Adjuvantien deutlich gesteigert [134-138]. Diese hoch-affinen Komplexe können durch die Verwendung von Hybridpeptiden, die neben dem Epitop eine Peptidsequenz enthalten, die stark an Hsp70 bindet, hergestellt werden [139-141].

### 1.3. Aufgabenstellungen dieser Arbeit

Aufgrund der verschiedenen Funktionen bei der innat und adaptiven Immunaktivierung wurde Hsp70 für den Einsatz bei der Immunsystem-basierten Therapie von Tumoren interessant [142-145]. Im wesentlichen lassen sich die Eigenschaften, die das Hsp70 zum Einsatz in der Tumorthherapie qualifizieren, wie folgt zusammenfassen:

- Hsp70 als Chaperone bindet eine Reihe von Peptiden, so auch Tumor assoziierte Antigene. Stabile Hsp:Peptid Komplexe können auch in vitro generiert werden.
- Die gebundenen Antigene werden in den DCs freigesetzt und über die Wege der Kreuzpräsentation auf MHC-Klasse-I geladen.
- HSP70 aktiviert die DCs und induziert als *Danger* Molekül, die für das Priming von zytotoxischen T-Zellen notwendigen Signale.

Eine Reihe der Studien wurden mit rekombinanten Hsp70 (rHs70), das in E.coli hergestellt wurde, durchgeführt. Aufgrund des Nachweises von Kontaminationen mit Endotoxinen in den rHsp70 Präparationen, die auf die E.coli Zellen zurückgeführt wurden, wurden die immunologischen Funktionen von Hsp70 angezweifelt [146-149]. Hiermit begann die Diskussion darüber, ob die Aktivierung der innat und adaptiven Immunantwort ausschließlich auf die Kontaminationen zurückzuführen ist und Hsp70 selbst keine Funktionen besitzt [151-153]. Somit war die Frage offen, ob und in welchem Maße Hsp70 DCs aktivieren kann.

Ziel dieser Arbeit war es, die Funktionen des humanen extrazellulären Hsp70 in der durch DCs vermittelten Immunantwort zu präzisieren.

Von der Arbeitsgruppe Nößner/Issels wurde bereits gezeigt, dass Hsp70:Peptid Komplexe aus Melanomzellen zur Antigen-spezifischen Aktivierung von T-Zellen führten [126]. Diese aus dem Tumor isolierten Hsp-Komplexe enthielten das konstitutive Hsc70 und das induzierbare Hsp70. Da die beiden Proteine schwer zu trennen waren und die Funktionen somit nicht eindeutige Hsp70, Hsc70 oder beiden Proteinen zuzuschreiben waren, wurde für diese Arbeit humanes Hsp70 rekombinant (rhuHsp70) hergestellt.

Folgende Anforderungen sollten bei der Herstellung des rhuHsp70 erfüllt werden:

- Herstellung des humanen Hsp70 mit einer sehr hohen Reinheit.
- Etablierung einer Methode, mit der die Endotoxine so stark reduziert wurden, dass eine dadurch bedingte innate Aktivierung ausgeschlossen werden konnte.
- Proteinchemische Charakterisierung des rhuHsp70.
- Bestimmung der Endotoxine.

Im Einzelnen sollten mit dem hergestellten rhuHsp70 folgende Fragen beantwortet werden:

**Funktionen von rhuHsp70 bei der innate Aktivierung von DCs:**

- Induziert rhuHsp70 ein Calciumsignal in DCs?
- Induziert rhuHsp70 die phänotypische Maturierung von DCs?
- Stimuliert rhuHsp70 die Sekretion von Zytokinen?
- Verändert rhuHsp70 die Makropinozytosekapazität der DCs?

**Funktionen von rhuHsp70 bei der Kreuzpräsentation von Peptidantigenen:**

**Untersuchung von rhuHsp70:Peptid Komplexen, die in vitro mit Hybridpeptiden mit einer hoch-affinen Hsp70 bindenden Sequenz hergestellt werden**

- Beeinflusst rhuHsp70 die Kreuzpräsentation von verschiedenen Peptidantigenen?
- Korreliert die Funktion in der Kreuzpräsentation mit den Bindungseigenschaften von rhuHsp70 für ein bestimmtes Peptid?
- Über welchen Mechanismus beeinflusst rhuHsp70 die Kreuzpräsentation?

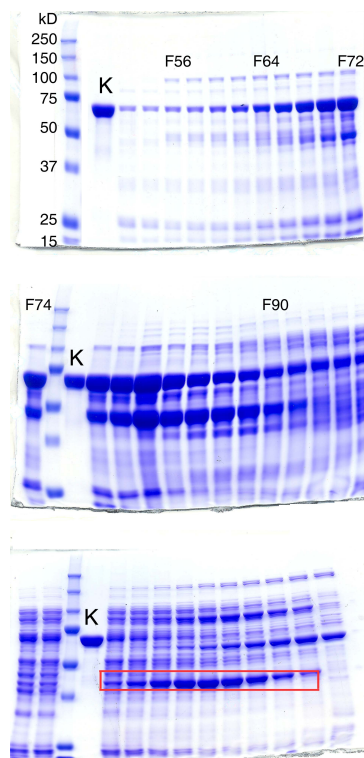
**Vergleich von Peptid mit rhuHsp70:Peptid Komplexen in dem Priming von T-Zellen**

- Kann durch rhuHsp70 vermittelte Kreuzpräsentation das Priming von zytotoxischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen verbessert werden?

## 2. Ergebnisse

### 2.1. Reinigung des rekombinanten humanen Hsp70 aus E.coli

Das humane Hsp70 wurde in dem E.coli Stamm WKG 191  $\Delta$ DnaK exprimiert. Dieser Stamm enthält nicht das bakterielle Hsp70, das als DnaK bezeichnet wird. Die Reinigung erfolgte nach dem modifizierten Protokoll von Buchberger et al. [154] (Material/Methoden 5.2). Nach dem Aufschluss der E.coli Zellen und Fällung der Proteine wurden für die Reinigung chromatographische Methoden verwendet. Zunächst wurden die Proteine durch die Anionenaustauschchromatographie mit DEAE-Sepharose aufgetrennt. Das mit Coomassie Blue gefärbte SDS-Page in Abbildung 2.1 zeigt, welche Fraktionen für die nächsten Schritte ausgewählt wurden. Hierbei war es wichtig, das mit rot in der Abbildung 2.1 gekennzeichnete Protein, dessen Größe im Bereich der 40 kD Bande lag, zu entfernen. Dieses Protein konnte durch die folgenden Reinigungsschritte nicht mehr entfernt werden. Entscheidend für die Reinheit der finalen rhuHsp70 Präparation war die Durchführung der Affinitätschromatographie mit der ATP-Agarose.



**Abbildung 2.1** Fraktionen nach Auftrennung mit der DEAE-Sepharose. Diese Fraktionen wurden mittels 10 % SDS-Page elektrophoretisch aufgetrennt und die Proteine wurden mit Coomassie Blue angefärbt (Material/Methoden 5.1.1. und 5.1.2). Für die weitere Reinigung wurden die Fraktionen F56-F90 ausgewählt. Als Kontrolle wurde rhuHsp70 (K) eingesetzt. kD=Kilodalton. Gezeigt ist ein Beispiel aus einer Proteinreinigung von zwölf.

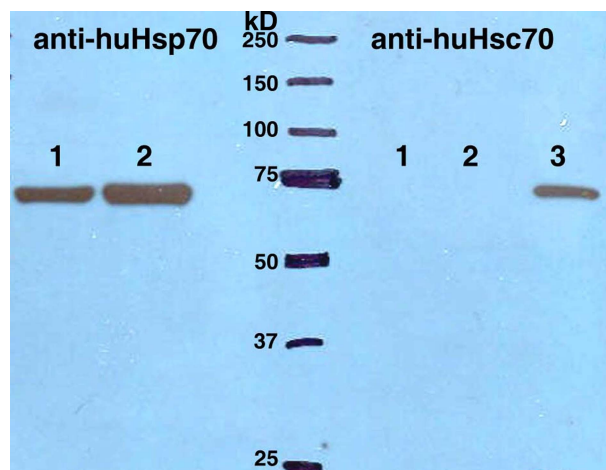


Die Hsp70 Proteine wurden im Anschluss an die Affinitätschromatographie mit PD10 Säulen umgepuffert, um das in dem Eluationspuffer enthaltene ATP und  $\beta$ -Mercaptoethanol zu entfernen. Um den Gehalt der freien Nukleotide noch stärker zu senken, wurden die Proteine zusätzlich dialysiert und diafiltriert. Zum Schluss erfolgte die Entfernung der Endotoxine mit Polymyxin B Gelen. Hierbei war es wichtig, an eine Matrix kovalent gebundenes Polymyxin zu verwenden und die Gele vor dem Einsatz gründlich zu waschen, um zu verhindern, das Polymyxin B in die Präparation gelangt. Um Kontaminationen zu verhindern, wurde für alle in der Reinigung benutzten Puffer ausschließlich Aqua injectabilia verwendet und nur mit pyrogenfreiem Verbrauchsmaterial gearbeitet. Die Proteine wurden auf eine Konzentration zwischen 1 und 3,5 mg/ml eingestellt.

### 2.2. Proteinchemische Charakterisierung des rekombinanten rhuHsp70

#### 2.2.1. Identität des gereinigten Proteins

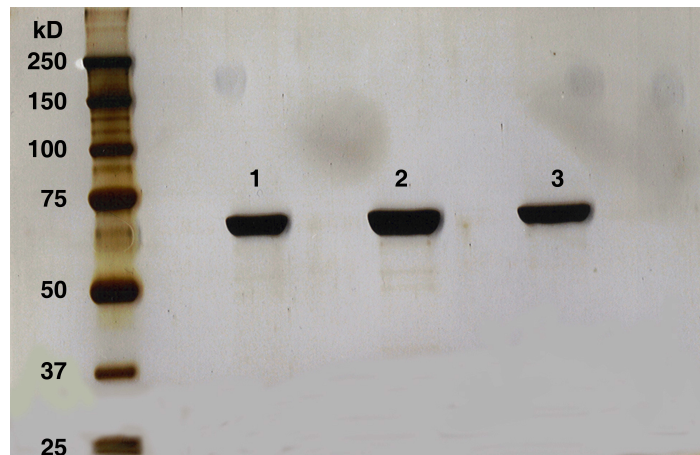
Die Identität der Proteine jeder Reinigungscharge wurde mit dem Western Blot überprüft (Abb. 2.2). Dazu wurden die Proben mit dem SDS-Page elektrophoretisch aufgetrennt und anschließend auf eine PDVF Membran transferiert. Die Detektion erfolgte mit anti-human Hsp70 oder anti-human Hsc70 und einem sekundären Peroxidase-konjugierten Antikörper. Als Substrate dienten Luminol und  $H_2O_2$  (Material/Methoden 5.1.5).



**Abbildung 2.2** Prüfung der Identität der rhuHsp70 Präparation mit dem Western Blot. 1=0,4  $\mu$ g Protein, 2=0,8  $\mu$ g Protein, 3= hHsc70 (0,13  $\mu$ g) wurden in einem 10 % SDS Page aufgetrennt und auf eine PDVF Membran transferiert. Die verwendeten Antikörper sind in Material/Methoden 5.1.5 beschrieben. kD=Kilodalton.

### 2.2.2. Reinheit des rhuHsp70

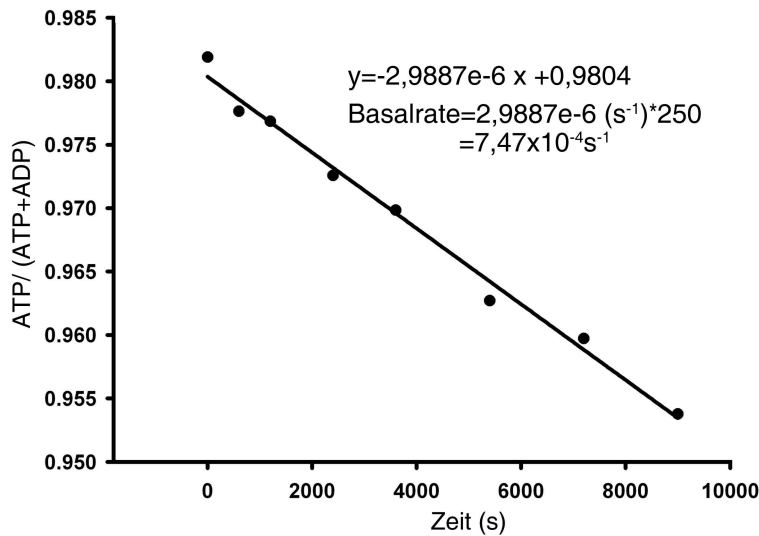
Die Reinheit der Proteine jeder Reinigungscharge wurde nach Auftrennung im SDS-Page und anschließender Silberfärbung bestimmt (Material/Methoden 5.1.3). Abbildung 2.3 zeigt die Reinheit der rhuHsp70 Präparation, wie sie für die biologischen Versuche eingesetzt wurde. Als Vergleich diente ein industriell hergestelltes Hsp70 mit einer deklarierten Reinheit von 90 % (Nr.3 in Abb. 2.3).



**Abbildung 2.3** Prüfung der Reinheit der rhuHsp70 Präparation. 1= 4 µg Protein, 2= 8 µg Protein, 3= 4 µg rhuHsp70 von Stressgen wurden nach der Auftrennung mittels 10 % SDS-Page mit der Silberfärbung detektiert (Material/Methoden 5.1.3). kD=Kilodalton

### 2.2.3. ATPase Aktivität

Die intrinsische ATPase Aktivität der rhuHsp70 Proteine wurden nach dem Protokoll von Gässler et al. [155] bestimmt. Dafür wurde eine Reaktionsmischung mit ATP und [ $\alpha$ - $^{32}$ P] ATP mit rhuHsp70 bei 30 °C inkubiert. Nach 10, 20, 40 ,60 ,90 ,120 und 150 min wurden die Nukleotide mit der Dünnschichtchromatographie (DC) getrennt. Zur Auswertung wurden die counts pro Spots in einem Phosphoimager quantifiziert. Nach Subtraktion des Hintergrundes der DC-Platten wurde ATP/(ATP+ADP) gegen die Zeit aufgetragen und die Basalrate berechnet. Die Basalrate ist das Produkt aus der Steigung der Kurve nach linearem Kurvenfitting und dem Verhältnis von ATP zu rhuHsp70, was diesem Fall 250 war. Die intrinsischen ATPase Raten der verschiedenen Reinigungschargen waren zwischen 4 und 10 x 10<sup>-4</sup> s<sup>-1</sup>. Für Hsp70 ist eine Basalrate von 4,5 x 10<sup>-4</sup> s<sup>-1</sup> beschrieben [155].



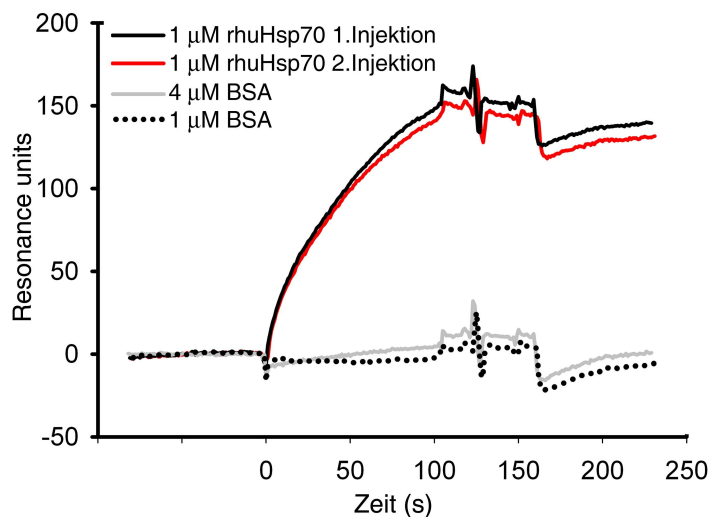
**Abbildung 2.4** Bestimmung der Basalrate der intrinsischen ATPase Aktivität des rhuHsp70. Zeitabhängiger Umsatz von ATP zu ADP durch rhuHsp70. Das Verhältnis ATP/(ATP+ADP) wurde nach Auftrennung von ADP und ATP mittels Dünnschichtchromatographie und durch die Quantifizierung der radioaktiven Spots bestimmt (Material/Methoden 5.3.3).

#### 2.2.4. Endotoxingehalt des rhuHsp70

Der LPS-Gehalt jeder Hsp70 Präparation wurde mit dem Limulus Test (siehe Material/Methoden 5.3.1) bestimmt. Hierbei wird die katalytische Aktivität von LPS genutzt, ein in dem Limulus Lysate enthaltenes Proenzym in die aktive Form zu überführen. Das aktive Enzym katalysiert die Spaltung eines farbigen Produktes aus dem farblosen Substrat, was photometrisch detektiert wird. Die LPS-Konzentration lag bei jeder eingesetzten rhuHsp70 Präparation unter 0,5 EU/mg Protein. Die Einheit EU (endotoxin unit) ist ein Maß für die biologische Aktivität von LPS. 1 EU wird 100 pg LPS gleichgesetzt. Bei einer finalen Konzentration des rhuHsp70 in den biologischen Versuchsansätzen von 1  $\mu$ M war die finale LPS Konzentration unter 3,5 pg/ml.

### 2.2.5. Surface Plasmon Resonance Spektroskopie

Die Bindung von rhuHsp70 an das in der Kreuzpräsentierung verwendete Peptidantigen b-pep70-MART-1 wurde mit dem BIACORE Gerät untersucht. Dafür wurde ein mit Streptavidin beschichteter Chip mit dem b-pep70-MART-1 Peptid beladen. Die Messungen wurden bei 37 °C und in HKM Puffer durchgeführt (Material/Methoden 5.3.4). Abbildung 2.4 zeigt die *On Rate* Kurven von rhuHsp70 und BSA. Die Dissoziation konnte nicht durch Injektion von HKM-Puffer erreicht werden. Durch Waschen mit 0,5 % SDS wurde der Chip regeneriert. Die dargestellten *Resonance units* ergeben sich aus der Differenz der *Resonance units* der Referenzzelle ohne b-pep70-MART-1 und der Messzelle mit b-pep70-MART-1. Die Ergebnisse der BIACORE-Messung zeigen, dass das intensiv gereinigte rhuHsp70, nicht aber BSA, an das b-pep70-MART-1 Peptid bindet.

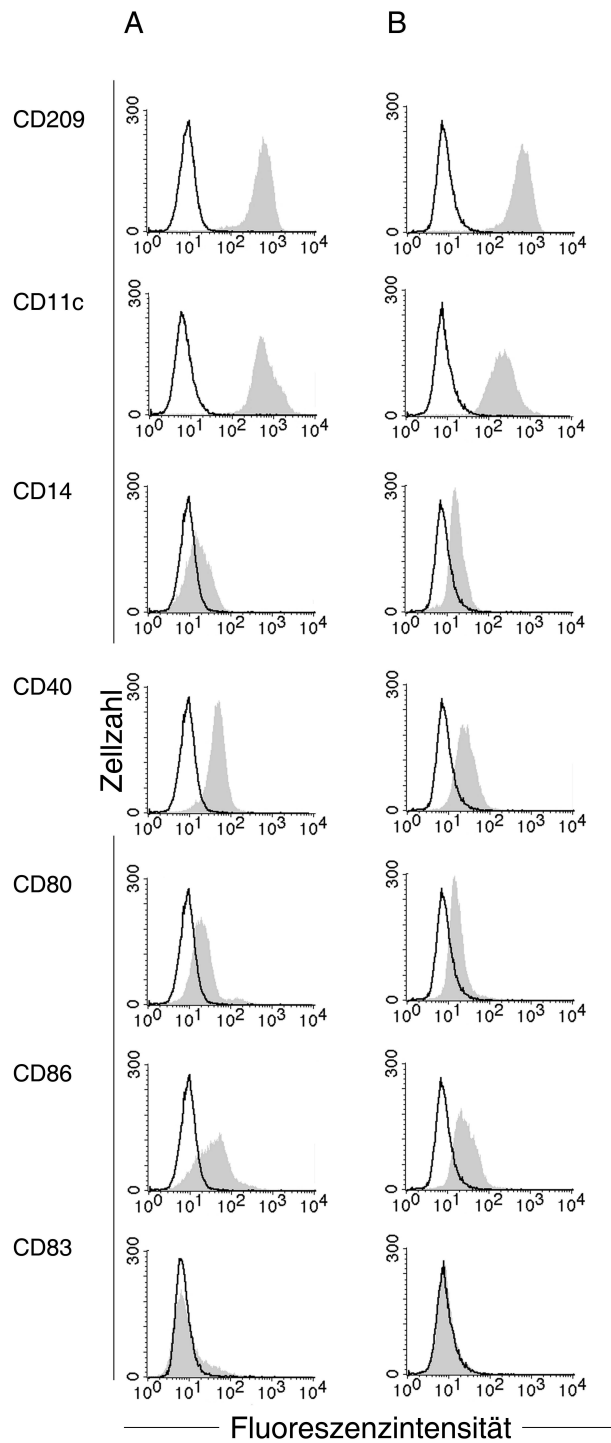


**Abbildung 2.5** *Surface Plasmon Resonance Spectroscopy* BIACORE Messung. Bindung von BSA und rhuHsp70 an das an dem Streptavidin-Chip immobilisierten b-pep70-MART-1 Peptid. RhuHsp70 und BSA wurden nacheinander über den Chip gegeben. Die Eluation erfolgte zwischen den einzelnen Injektionen mit 0,5 % SDS und HKM Puffer. Die erhaltenen *On-Rate* Kurven sind für die Darstellung übereinandergelegt (Material/Methoden 5.3.4)

### 2.3. Charakterisierung der IL-4/GM-CSF generierten dendritischen Zellen

Die DCs wurden überwiegend aus positiv isolierten Monozyten und für bestimmte Versuche aus negativ isolierten Monozyten gewonnen (Material/Methoden 5.5.5). Die Isolierung der Monozyten erfolgte aus Vollblut. Zunächst wurden die peripheren Blutlymphozyten (PBL) durch Dichtegradientenzentrifugation mit Ficoll isoliert. Bei der positiven Isolierung wurden die Monozyten direkt über CD14-Antikörper an magnetische Beads gebunden. Die PBL mit den Bead-gekoppelten Monozyten wurden anschließend auf Säulen in einem Magnetfeld gegeben. Die Monozyten blieben aufgrund der magnetischen Wechselwirkungen in den Säulen, während alle anderen PBLs von den Säulen gewaschen wurden. Zum Schluss wurden die Monozyten eluiert. Die positiv isolierten Monozyten hatten eine hohe Reinheit (>90 %). Bei der negativen Isolierung wurden magnetische Beads an T-Zellen, B-Zellen, NK-Zellen und Granulozyten gebunden, die mit einem Magneten anschließend entfernt wurden. Die Reinheit der Monozyten nach dieser Isolierungsmethode lag zwischen 70 % und 80 %.

Die FACS Analyse der Oberflächenmarker ergab, dass die DCs aus positiv oder negativ isolierten Monozyten phänotypisch keine deutlichen Unterschiede aufwiesen (Abb. 2.6). Die DCs hatten eine hohe Expression von DC-Sign (CD209), ein charakteristisches Molekül, das nicht auf Monozyten exprimiert wird. CD14 war sehr niedrig oder nicht auf der Oberfläche der DCs vorhanden. Entsprechend der Literatur waren die costimulatorischen Moleküle CD80 und CD86 nur in niedrigen Mengen und der klassische Maturierungsmarker CD83 nicht exprimiert [6]. Die DCs aus jeder Herstellung wurden mittels FACS analysiert. Die Expression von CD209, CD11c, CD14, CD40, CD80 und CD83 war bei allen IL-4/GM-CSF generierten DCs vergleichbar. Unabhängig von der Methode der Monozytenisolierung und des Blutspenders wurden jedoch große Unterschiede in der Expression von CD32 und CD86 festgestellt. Unter 2.4. wird ausführlich dargestellt, welchen Einfluss dieser Unterschied auf die Stimulierbarkeit der DCs hatte.



**Abbildung 2.6** Phänotypische Charakterisierung von IL-4/GM-CSF generierten DCs aus (A) negativ und (B) positiv isolierten Monozyten mit der FACS Analyse. Das Histogramm mit schwarzer Linie ist die Isotypkontrolle und das Histogramm der grauen Fläche ist der jeweilige Oberflächenmarker. Die x-Achse stellt die Fluoreszenzintensität und die y-Achse die Zellzahl dar. Für A und B wurde Blut von unterschiedlichen Spendern verwendet.

## **2.4. Signalfunktionen des rhuHsp70 bei myeloischen dendritischen Zellen**

### **2.4.1. Induktion des intrazellulären Calciumioneneinstroms**

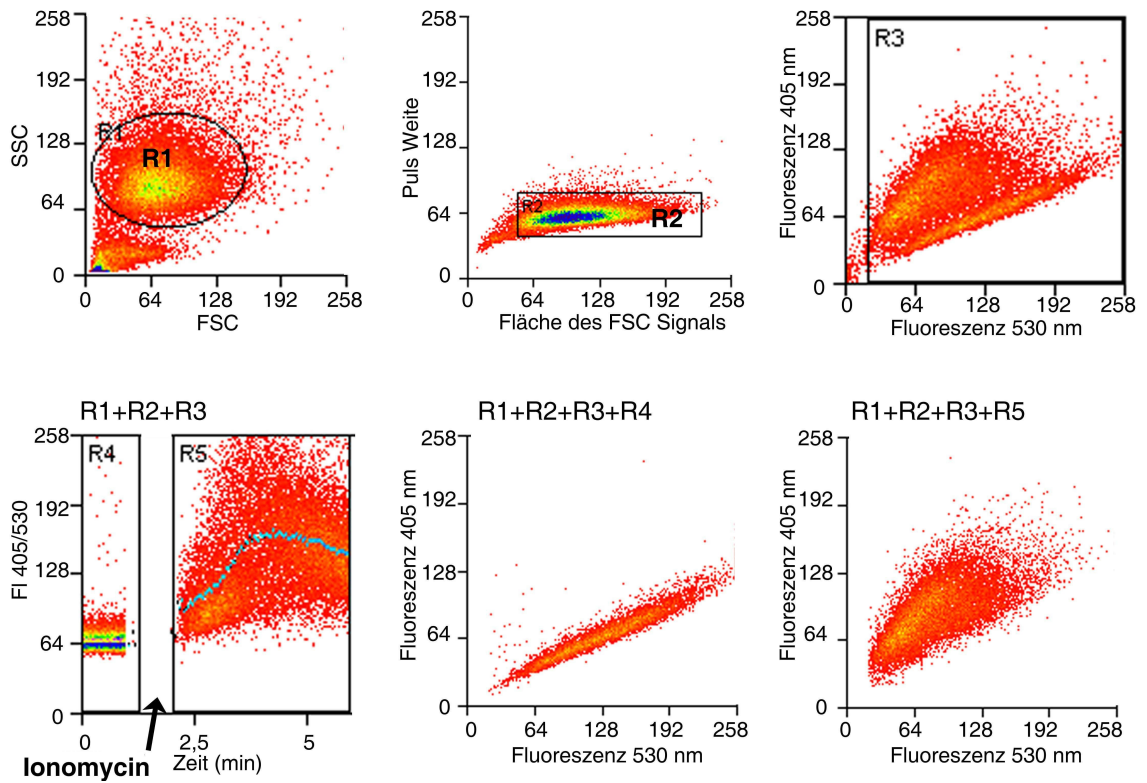
Der Einstrom von Calciumionen in das Zytosol ist ein frühes Signal, das am Anfang vieler Signalkaskaden steht. Es wurde gezeigt, dass rekombinantes mykobakterielles Hsp70 den Einstrom von intrazellulären Calciumionen in humanen immaturen (DCs) induziert [156-158]. Asea et al. [101] zeigten einen schnellen Calcium Influx in humanen Monozyten nach Stimulation mit humanen Hsp70.

#### **2.4.1.1. Nukleotide in den rhuHsp70 Präparationen induzieren in IL-4/GM-CSF generierten DCs ein Calciumsignal**

Um zu untersuchen, ob das rekombinante humane Hsp70 einen solchen Influx in humanen DCs auslösen kann, wurden diese Zellen mit Indo-1 gefärbt und die Veränderung der Fluoreszenz-Emission durch die Erhöhung der intrazellulären Calciumionen mit dem MoFlo-Gerät vermessen (Material/Methoden 5.6.2.8).

Abbildung 2.7 zeigt anhand der Calciumionenmessung in DCs nach Stimulation mit dem Ionophor Ionomycin, welche Population im FSC/SSC ausgewählt wurde (R1). Die Einzelzellereignisse wurden anhand der Puls-Weite des FSC Signals bestimmt (R2). Es wurde die violette (405 nm) vs. die grüne (530 nm) Fluoreszenz aufgenommen. Die Anregung erfolgte mit einem Argon-Laser (365 nm). Die Region R3 umfasst alle gefärbten Zellen. Die Indo-1 gefärbten DCs wurden bei 530 nm aufgenommen. Durch Bindung der Calciumionen an Indo-1 verschiebt sich die Fluoreszenz-Emission zu 405 nm. Das Verhältnis der Fluoreszenz-Emissionen bei 405 nm und 530 nm (FI 405/530) ist der Menge an intrazellulären Calciumionen proportional. Zunächst wurde jede Probe ca. 1 min ohne Stimulation (R4) gemessen, um die Basislinie zu erhalten. Die Messung wurde nach Stimulation für 4-6 min fortgesetzt (R5). Die Ergebnisse werden auch als Mittelwert des FI 405/530 Verhältnisses aller Ereignisse über die Zeit (blaue Kurve im Diagramm: x=Zeit, y= Mean FI 405/530 Abb. 2.7) dargestellt.

## Ergebnisse

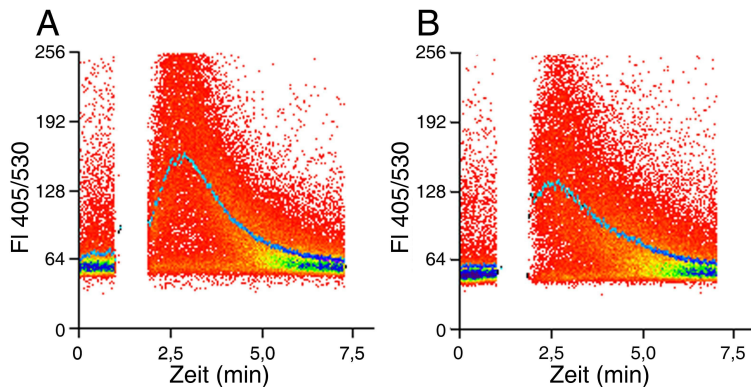


**Abbildung 2.7** Analyse des intrazellulären Einstroms von Calciumionen nach Stimulation von IL-4/GM-CSF generierten DCs mit 250 ng/ml Ionomycin. Im FSC/SSC Plot wurde die Zellpopulation anhand der Größe (FSC) und Granularität (SSC) ausgewählt (=R1). Die Einzelzellereignisse im R2 wurden anhand der Pulsweite des FSC Signals bestimmt (2. Plot oben Mitte). Die ausgewählten Zellen in R3 sind alle gefärbten Zellen (3. Plot oben rechts). DCs wurden zunächst ohne Ionomycin gemessen, um die Basislinie zu erhalten (=R4) (4. Plot unten links und 5. Plot unten Mitte). In R5 sind die DCs nach Zusatz von Ionomycin dargestellt (4. Plot unten links und 6. Plot unten rechts). Die blaue Kurve ist der Mittelwert von FI 405/530.

Für die Untersuchung des Calciumsignals wurden DCs aus negativ oder positiv isolierten Monozyten generiert. Beide Methoden können den Zustand der Zellen beeinflussen. Bei der positiven Isolierung kann es durch die Bindung von CD14-Antikörper an die Monozyten zu einer Aktivierung kommen. Werden Monozyten durch die negative Isolierung gewonnen, so sind die enthaltenen Verunreinigungen mit anderen Zellpopulationen der PBL höher. Die für die Calciummessung eingesetzten DCs (Tag 6-8) wurden mit IL-4 und GM-CSF generiert.

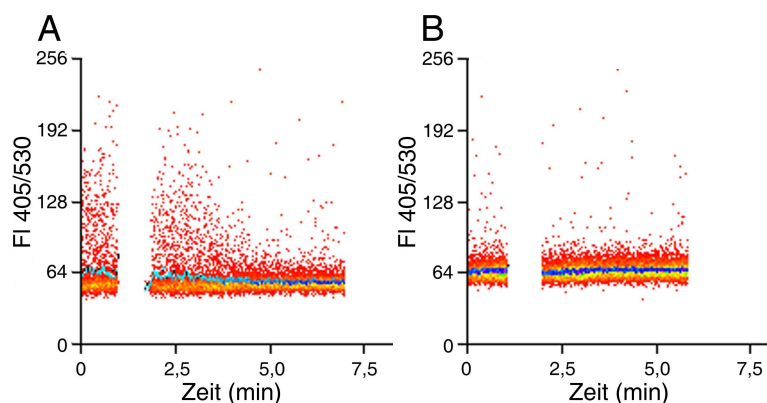


In den ersten Versuchen induzierten die rhuHsp70 Präparationen in DCs, die aus negativ isolierten Monozyten (A) oder positiv isolierten Monozyten (B) mit IL-4/GM-CSF generiert wurden, einen Einstrom der Calciumionen (Abb. 2.8). Die resultierenden Kurven beider Messungen ähnelten sich.



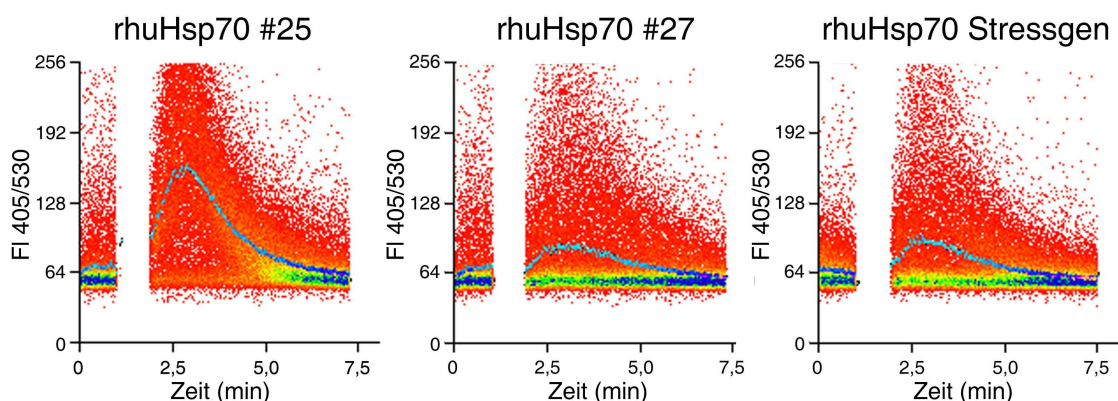
**Abbildung 2.8** Analyse des intrazellulären Einstroms von Calciumionen nach Stimulation von IL-4/GM-CSF generierten DCs mit 300nM rhuHsp70. (A) DCs generiert aus negativ isolierten Monozyten, (B) DCs generiert aus positiv isolierten Monozyten. Die Monozyten stammten von verschiedenen Spendern. Die blaue Kurve ist der Mittelwert der Werte für FI 405/530. Die DCs wurden zunächst 1 min ohne Stimulation gemessen (1. Teil der Kurve). Danach wurden sie stimuliert (2. Teil der Kurve; Unterbrechung=Zugabe von rhuHsp70). Es ist ein repräsentatives Experiment von 6 (DCs aus Monozyten von je 3 verschiedenen Spendern) dargestellt.

Durch Stimulation mit BSA oder dem Puffer (HKM-Puffer), in dem das rhuHsp70 zum Schluss der Reinigung aufgenommen wurde, wurde kein Einstrom der Calciumionen induziert. Damit wurde ausgeschlossen, dass das Calciumsignal unspezifisch oder durch Pufferbestandteile aktiviert wurde.



**Abbildung 2.9.** Analyse des intrazellulären Einstroms von Calciumionen nach Stimulation von IL-4/GM-CSF generierten DCs mit (A) 3,4 % HKM-Puffer, (B) 300 nM BSA. Die blaue Kurve ist der Mittelwert der Werte für FI 405/530. Die DCs wurden zunächst 1 min ohne Stimulation gemessen (1. Teil der Kurve). Danach wurden sie stimuliert (2. Teil der Kurve; Unterbrechung=Zugabe von HKM-Puffer oder BSA ). Es ist ein repräsentatives Experiment von zwei dargestellt.

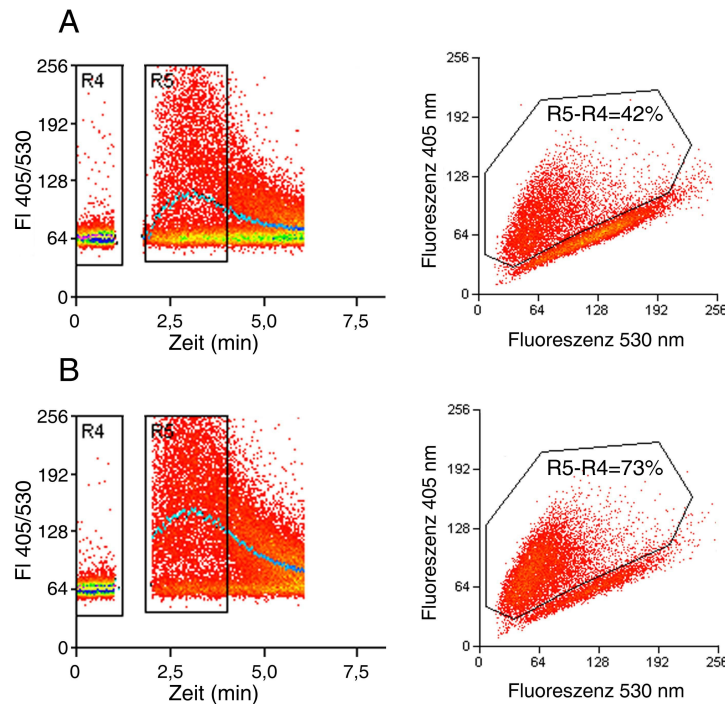
Aber es waren deutliche Unterschiede zwischen verschiedenen Präparationschargen von rhuHsp70 zu beobachten. Obwohl gleiche Konzentrationen von rhuHsp70 eingesetzt wurden, waren die resultierenden Kurven der Calciummessung unterschiedlich (Abb. 2.10). Diese Unterschiede konnten bei dem dargestellten Versuch nur durch die Präparationen verursacht worden sein, da die eingesetzten DCs für diesen Versuch aus ein und derselben Isolierung und Generierung stammten.



**Abbildung 2.10** Analyse des intrazellulären Einstroms von Calciumionen nach Stimulation von IL-4/GM-CSF generierten DCs mit 300 nM rhuHsp70 Charge 25, 300 nM rhuHsp70 Charge 27 oder 300 nM rhuHsp70 Stressgen. Die blaue Kurve ist der Mittelwert der Werte für FI 405/530. Die DCs wurden zunächst 1 min ohne Stimulation gemessen (1. Teil der Kurve). Danach wurden sie stimuliert (2. Teil der Kurve; Unterbrechung=Zugabe von rhuHsp70).

Außerdem zeigte sich, dass nicht alle DCs mit einem Calciumeinstrom reagierten.

Der prozentuale Anteil der reagierenden DCs entspricht dem Anteil der Zellen, die positiv für die Fluoreszenz 405 nm waren (Abb. 2.11). Für die Bestimmung wurden alle positiven DCs vor der Stimulation (R4) von den positiven Zellen nach Stimulation (R5) subtrahiert. R5 wurde so gewählt, dass der Zeitraum der Reaktion erfasst wurde (Kurvenpeak) (Abb. 2.11). Abbildung 2.11 zeigt, dass die Stärke des intrazellulären Calciumsignals und die Zahl der reaktiven Zellen durch Erhöhung der eingesetzten Menge der rhuHsp70 Präparation gesteigert werden konnte. Aber selbst bei einer hohen Konzentration von rhuHsp70 reagierten nur 73 % der Zellen. Die Steigerung mit der höheren Menge an rhuHsp70 betrug weniger als das doppelte (43 % reagierende Zellen mit 300 nM rhuHsp70 und 73 % reagierende Zellen mit 1,2  $\mu$ M rhuHsp70). Wurde mit Ionomycin stimuliert reagierten alle Zellen (=100 %) mit Einstrom von Calciumionen (Abb. 2.7).

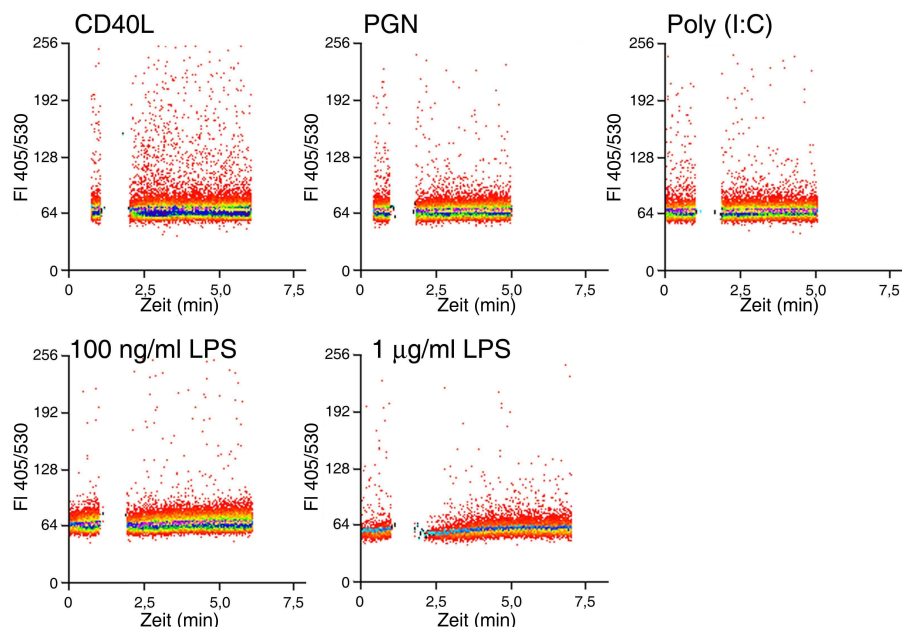


**Abbildung 2.11** Analyse des intrazellulären Einstroms von Calciumionen nach Stimulation von IL-4/GM-CSF generierten DCs mit 300 nM rhuHsp70 (A) oder mit 1,2 µM rhuHsp70 (B). Die Ereignisse im Gate R5 wurden für die Bestimmung des prozentualen Anteils an reagierenden DCs verwendet. Die positiven DCs aus Gate R4 wurden als Hintergrund subtrahiert. Die blaue Kurve ist der Mittelwert der Werte für FI 405/530. Die DCs wurden zunächst 1 min ohne Stimulation gemessen (1. Teil der Kurve). Danach wurden sie stimuliert (2. Teil der Kurve; Unterbrechung =Zugabe von rhuHsp70).

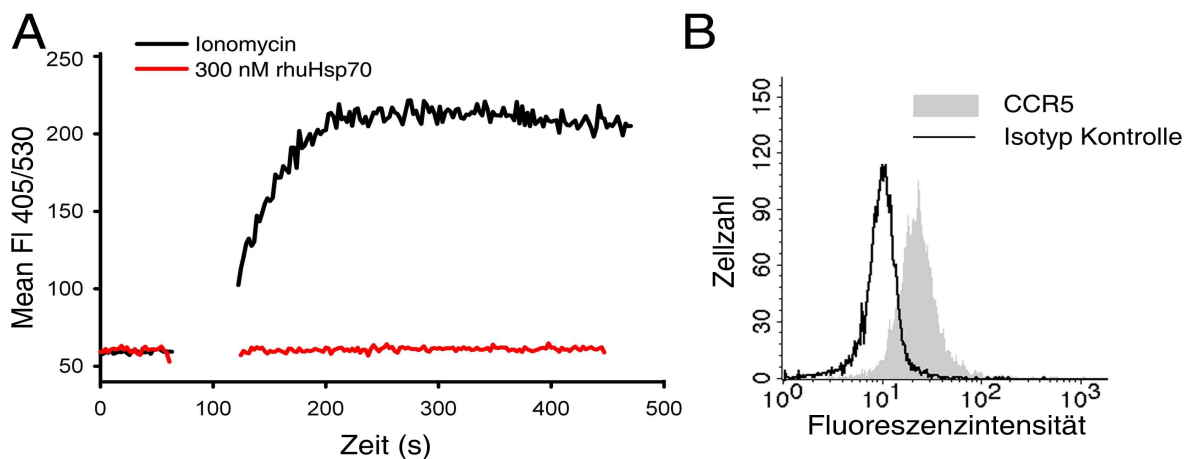
Das gemessene Calciumsignal konnte nicht mit den für humanes Hsp70 bekannten Rezeptoren erklärt werden. Als Rezeptoren für humanes Hsp70 sind unter anderem TLR2 und TLR4 [110] und CD40 [113] beschrieben. Um zu prüfen, ob das detektierte Calciumsignal durch Bindung an einen dieser Rezeptoren ausgelöst wird, wurden die DCs mit CD40 Liganden (CD40L), Peptidoglycan (PGN), einem Liganden für TLR2, und Poly I:C, einem Liganden für TLR3, stimuliert. Mit LPS wurde ein Ligand für TLR4 getestet. Wie entsprechend der Literaturangaben zu erwarten war, konnte keiner dieser Liganden einen Calciuminflux auslösen (Abb. 2.12). Die Signalgebung durch die TLRs erfolgt unabhängig von Calcium [14].

Der durch mykobakterielles Hsp70 induzierte Einstrom der Calciumionen wird laut Literatur durch Bindung des Proteins an den Chemokinrezeptor CCR5 vermittelt [156,157]. Um zu testen, ob das rhuHsp70 über diesen Rezeptor ein Calciumsignal auslösen kann, wurden CCR5 positive Monozyten mit rhuHsp70 stimuliert. Die Monozyten wurden durch Plattenadhärenz aus den PBL isoliert und anschließend über Nacht mit GM-CSF kultiviert. Danach wurden sie für die Messung eingesetzt. Wie in Abbildung 2.13

dargestellt, triggerte rhuHsp70 in CCR5 positiven Zellen nicht das Calciumsignal. Zur Kontrolle, dass ein Calciumsignal in den Monozyten gemessen werden konnte, wurde mit Ionomycin stimuliert, was zu einer positiven Reaktion führte.



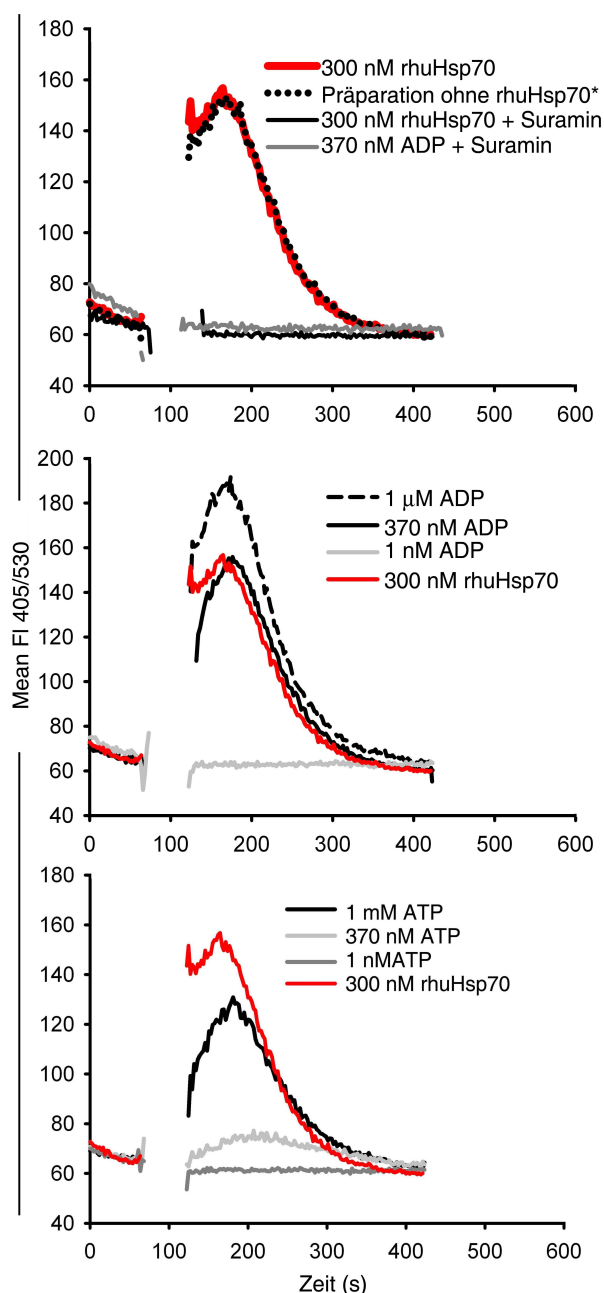
**Abbildung 2.12** Analyse des intrazellulären Einstromes von Calciumionen nach Stimulation von IL-4/GM-CSF generierten CD32<sup>high</sup> DCs mit 2 µg/ml CD40L, 20 µg/ml PGN, 10 µg/ml Poly (I:C), 100 ng/ml LPS oder 1 µg/ml LPS. Die blaue Kurve ist der Mittelwert der Werte für FI 405/530. Die DCs wurden zunächst 1 min ohne Stimulation gemessen (1. Teil der Kurve). Danach wurden sie stimuliert (2. Teil der Kurve; Unterbrechung=Zugabe von CD40L oder der TLR-Liganden).



**Abbildung 2.13** (A) Analyse des intrazellulären Einstroms von Calciumionen nach Stimulation von Monozyten mit 300 nM rhuHsp70 oder 250 ng/ml Ionomycin. Es ist der Mittelwert der Werte für FI 405/530 dargestellt (=Mean FI 405/530). Die Monozyten wurden zunächst 1 min ohne Stimulation gemessen (1. Teil der Kurve). Danach wurden sie stimuliert (2. Teil der Kurve; Unterbrechung =Zugabe von rhuHsp70 oder Ionomycin). (B) FACS Analyse der Oberflächenexpression von CCR5 auf den in Abbildung A verwendeten Monozyten. Histogrammachsen: x-Achse=Fluoreszenzintensität, y-Achse=Zellzahl.

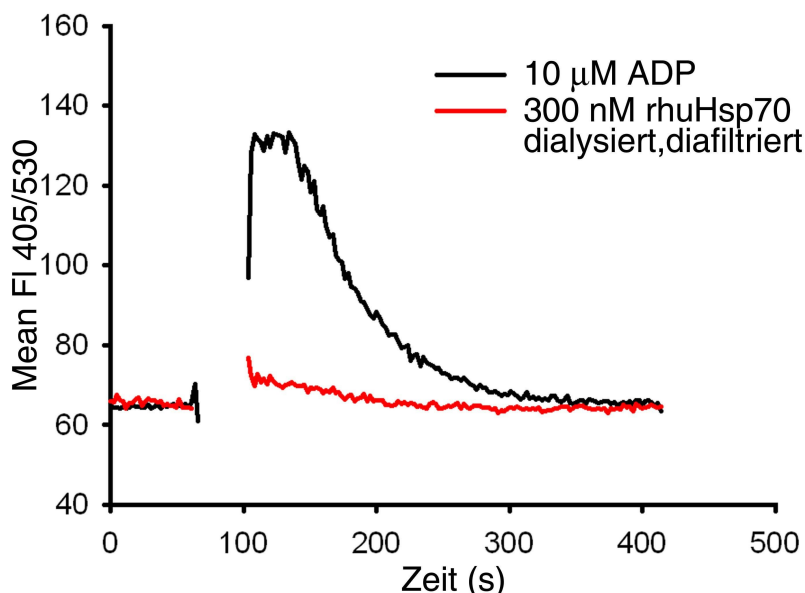
Für weitere Untersuchungen wurde das rhuHsp70 durch Filtration über eine Membran mit einem *Cut off* von 30 kD aus der gesamten rhuHsp70 Präparation abgetrennt. Der Durchlauf stellte eine Kontrolllösung dar, die alle Bestandteile enthielt außer dem rhuHsp70 und Substanzen, die größer als 30 kD waren. In dieser Lösung wurde mit Bradford kein Protein nachgewiesen. Die DCs wurden mit dieser rhuHsp70-freien Präparationskontrolle stimuliert. Das eingesetzte Volumen dieser Kontrolle entsprach dem Volumen der rhuHsp70-haltigen Stocklösung für 300 nM rhuHsp70 im finalen Ansatz der Calciummessung. Die rhuHsp70-freie Präparationskontrolle ergab genau die gleiche Stimulationskurve wie die Präparation mit Protein (Abb. 2.14). Die positive Reaktion der rhuHsp70-freien Präparationskontrolle zeigte, dass der Calciumioneneinstrom durch eine in der Präparation frei vorliegende Substanz, die nicht an das rhuHsp70 Protein gebunden war, induziert wurde. Als mögliche Substanzen wurden die Nukleotide ADP und ATP getestet. ATP kann in der Präparation aufgrund des in der Aufreinigung mit ATP-Agarose benutzten Puffers (10 mM ATP in HKM-Puffer) vorliegen. ATP wird durch die intrinsische ATPase Aktivität des Hsp70 zu ADP umgesetzt. Das rhuHsp70 wurde zwar zum Schluss der Aufreinigung mit Sephadex-Säulen umgepuffert. Dadurch sind aber freie Nukleotide in nanomolaren Konzentrationen nicht auszuschließen. Es ist bekannt, dass Nukleotide über die Purinrezeptoren in den DCs Calciumsignale induzieren [159-160]. Es schien daher wahrscheinlich, dass die in der rhuHsp70 Präparation enthaltenen Nukleotide den Calciumioneneinstrom verursachten. Um das zu überprüfen, wurde zunächst der Nukleotidgehalt der proteinfreien Kontrolllösung photometrisch bestimmt. Die finale Konzentration der Nukleotide in dem Zellansatz für die Calciummessung ergab sich rechnerisch aus dem Volumen der rhuHsp70 Stocklösung, das für eine finale Konzentration von 300 nM rhuHsp70 eingesetzt wurde. Demnach war die Konzentration der freien Nukleotide 370 nM. Um zu prüfen, ob ADP den mit der rhuHsp70 Präparation gemessenen Calciumioneneinstrom verursachte, wurden die DCs mit 370 nM ADP, mit einem Volumen der rhuHsp70 Präparation, das eine finale Konzentration von 300 nM rhuHsp70 ergab oder dem gleichen Volumen der proteinfreien Kontrolle stimuliert. Die aus diesen Stimulationen resultierenden Kurven waren identisch (Abb. 2.14 A, B). Eine Sättigung der Calciumsignalkapazität der DCs konnte ausgeschlossen werden, da nach Stimulation mit 1  $\mu$ M ADP ein stärkeres Signal gemessen wurde. Neben ADP wurde auch ATP getestet. Im Vergleich zu 370 nM ADP und der rhuHsp70 Präparation (300 nM rhuHsp70) war das durch die Stimulation mit 370 nM ATP resultierende Calciumsignal schwächer (Abb. 2.14 C). Einen weiteren Beweis dafür, dass das durch die rhuHsp70 Präparation induzierte Signal durch die Nukleotide verursacht wurde, zeigt Abbildung

2.14. Durch die Vorinkubation der DCs mit dem Purinrezeptorantagonisten Suramin wurde die Aktivierung des Calciumioneneinstroms durch die rhuHsp70 Präparation oder 370 nM ADP vollständig inhibiert.



**Abbildung 2.14** Analyse des intrazellulären Einstroms von Calciumionen nach Stimulation von IL-4/GM-CSF generierten DCs mit rhuHsp70, rhuHsp70-freie Kontrollpräparation\*, ADP oder ATP. \*RhuHsp70 wurden aus der Präparation/Stocklösung durch Filtration über eine Membran mit einem *Cut off* von 30 kD entfernt. Das eingesetzte Volumen der Präparation ohne rhuHsp70 entsprach dem Volumen der verwendeten rhuHsp70 Präparation. Für die Inhibition wurden die DCs 5 min mit 250 µM Suramin vorinkubiert. Es ist der Mittelwert der Werte für FI 405/530 dargestellt (=Mean FI 405/530). Die DCs wurden zunächst 1 min ohne Stimulation gemessen (1. Teil der Kurve). Danach wurden sie stimuliert (2. Teil der Kurve; Unterbrechung =Zugabe von rhuHsp70, ATP oder ADP). Es ist ein repräsentatives Experiment von zwei ( DCs generiert aus Monozyten von zwei verschiedenen Spendern) dargestellt.

Die in Abbildung 2.14 dargestellten Ergebnisse zeigen, dass der Calciumioneneinstrom durch die Nukleotide, vor allem durch ADP, induziert wurde. Würde rhuHsp70 an der Aktivierung des Calciumsignals beteiligt sein, müsste die proteinhaltige Präparation ein stärkeres Signal als 370 nM ADP oder die proteinfreie Präparationskontrolle auslösen. Außerdem dürfte das durch die rhuHsp70 Präparation induzierte Calciumsignal nicht vollständig durch den Purinrezeptorantagonisten Suramin inhibiert werden. Ein zusätzlicher Effekt durch rhuHsp70 war demnach unwahrscheinlich. Um das weiter zu untersuchen, wurde der Gehalt an Nukleotiden in der rhuHsp70 Präparation nach der Umpufferung über PD-10 Säulen durch intensive Dialyse und Diafiltration zusätzlich reduziert. Die auf die Weise gereinigte rhuHsp70 Präparation induzierte in DCs keinen Calciumioneneinstrom (Abb. 2.15). Die für diese Messung eingesetzten DCs wurden aber durch ADP aktiviert.

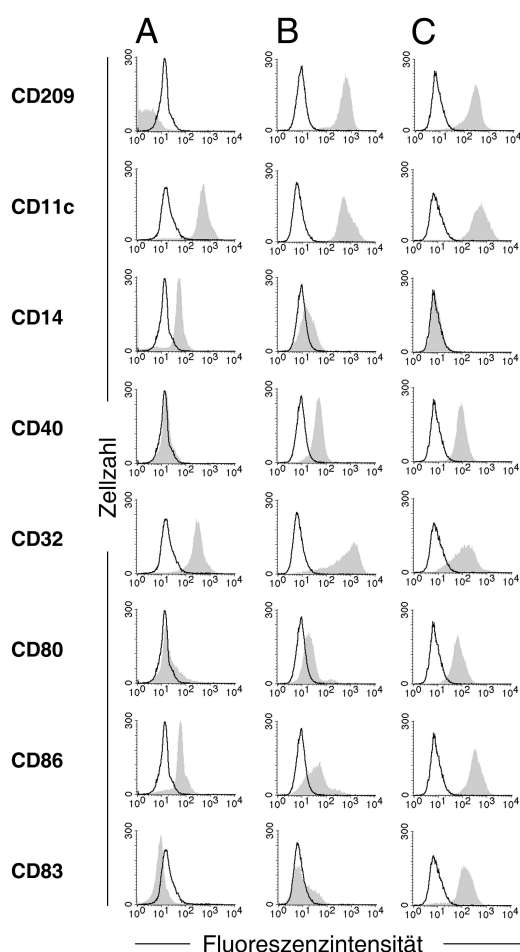


**Abbildung 2.15** Analyse des intrazellulären Einstroms von Calciumionen nach Stimulation von IL-4/GM-CSF generierten DCs mit ADP oder 300 nM dialysiertem und diafiltriertem rhuHsp70. Es ist der Mittelwert der Werte für FI 405/530 dargestellt (=Mean FI 405/530). Die DCs wurden zunächst 1 min ohne Stimulation gemessen (1. Teil der Kurve). Danach wurden sie stimuliert (2. Teil der Kurve; Unterbrechung =Zugabe von rhuHsp70 oder ADP).

### 2.4.1.2. Calciumioneneinstroms durch Nukleotide oder der Nukleotid-haltigen rhuHsp70 Präparation in Monozyten, nicht maturierten und maturierten DCs

#### Oberflächenmarker der Monozyten, nicht maturierten und maturierten DCs

Um das Calciumsignal in Monozyten und maturaen DCs zu untersuchen, wurden Monozyten durch negative Isolation aus Vollblut gewonnen. Ein Teil der Monozyten wurde direkt nach der Isolierung analysiert. Der andere Teil wurde mit IL-4 und GM-CSF zu DCs generiert. Am Tag 6 wurde ein Teil dieser Zellen mit Zytokinen und Stimulatoren nach Junoleit [163] maturiert. So konnten Monozyten, nicht maturierte und maturierte DCs aus einer Vollblutspende von einem Spender untersucht werden. Der Phänotyp der Zellen wurde mit FACS untersucht. Alle Zellpopulationen waren CD11c positiv entsprechend ihrer myeloischen Herkunft. Die Monozyten waren CD14 positiv und CD209 negativ (Abb. 2.16). Die DCs hatten CD209 und nur sehr schwach CD14. Durch die Maturierung mit dem Junoleit Stimulationscocktail (Material/Methoden: 5.5.7) wurde die Expression von CD40, CD80, CD86 und CD83 erhöht (Abb. 2.16.).



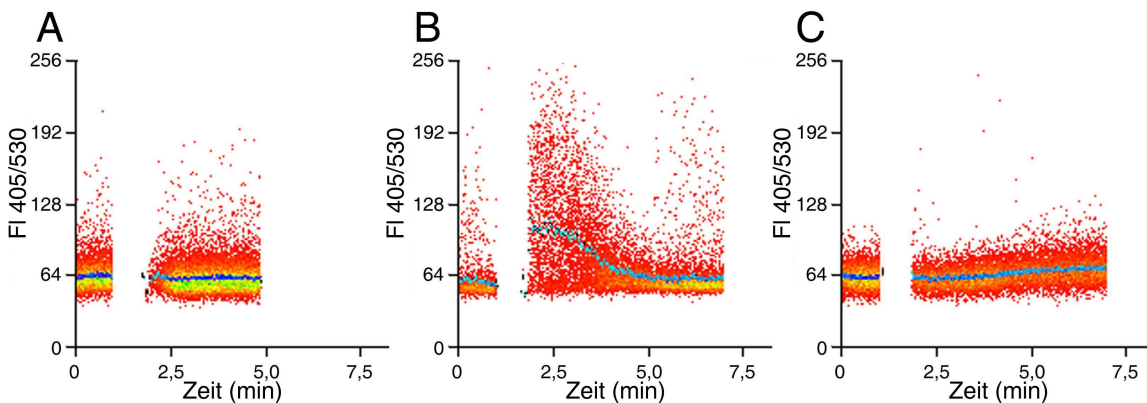
**Abbildung 2.16** FACS Analyse der Oberflächenmarker auf (A) Monozyten, (B) IL-4/GM-CSF generierten nicht maturierten DCs und (C) maturierten DCs. Mit der schwarzen Linie ist die Isotypkontrolle und mit der grauen Fläche ist der jeweilige Oberflächenmarker dargestellt. Histogrammachsen: x-Achse=Fluoreszenzintensität, y-Achse=Zellzahl



### Calciumsignal bei Monozyten, nicht matrierten und matrierten DCs

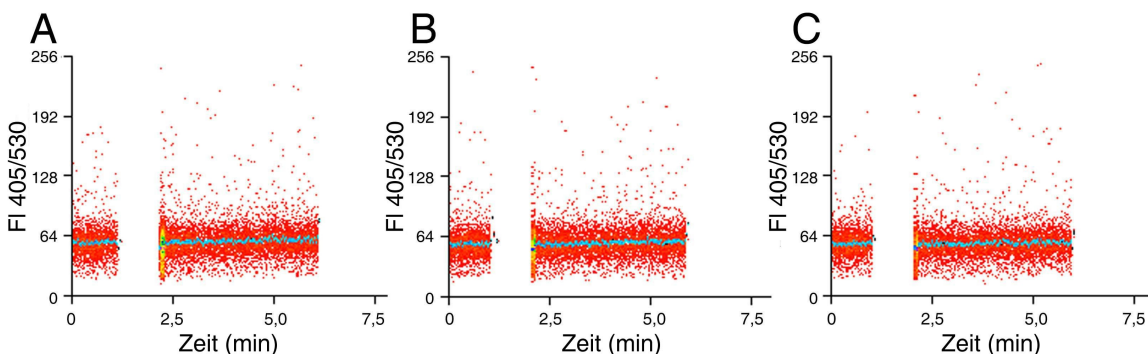
Monozyten, nicht matrierte und matrierte DCs wurden mit verschiedenen Konzentrationen von ATP oder ADP oder der Nukleotid-haltigen rhuHsp70 Präparation stimuliert und das resultierende Calciumsignal wurde gemessen.

Im Gegensatz zu den nicht matrierten DCs konnte in Monozyten und matrierten DCs durch die Nukleotid-haltige rhuHsp70 Präparation kein Calciumioneneinstrom induziert werden (Abb. 2.17).



**Abbildung 2.17** Analyse des intrazellulären Einstroms von Calciumionen nach Stimulation von (A) Monozyten, (B) nicht matrierten DCs und (C) matrierten DCs mit 300 nM rhuHsp70 (Nukleotid-haltige Präparation). Die blaue Kurve ist der Mittelwert der Werte für FI 405/530. Die Zellen wurden zunächst 1 min ohne Stimulation gemessen (1. Teil der Kurve). Danach wurden sie stimuliert (2. Teil der Kurve; Unterbrechung=Zugabe von rhuHsp70).

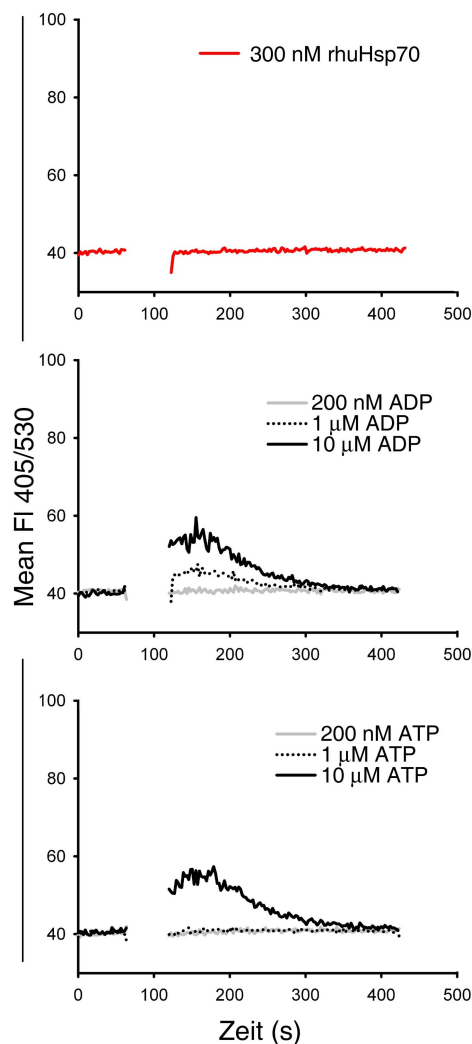
Monozyten reagierten ebenfalls nicht nach Stimulation mit ADP in verschiedenen Konzentrationen. Selbst eine relative hohe Konzentration von 10  $\mu$ M ADP induzierte keinen Calciumioneneinstrom in Monozyten.



**Abbildung 2.18** Analyse des intrazellulären Einstroms von Calciumionen nach Stimulation von Monozyten mit (A) 100 nM, (B) 1  $\mu$ M oder (C) 10  $\mu$ M ADP. Die blaue Kurve ist der Mittelwert der Werte für FI 405/530. Die Zellen wurden zunächst 1 min ohne Stimulation gemessen (1. Teil der Kurve). Danach wurden sie stimuliert (2. Teil der Kurve; Unterbrechung=Zugabe von ADP).

## Ergebnisse

Mature DCs aus einer Generierung wurden hinsichtlich ihrer Sensitivität gegenüber der rhuHsp70 Präparation, ADP oder ATP verglichen. Das eingesetzte Volumen der rhuHsp70 Präparation für eine finale Konzentration von 300 nM rhuHsp70 entsprach bei diesem Versuch einer finalen Konzentration an freien Nukleotiden von 200 nM. Weder rhuHsp70 noch 200 nM ATP oder 200 nM ADP lösten einen Calciumioneneinstrom aus (Abb. 2.19). Mature DCs reagierten auf 1  $\mu\text{M}$  ADP, aber nicht auf 1  $\mu\text{M}$  ATP. Die Signalstärke der maturen DCs nach Stimulation mit ADP bzw. ATP war somit wesentlich geringer als die der nicht maturierten DCs (vergleiche Abb. 2.14).

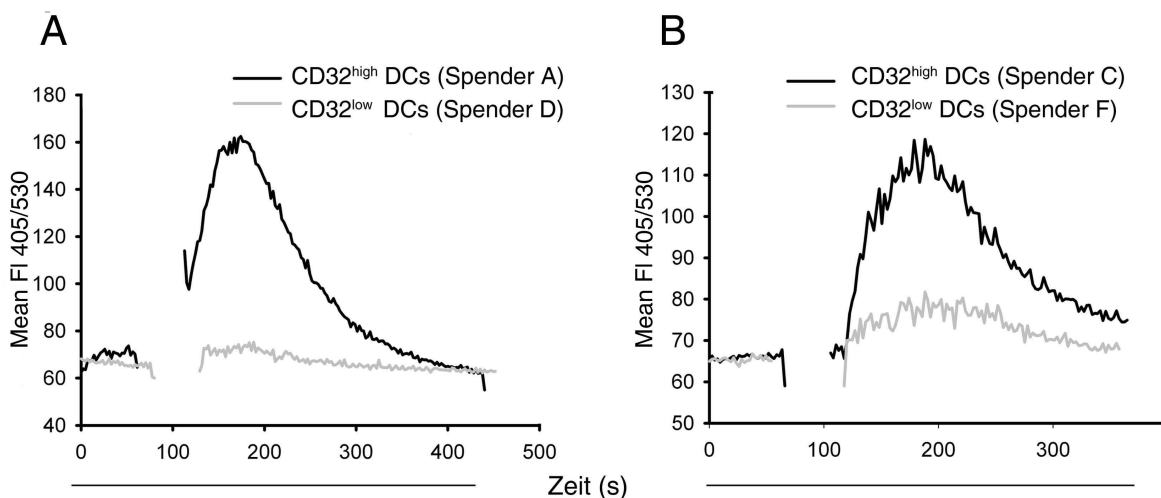


**Abbildung 2.19** Analyse des intrazellulären Einstroms von Calciumionen nach Stimulation von maturen DCs mit der Nukleotid-haltigen rhuHsp70 Präparation, ADP oder ATP in verschiedenen Konzentrationen. Es ist der Mittelwert der Werte für FI 405/530 dargestellt (=Mean FI 405/530). Die Zellen wurden zunächst 1 min ohne Stimulation gemessen (1. Teil der Kurve). Danach wurden sie stimuliert (2. Teil der Kurve; Unterbrechung = Zugabe von rhuHsp70, ATP oder ADP). Die DCs wurden aus Monozyten von einem Spender generiert.

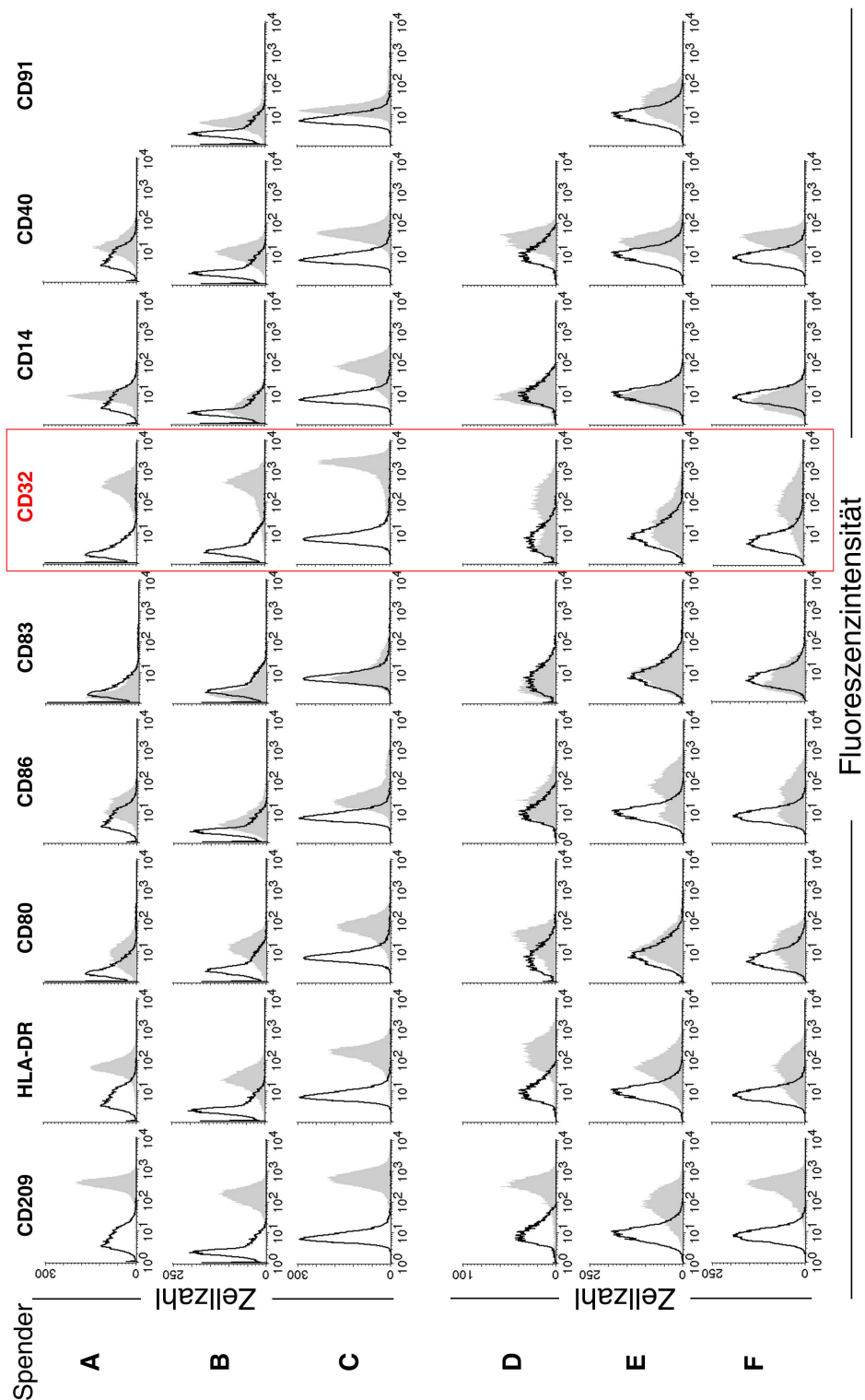
### 2.4.1.3. CD32 als Marker für die Sensitivität der DCs hinsichtlich der Aktivierung des Calciumioneneinstroms durch ADP oder der Nukleotid-haltigen rhuHsp70

#### Präparation

Die DCs von verschiedenen Spendern bzw. Vollblutchargen zeigten deutliche Unterschiede in der Induzierbarkeit des Calciumsignals durch die Nukleotid-haltige rhuHsp70 Präparation und ADP. Die Expression der Oberflächenmoleküle der DCs wurde am Tag der Calciummessung immer mittels FACS analysiert. Abbildung 2.20 zeigt die Oberflächenmarker von sechs Spendern (A-F). Alle DCs waren CD209 positiv und CD83 negativ. Die Expression von CD40, CD80 und HLA-DR war vergleichbar. Die Stärke der Expression von CD32 teilte die DCs in zwei Gruppen: Die eine Gruppe (Spender A-C) hatte eine starke CD32 Expression. Die DCs der anderen Gruppe (Spender D-F) hatten CD32 schwach exprimiert. In den DCs mit hoher CD32 Expression ( $CD32^{high}$ ) wurde durch Stimulation mit der Nukleotid-haltigen rhuHsp70 Präparation ein Calciumioneneinstrom induziert, während die DCs mit niedriger CD32 Expression ( $CD32^{low}$ ) wenig oder nicht reaktiv waren (Abb. 2.21).

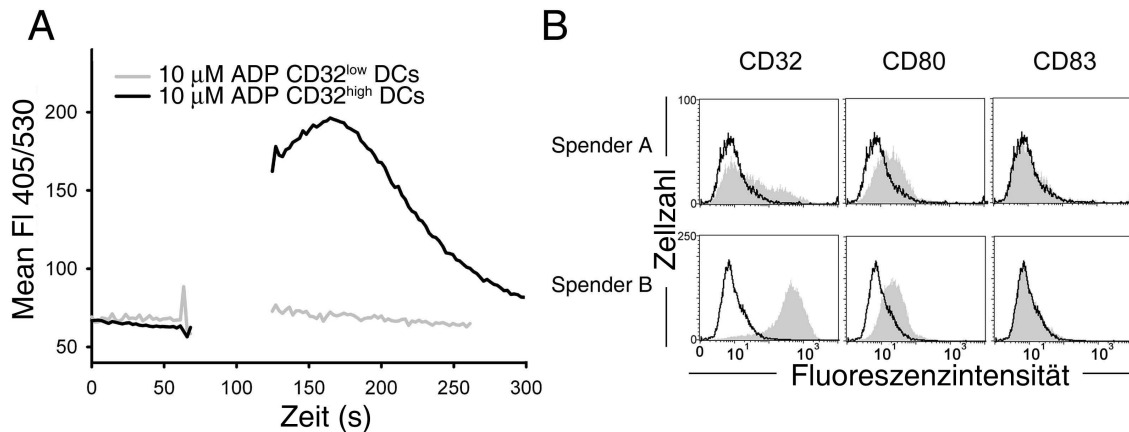


**Abbildung 2.21** Analyse des intrazellulären Einstroms von Calciumionen nach Stimulation von IL-4/GM-CSF generierten  $CD32^{high}$  DCs und  $CD32^{low}$  DCs mit 300 nM rhuHsp70 (Nukleotid-haltige Präparation).  $CD32^{high}$  und  $CD32^{low}$  DCs in Abbildung A bzw. B wurden mit jeweils der gleichen Proteincharge stimuliert. Es ist der Mittelwert der Werte für FI 405/530 dargestellt (=Mean FI 405/530). Die DCs wurden zunächst 1 min ohne Stimulation gemessen (1. Teil der Kurve). Danach wurden sie stimuliert (2. Teil der Kurve; Unterbrechung =Zugabe von rhuHsp70). (Phänotypische Charakterisierung der Spender A, C, D und F siehe Abb. 2.20)



**Abbildung 2.20** Expression der Oberflächenmarker der IL-4/GM-CSF generierten DCs von sechs Spendern (A-F). Anhand der CD32 Expression lassen sich zwei Gruppen einteilen: DCs der Spender A-C zeigen eine starke CD32 Expression; DCs der Spender D-F zeigen eine schwache CD32 Expression. Das Histogramm mit der schwarzen Linie ist die Isotypkontrolle und das Histogramm mit der grauen Fläche ist der jeweilige Oberflächenmarker. Histogrammachsen: x=Fluoreszenzintensität, y=Zellzahl

Übereinstimmend mit der vorher beschriebenen Korrelation zwischen der Oberflächenexpression von CD32 und der Induktion des Calciumioneneinstroms durch die Nukleotidhaltige rhuHsp70 Präparation wurden CD32<sup>low</sup> DCs nicht durch ADP aktiviert (Abb. 2.22A). Abbildung 2.22 B zeigt die Expression von CD32, CD80 und CD83 der für die Messung verwendeten Zellen. Die Expression von CD80 und CD83 war bei CD32<sup>high</sup> und CD32<sup>low</sup> DCs ähnlich.



**Abbildung 2.22** (A) Analyse des intrazellulären Einstroms von Calciumionen nach Stimulation von IL-4/GM-CSF generierten CD32<sup>high</sup> DCs oder CD32<sup>low</sup> DCs mit 10 μM ADP. Es ist der Mittelwert der Werte für FI 405/530 dargestellt (=Mean FI 405/530). Die DCs wurden zunächst 1 min ohne Stimulation gemessen (1. Teil der Kurve). Danach wurden sie stimuliert (2. Teil der Kurve; Unterbrechung =Zugabe von ADP). (B) FACS Analyse der Oberflächenmarker der in Abbildung A verwendeten DCs. Das Histogramm mit der schwarzen Linie ist der Isotyp und das Histogramm mit der grauen Fläche ist der Oberflächenmarker. Histogrammachsen: x=Fluoreszenzintensität, y= Zellzahl

Nach Analyse von DCs aus den Monozyten von mehr als zehn verschiedenen Spendern konnte zusammenfassend festgestellt werden, dass das Expressionsniveau von CD32 mit der Reaktivität der DCs auf Nukleotide wie ADP korrelierte. Somit kann aus der CD32 Expression vorhergesagt werden, ob ADP oder die Nukleotidhaltige rhuHsp70 Präparation in DCs einen Calciumioneneinstrom induzieren kann.

CD32 ist der FcγRII Rezeptor, der unter anderem ein Rolle bei der Antigenpräsentierung spielt. So ist beschrieben, dass die Internalisierung von Antigen-Immunglobulinkomplexen via Fcγ-Rezeptoren die Antigenpräsentierung verstärkt verglichen mit dem nicht komplexierten Antigen [164]. Über die Korrelation zwischen der Expression von CD32 und den Purinrezeptoren ist nichts bekannt. Der Grund, warum aus Monozyten mit IL-4/GM-CSF generierte DCs CD32 hoch oder niedrig exprimieren, ist nicht geklärt. Nach den Versuchen mit DCs von mehr als zehn Spendern, zeigte sich dass die CD32 Expression unabhängig von dem Spender und der Methode der Monozytenisolierung war.

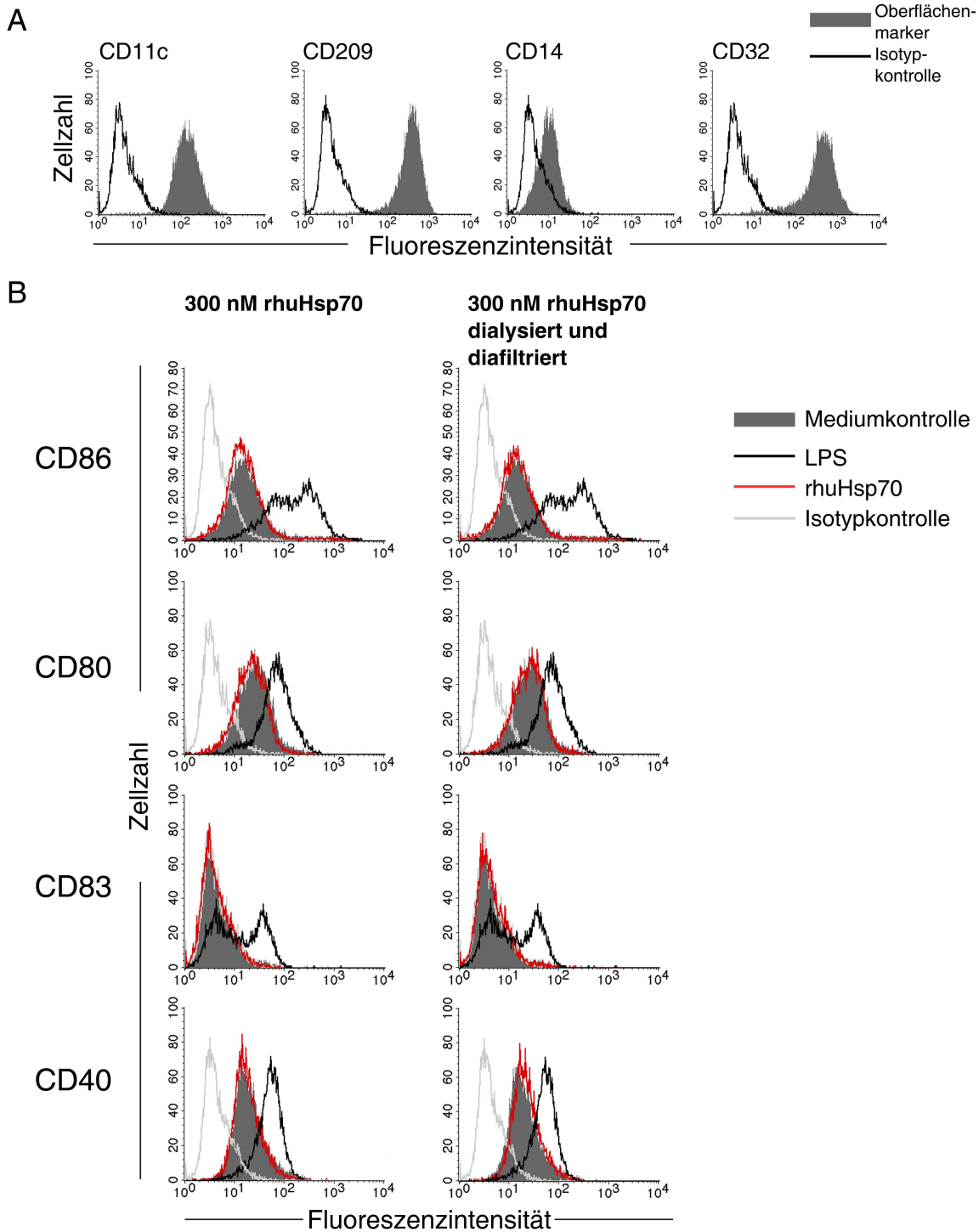
## 2.4.2. RhuHsp70 stimuliert nicht die phänotypische Maturierung der DCs

### 2.4.2.1. Klassische Oberflächenmarker

Die Rolle der humanen Hitzeschock-Proteine, insbesondere Hsp60 und Hsp70, als *Danger* Signal für das Immunsystem, wurde aus der Beobachtung abgeleitet, dass DCs nach Inkubation mit Hsp-Proteinen inflammatorische Zytokine ausschütten und die Expression von costimulatorischen Oberflächenmolekülen erhöht wird [94,103]. Diese innate Aktivierung ist mittlerweile umstritten, da die rekombinanten Hsp70 Proteine in *E.coli* hergestellt wurden und mögliche von dem *host* abstammende Produkte, wie LPS, die beschriebenen Zytokinsekretionen und die phänotypische Maturierung verursachen hätten können [146-153].

Für die Untersuchungen zur innate Signalfunktionen des rhuHsp70, wurden biochemisch sehr reine und intensiv Endotoxin-abgereinigte Präparationen eingesetzt. Um Effekte der Nukleotide auszuschließen, wurden die Proteine dialysiert und diafiltriert. Ob die freien Nukleotide ausreichend entfernt wurden, wurde durch Stimulation der DCs mit der rhuHsp70 Präparation und der Messung des Calciumioneneinstroms überprüft. Außerdem wurden die Versuche mit CD32<sup>high</sup> und CD32<sup>low</sup> DCs durchgeführt. Um zu testen, ob rhuHsp70 die Expression von Maturierungsmarkern erhöht, wurden IL-4/GM-CSF generierte nicht matrierte DCs für 48 h mit dem Protein stimuliert und anschließend wurden die Oberflächenmoleküle CD86, CD80, CD40 und CD83 mittels FACS analysiert. Die beiden als B7 Moleküle bezeichneten Marker CD80 und CD86 sowie CD40 haben wichtige Funktionen bei der Costimulation in der T-Zellaktivierung [165,166]. CD83, ein charakteristischer Marker für mature DCs, wurde ebenfalls getestet [166,167]. Die Ergebnisse wurden mit dem Kontrollansatz ohne Stimulation (Medium-Kontrolle) verglichen. Als positive Kontrolle dienten mit LPS stimulierte DCs. Abbildung 2.23 zeigt die Stimulation von CD32<sup>high</sup> DC mit 300 nM rhuHsp70 aus einer Nukleotid-haltigen und einer Nukleotid-abgereinigten Präparation. Die Nukleotid-haltige Präparation induzierte in den DCs einen deutlichen Calciumioneneinstrom. Die dialysierte und diafiltrierte rhuHsp70 Präparation induzierte kein Calciumsignal in CD32<sup>high</sup> DCs (Abb. 2.15). Für die Calciummessung und die 48 h Stimulation mit rhuHsp70 wurde jeweils eine Zellkonzentration von  $1 \times 10^6$  DCs/ ml verwendet. Somit war die Menge und Konzentration der Nukleotide pro Zelle gleich. Weder die Nukleotid-haltige noch die dialysierte und diafiltrierte Präparation veränderten die Oberflächenexpression von CD86, CD80, CD83 und CD40 (Abb. 2.23 B). LPS dagegen erhöhte die Maturierungsmarker CD86, CD80 und CD40 und induzierte CD83.

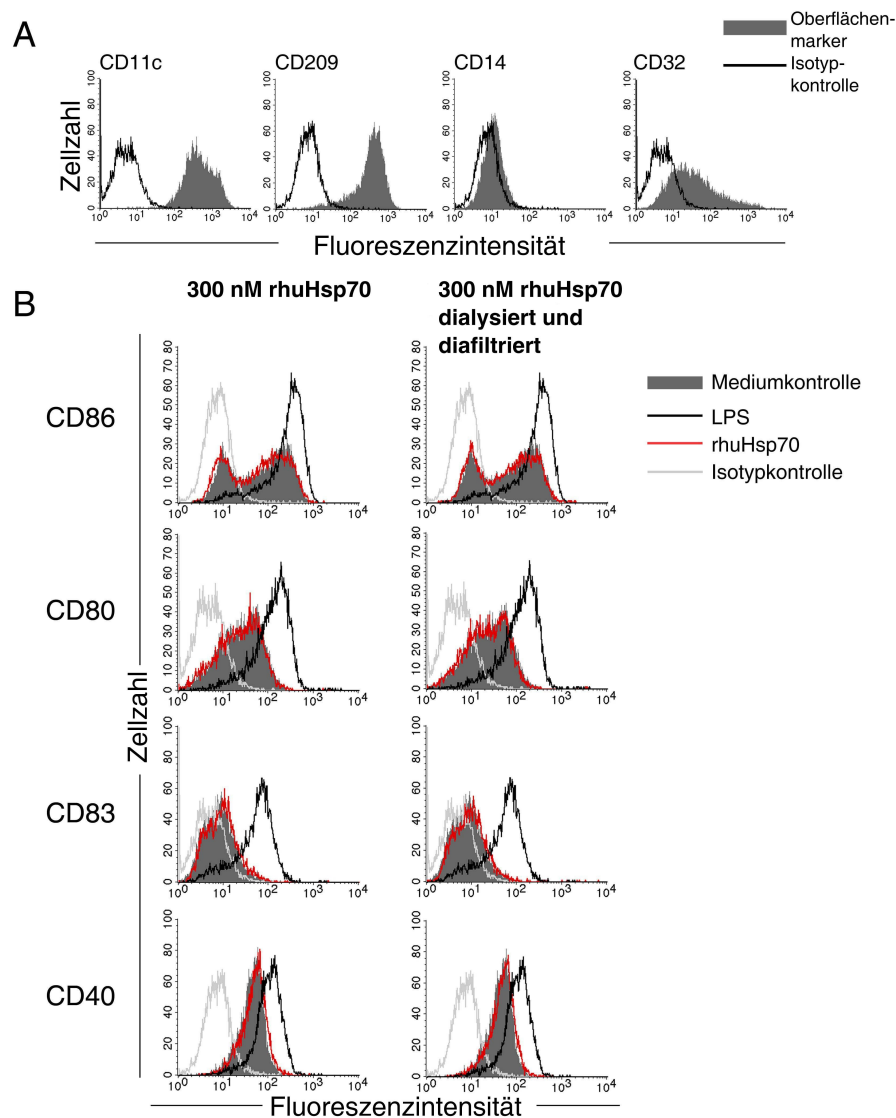
## Ergebnisse



**Abbildung 2.23** Phänotypische Charakterisierung der mit rhuHsp70 stimulierten CD32<sup>high</sup> DCs. (A) FACS Analyse der für die Stimulation verwendeten CD32<sup>high</sup> DCs. (B) CD32<sup>high</sup> DCs wurden 48 h mit 300 nM Nukleotid-haltigem rhuHsp70 (Calciumioneneinstrom aktivierende Präparation) oder 300 nM dialysiertem und diafiltriertem rhuHsp70 (aktivierte nicht den Einstrom von Calciumionen) oder 1 µg/ml LPS inkubiert. Die Oberflächenmarker CD86, CD80, CD83 und CD40 wurden mittels FACS analysiert. Histogrammachsen: x=Fluoreszenzintensität, y=Zellzahl. Es ist die Isotypkontrolle der Probe mit der Mediumkontrolle dargestellt. Die Isotypkontrollen für alle weiteren Proben waren identisch. Es ist ein repräsentatives Experiment von drei (DCs generiert aus Monozyten von drei verschiedenen Spendern) dargestellt.

## Ergebnisse

Abbildung 2.24 zeigt die Ergebnisse des Versuches der mit  $CD32^{low}$  DCs durchgeführt wurde. Diese DCs reagierten wie in 2.22 A gezeigt nicht auf die in den rhuHsp70 Präparationen enthaltenen Nukleotide. Auch bei  $CD32^{low}$  DCs induzierte rhuHsp70 keine phänotypischen Veränderungen (Abb. 2.24). LPS erhöhte in  $CD32^{low}$  DCs alle untersuchten Moleküle (Abb. 2.23 und 2.24).

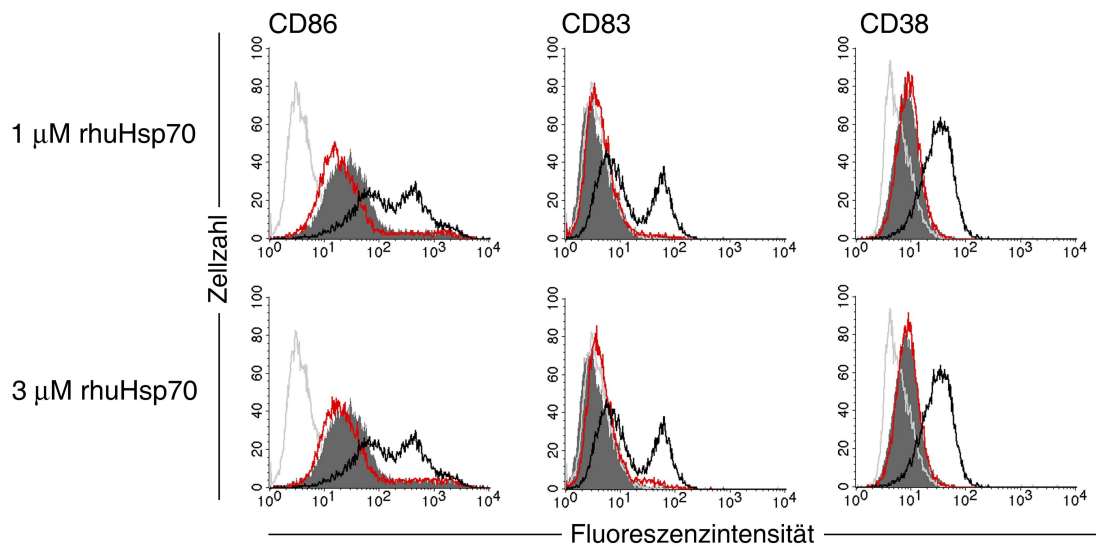


**Abbildung 2.24** Phänotypische Charakterisierung der mit rhuHsp70 stimulierten  $CD32^{low}$  DCs. (A) FACS Analyse der für die Stimulation verwendeten  $CD32^{low}$  DCs. (B)  $CD32^{low}$  DCs wurden 48 h mit 300 nM Nukleotid-haltigem rhuHsp70 (Calciumioneneinstrom aktivierende Präparation) oder 300 nM dialysiertem und diafiltriertem rhuHsp70 (aktivierte nicht den Einstrom von Calciumionen) oder 1  $\mu$ g/ml LPS inkubiert. Die Oberflächenmarker CD86, CD80, CD83 und CD40 wurden mittels FACS analysiert. Es ist die Isotypkontrolle der Probe mit der Mediumkontrolle dargestellt. Die Isotypkontrollen für alle weiteren Proben waren identisch. Histogrammachsen: x=Fluoreszenzintensität, y=Zellzahl. Es ist ein repräsentatives Experiment von zwei (DCs generiert aus Monozyten von zwei verschiedenen Spendern) dargestellt.



## Ergebnisse

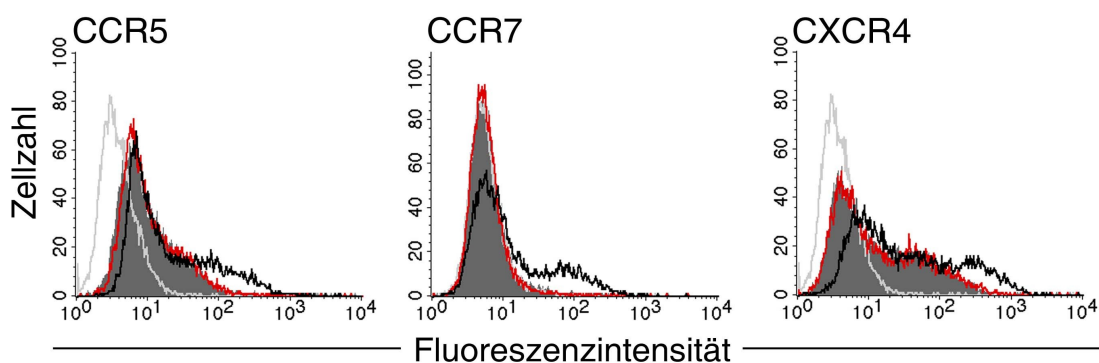
Die Erhöhung der rhuHsp70 Proteinkonzentration auf 1  $\mu\text{M}$  und 3  $\mu\text{M}$  führte ebenfalls nicht zu einer phänotypischen Maturierung der DCs (Abb. 2.25). In diesem Versuch wurde neben den klassischen Maturierungsmarkern auch CD38 analysiert. CD38, ein Ecto-enzym und Signalrezeptor, der auf Monozyten und murenen DCs exprimiert ist, unterstützt die Chemotaxis und transendotheliale Migration der DCs [169]. Außerdem fördert CD38 das Überleben der murenen DCs. In der adaptiven Immunantwort ist CD38 an der Regulation der Polarisierung zu einer  $T_H1$  Antwort beteiligt [169]. LPS induzierte im Gegensatz zu rhuHsp70 in den IL4/GM-CSF generierten DCs die Expression von CD38, ebenso wie CD83 und CD86 (Abb. 2.25).



**Abbildung 2.25** Phänotypische Charakterisierung der mit rhuHsp70 stimulierten  $\text{CD}32^{\text{high}}$  DCs. Es wurde die Oberflächenexpression von CD86, CD83 und CD38 auf IL-4/GM-CSF generierten DCs nach 48 h Inkubation mit 1  $\mu\text{M}$  oder 3  $\mu\text{M}$  Nukleotid-abgereinigtem rhuHsp70 (rote Linie) oder 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  LPS (schwarze Linie) mittels FACS untersucht. Das grau gefüllte Histogramm repräsentiert die Mediumkontrolle und die hellgraue Linie die Isotypkontrolle. Es ist die Isotypkontrolle der Probe mit der Mediumkontrolle dargestellt. Die Isotypkontrollen für alle weiteren Proben waren identisch. Histogrammachsen: x=Fluoreszenzintensität, y=Zellzahl.

### 2.4.2.2. Chemokinrezeptoren

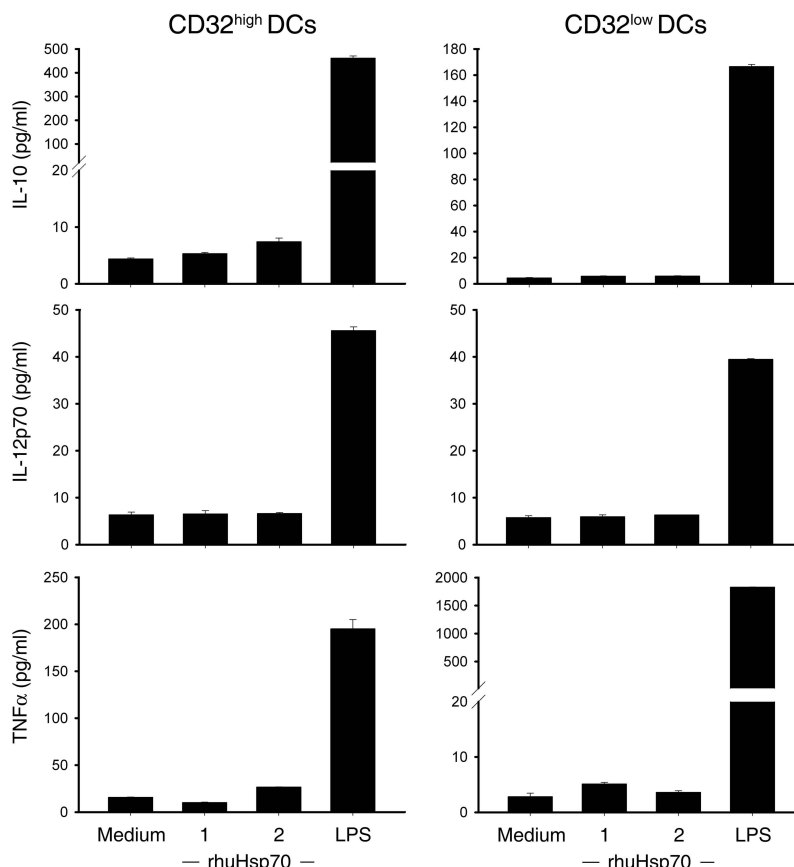
Weiterhin wurden die Chemokinrezeptoren CXCR4, CCR5 und CCR7 nach Stimulation mit einem Nukleotid-abgereinigtem rhuHsp70 untersucht. Abbildung 2.26 zeigt, dass CCR5 und CXCR4 schwach und CCR7 nicht von den IL-4/GM-CSF generierten DCs exprimiert wurde. RhuHsp70 veränderte die Expression dieser Chemokinrezeptoren nicht. LPS erhöhte die Expression der Chemokinrezeptoren geringfügig.



**Abbildung 2.26.** Oberflächenexpression von CCR5, CCR7 und CXCR4. Es wurde die Expression der Chemokinrezeptoren auf der Oberfläche von IL-4/GM-CSF generierten DCs nach 48 h Inkubation mit 300 nM Nukleotid-abgereinigtem rhuHsp70 (rote Linie) oder 1 µg/ml LPS (schwarze Linie) mittels FACS untersucht. Das grau gefüllte Histogramm repräsentiert die Mediumkontrolle und die hellgraue Linie die Isotypkontrolle. Es ist die Isotypkontrolle der Probe mit der Mediumkontrolle dargestellt. Die Isotypkontrollen für alle weiteren Proben waren identisch. Histogramm-achsen: x=Fluoreszenzintensität, y=Zellzahl. Es ist ein repräsentatives Experiment von drei (DCs generiert aus Monozyten von drei verschiedenen Spendern) dargestellt.

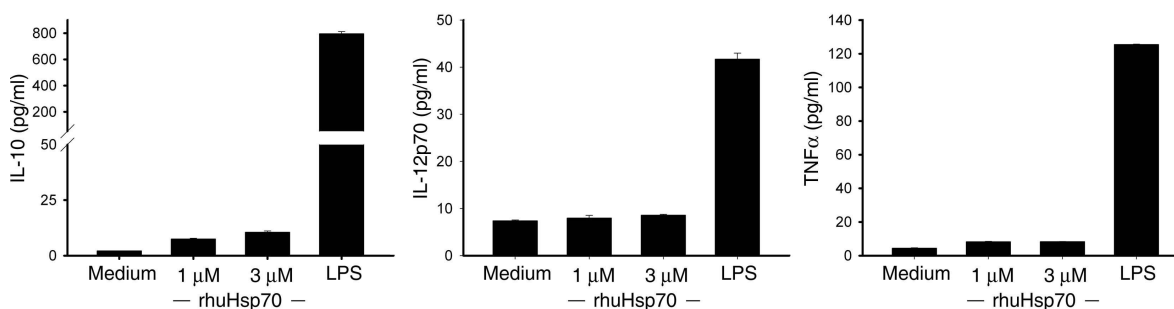
### 2.4.3. RhuHsp70 stimuliert DCs nicht zur Sekretion von Zytokinen

Um zu testen, ob das humane rhuHsp70 eine stimulatorische Funktion auf die Zytokinsekretion hat, wurden IL-4/GM-CSF generierte nicht matrierte DCs (Tag 7) für 48 h mit rhuHsp70 inkubiert. Die Menge an IL-12, IL-10 und TNF im Überstand wurde mit Elisa oder Bioplex quantifiziert. Als Kontrolle dienten parallele Ansätze, in welchen die DCs mit LPS stimuliert oder nur im Medium ohne Stimulationsreagenz inkubiert wurden. Auch diese Versuche wurden mit einer Calciumionen aktivierenden und einer nicht aktivierenden rhuHsp70 Präparation sowie CD32<sup>high</sup> und CD32<sup>low</sup> DCs durchgeführt. Abbildung 2.27 zeigt, dass unabhängig von der CD32-Expression und damit von der Kapazität durch Nukleotide ein Signal auszulösen, rhuHsp70 nicht die Sekretion von IL-12p70, IL-10 oder TNF $\alpha$  stimulierte. LPS, ein starkes *Danger* Signal für nicht-maturierte DCs, aktivierte die Freisetzung von allen drei Zytokinen, wobei die CD32<sup>low</sup> DCs weniger IL-10 und mehr TNF $\alpha$  sezernierten (Abb. 2.27). Identische Ergebnisse wurden mit DCs von insgesamt zehn Spendern erhalten.



**Abbildung 2.27** Zytokinsekretion der mit rhuHsp70 inkubierten DCs. Die Sekretion von IL-10, IL-12p70 und TNF $\alpha$  von CD32<sup>high</sup> und CD32<sup>low</sup> DCs nach 48 h Inkubation mit (1) 300 nM Nukleotidhaltigem rhuHsp70 (Calciumionen aktivierende Präparation), (2) 300 nM dilysiertem und diafiltriertem rhuHsp70 (nicht Calciumionen aktivierende Präparation) oder 1  $\mu$ g/ml LPS wurde mit dem Bioplex quantifiziert. Die Balken repräsentieren den Mittelwert von Duplikaten  $\pm$  Mittelwertabweichung (MWABW). Es ist ein repräsentatives Experimenten von zehn dargestellt.

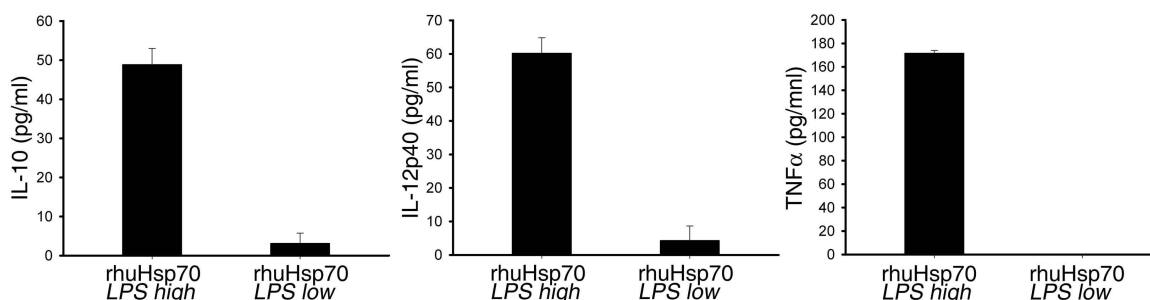
Auch höhere Konzentrationen eines intensiv Nukleotid-abgereinigten rhuHsp70 induzierten keine Sekretion von IL-10, IL-12 oder TNF $\alpha$  (Abb. 2.28).



**Abbildung 2.28.** Zytokinsekretion der mit rhuHsp70 inkubierten DCs. IL-10, IL-12p70 und TNF $\alpha$  Sekretion von DCs nach 48 h Stimulation mit 1  $\mu$ M oder 3  $\mu$ M Nukleotid-abgereinigtem rhuHsp70 oder 1  $\mu$ g/ml LPS. Die Balken repräsentieren den Mittelwert von Duplikaten  $\pm$  MWABW.

#### 2.4.3.1. LPS Verunreinigungen in den rhuHsp70 Präparationen induzieren die Sekretion von Zytokinen

Die Ergebnisse in Abbildung 2.29 zeigen, dass die Verunreinigung mit LPS die Sekretion von Zytokinen induziert. Das rhuHsp70 wurde wie beschrieben in *E.coli* hergestellt. Die rhuHsp70 Präparationen enthielten LPS, das durch Polymyxin Gele entfernt wurde. Für den Versuch wurde der Endotoxingehalt der rhuHsp70 Präparation unterschiedlich stark reduziert. RhuHsp70 *LPS low* enthielt 1,5 EU/mg. Die rhuHsp70 *LPS high* Präparation hatte einen Endotoxingehalt von 25 EU/mg. Die finalen Konzentrationen des mit dem rhuHsp70 in den Inkubationsansatz der DCs gebrachten LPS waren demnach 3 und 50  $\mu$ g/ml. RhuHsp70 *LPS high* konnte deutlich die Sekretion von IL-12(p70), IL-10 und TNF $\alpha$  steigern.

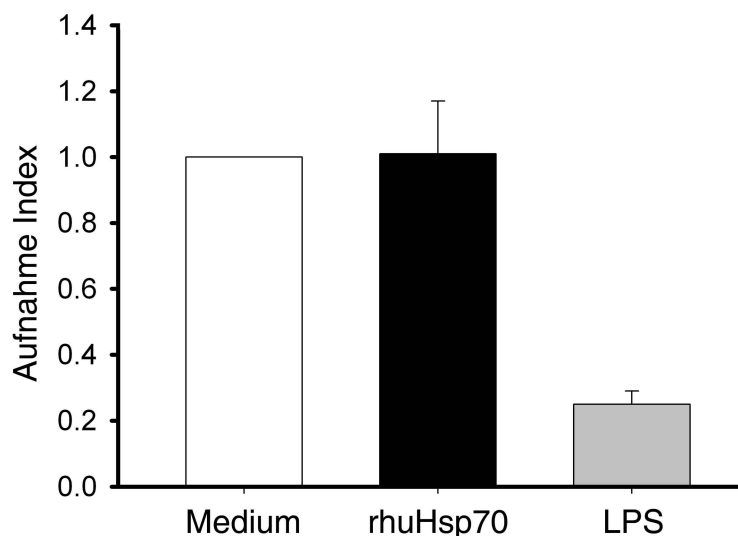


**Abbildung 2.29** Zytokinsekretion der mit rhuHsp70 *LPS high* und *LPS low* inkubierten DCs. IL-10, IL-12p70 und TNF $\alpha$  Sekretion von DCs nach 48 h Stimulation mit 300 nM rhuHsp70 *LPS high* (25 EU/mg Protein) und 300 nM rhuHsp70 *LPS low* (1,5 EU/mg Protein). Der Wert der Mediumkontrolle wurde als Hintergrund von den dargestellten Werten subtrahiert. Die Balken repräsentieren den Mittelwert von Duplikaten  $\pm$  MWABW. Es ist ein Experiment von zwei (DCs generiert aus Monozyten von zwei verschiedenen Spendern) dargestellt.

#### 2.4.4. RhuHsp70 verändert nicht die Makropinozytosekapazität der DCs

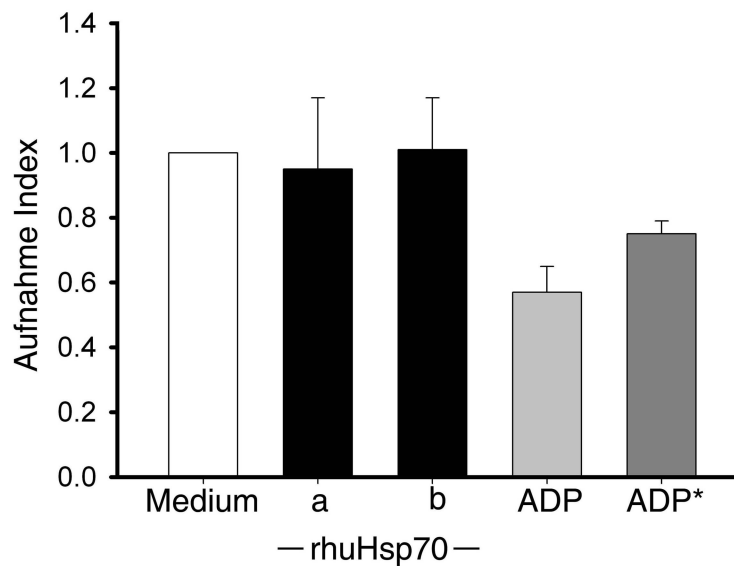
Makropinozytose ist die actinabhängige Formation von großen Vesikeln, die zu einer Internalisation von großen Mengen Flüssigkeit und darin gelöster und suspendierter Bestandteile führt [170].

Es wurde gezeigt, dass humane IL-4/GM-CSF generierte DCs eine hohe Rate eines solchen *fluid-phase uptake* ( $1100 \text{ mm}^3/\text{h}$ ) aufweisen. Sallusto et al. zeigten, dass diese als Makropinozytose bezeichnete Aufnahme durch Zugabe von Substanzen, die die Maturierung stimulieren, stark reduziert wird [171]. Um den Einfluss von humanem rhuHsp70 auf die Makropinozytosekapazität zu untersuchen, wurden IL-4/GM-CSF generierte nicht maturierte DCs für 24 h mit rhuHsp70 inkubiert. Danach wurde die Aufnahme von BSA-FITC mittels FACS untersucht. Das für die Stimulation eingesetzte intensiv dialysierte Protein veränderte die Makropinozytosekapazität nicht (Abb. 2.30). LPS induzierte, wie unter 2.4.2 und 2.4.3 gezeigt, die Maturierung der DCs. Übereinstimmend mit den in der Literatur beschriebenen Beobachtungen [170] reduzierte LPS die Makropinozytose stark (Abb. 2.30).



**Abbildung 2.30** Makropinozytose der DCs. IL-4/GM-CSF generierte DCs wurden mit 300 nM Nukleotid-abgereinigtem rhuHsp70 oder 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  LPS inkubiert. Nach 24 h wurden die Zellen gewaschen und die BSA-FITC Aufnahme nach 90 min mittels FACS analysiert. Der Aufnahme Index ist die Differenz aus der mittleren Fluoreszenzintensität (MFI) der Probe bei 37 °C und der MFI der Probe auf Eis. Die Mediumkontrolle wurde als Referenz (=1) genommen und alle weiteren Proben sind als Vielfaches davon dargestellt. Die Balken repräsentieren den Mittelwert der Ergebnisse aus drei unabhängigen Versuchen  $\pm$  MWABW.

Der Vergleich zu der Calciumioneneinstrom aktivierenden rhuHsp70 Präparation in Abbildung 2.31 zeigt, dass die enthaltene Menge an Nukleotiden keinen Einfluss auf die BSA Aufnahme der eingesetzten CD32<sup>high</sup> DCs hatte. Die Stimulation mit einer höheren Konzentration an ADP (250 µM) führte zu einer deutlichen Reduzierung der Makropinozytose. Bei gleichzeitiger Gabe von BSA-FITC und ADP (ADP\*) konnte im Vergleich zur Mediumkontrolle innerhalb von zwei Stunden Aufnahme bereits eine Inhibition beobachtet werden, die fast so stark war, wie die bei den mit ADP 24 h vorinkubierten DCs (Abb. 2.31).



**Abbildung 2.31** Makropinozytose der DCs. IL-4/GM-CSF generierte CD32<sup>high</sup> DCs wurden mit 300 nM einer Nukleotid-haltigen (Calciumeinstrom aktivierend) (**a**), 300 nM einer Nukleotid-abgereinigtem rhuHsp70 Präparation (**b**) oder 250 µM ADP stimuliert. Nach 24 h wurden die Zellen gewaschen und die BSA-FITC Aufnahme nach 90 min mittels FACS analysiert. ADP\*:In einem weiteren Ansatz wurden nicht vorstimulierte DCs gleichzeitig mit 250 µM ADP und BSA-FITC inkubiert. Nach 2 h wurden diese Zellen gewaschen und die BSA-FITC Aufnahme bestimmt. Der Aufnahme Index ist die Differenz aus der mittleren Fluoreszenzintensität (MFI) der Probe bei 37 °C und der MFI der Probe auf Eis. Die Mediumkontrolle wurde als Referenz (=1) genommen und alle weiteren Proben sind als Vielfaches davon dargestellt. Die Balken repräsentieren den Mittelwert der Ergebnisse aus drei unabhängigen Versuchen ± MWABW.

## 2.5. RhuHsp70 in der Kreuzpräsentation von exogenen Peptidantigenen

Die DCs können exogene Antigene aufnehmen und nach intrazellulärer Prozessierung auf MHC-Klasse-I Moleküle laden. Laut Literatur werden über diesen als Kreuzpräsentation bezeichneten Weg an Hsp-Proteinen gebundene Antigene den CD8<sup>+</sup> T-Zellen präsentiert [128-130]. In den folgenden Versuchen wurde die Präsentation von exogenen Peptidantigenen auf MHC-Klasse-I untersucht. Die eingesetzten Peptidantigene b-pep70-MART-1 und b-pep70-Tyr bestehen aus 23 Aminosäuren und einem Biotinrest. Auf MHC-Klasse-I werden kurze, acht bis zehn Aminosäuren lange Peptide geladen. Die für die Versuche eingesetzten Peptide müssen demnach für die Beladung auf MHC-Klasse-I prozessiert werden. Dies geschieht nach Aufnahme in die APCs (DCs oder Zellen einer B-Zelllinie) durch verschiedene Mechanismen (=Kreuzpräsentation) (siehe Einleitung 1.1.2.1).

Ziel dieser Arbeit war es nicht nur die Kreuzpräsentation der an rhuHsp70 gebundenen Peptide zu untersuchen, sondern auch die Funktion von rhuHsp70 zu quantifizieren. Dafür wurde ein experimenteller Aufbau gewählt, der es erlaubte, gleiche Konzentration von Antigenen, allein oder in Komplex mit rhuHsp70, zu vergleichen. Zunächst wurden gleiche Mengen an Antigen vorgelegt und Endotoxin- und Nukleotid-abgereinigtes rhuHsp70 oder nur Puffer zugegeben. Nach Inkubation (in der Regel 4 h) bei Raumtemperatur (RT) wurden die DCs (oder Zellen einer B-Zelllinie) und nach einer weiteren Stunde die Antigen-spezifischen T-Zellen zugegeben. Es wurden DCs von verschiedenen Spendern getestet. Die Expression von CD32 hatte, wie im folgenden beschrieben wird, keinen Einfluss auf den durch rhuHsp70 vermittelten Effekt in der Kreuzpräsentation.

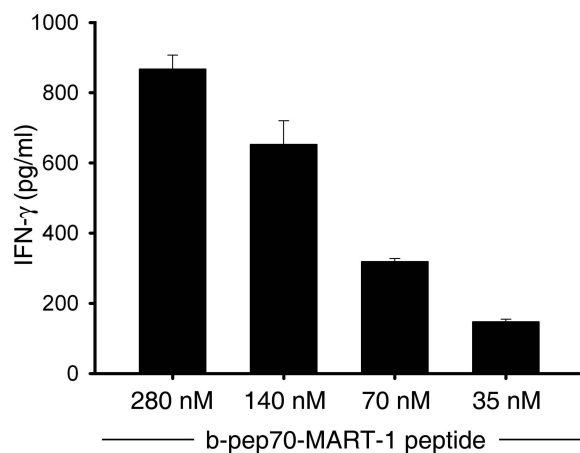
Für die Versuche wurden zwei verschiedene Tumor assoziierte Peptidantigene, Melan-A/MART-1 (27-35) und Tyrosinase (368-376), verwendet. Diese wurden als Hybridpeptide mit der hoch-affinen Hsp70 bindenden Sequenz pep70 (HWDFAWPW) synthetisiert [139-141] (b-pep70-MART-1= biotin-GSGHWDFAWPWGSGLAGIGILTV und b-pep70-Tyr= biotin-GSGHWDFAWPWGSGYMNGTMSQV). Mit gelb markiert sind die nonameren Peptide die an MHC-Klasse-I binden. Das gesamte Hybridpeptid muss also zunächst von den APCs (DCs) prozessiert werden, um das Nonamer zu erhalten. Durch Einfügen der grau markierten pep70 Sequenz sollte die Komplexbildung verbessert werden.

Die verwendeten zytotoxischen T-Zellklone MART A42 und TyrF8 setzen nach HLA-A2 abhängiger Erkennung von MART-1(27-35) bzw. Tyrosinase (368-376) IFN- $\gamma$  frei. Die Menge das freigesetzten IFN- $\gamma$  korreliert mit der Intensität der T-Zellaktivierung, die in diesem Test wiederum von der Menge des präsentierten Antigens abhängt. Daher kann mit der IFN- $\gamma$  Freisetzung durch die T-Zellen die Effizienz der Kreuzpräsentation der

Peptidantigene beurteilt werden. Die Bestimmung des IFN- $\gamma$  erfolgte mit Elisa (Material /Methoden 5.6.1).

### 2.5.1. RhuHsp70 verstärkt die Kreuzpräsentation von b-pep70-MART-1 und b-pep70-Tyr durch DCs

Als Antigen-präsentierende Zellen wurden für die Versuche IL-4/GM-CSF generierte DCs (Tag 6-8) verwendet. Zunächst wurden verschiedene Konzentrationen des b-pep70-MART-1 Peptides getestet. Bereits mit DCs, die mit einer Peptidkonzentration von 35 nM gepulst wurden, konnten die MART-A42 T-Zellen stimuliert werden (Abb. 2.32).



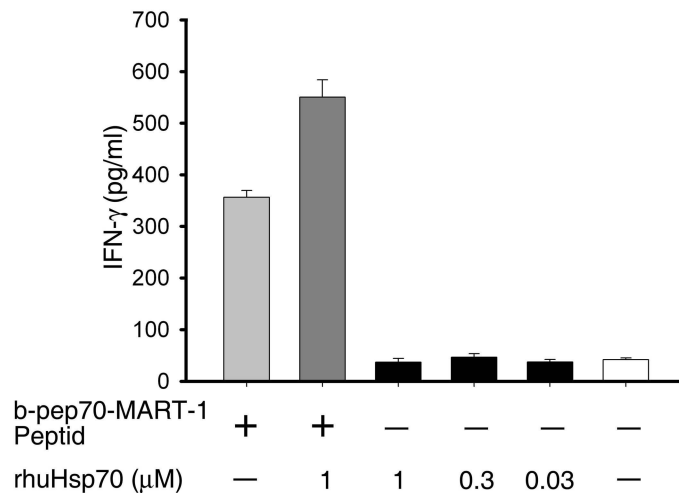
**Abbildung 2.32** Präsentation von b-pep70-MART-1 durch DCs. DCs wurden mit verschiedenen Konzentrationen von b-pep70-MART-1 Peptid (35-280 nM) inkubiert. Nach 1 h wurden die MART A42 T-Zellen zugesetzt und die IFN- $\gamma$  Freisetzung nach 24 h mittels Elisa gemessen. Die Balken repräsentieren den Mittelwert von Triplikaten  $\pm$  MWABW. Es ist ein Experiment von zwei (DCs generiert aus Monozyten von zwei verschiedenen Spendern) dargestellt.

Für die weiteren Versuche wurden 70 nM b-pep70-MART-1 Peptid eingesetzt, da die bei dieser Konzentration freigesetzte Menge an IFN- $\gamma$  in einem niedrigen aber noch gut detektierbaren Bereich lag.

Durch die Vorinkubation des Peptidantigens mit rhuHsp70 wurde die IFN- $\gamma$  Freisetzung signifikant gesteigert (Abb. 2.33 und 2.34). RhuHsp70 allein stimulierte, wie in Abbildung 2.33 dargestellt, nicht die IFN- $\gamma$  Sekretion der T-Zellen.



## Ergebnisse



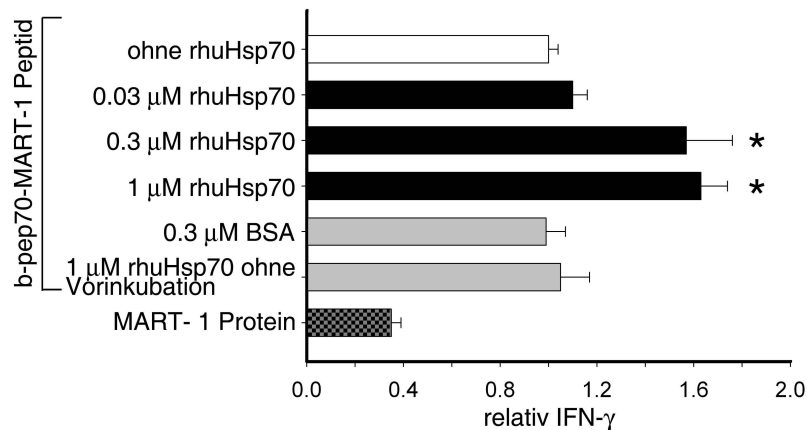
**Abbildung 2.33** Präsentation von b-pep70-MART-1 oder rhuHsp70:b-pep70-MART-1 durch DCs. DCs wurden zu 70 nM b-pep70-MART-1 Peptid allein, zu 70 nM b-pep70-MART-1 Peptid, das mit 1 μM rhuHsp70 bei RT vorinkubiert worden war (Methoden 5.4.1), oder verschiedenen Konzentrationen von rhuHsp70 (0,03 – 1 μM) gegeben. Nach 1 h wurden die MART A42 T-Zellen zugesetzt und die IFN-γ Freisetzung nach 24 h gemessen (Elisa). Die Balken repräsentieren den Mittelwert von Triplikaten ± MWABW. Es ist ein repräsentatives Experiment von drei (DCs generiert aus Monozyten von drei verschiedenen Spendern) dargestellt.

Für jede Probe mit Peptid wurde eine korrespondierende Probe mit den gleichen Zusätzen aber ohne Peptid angesetzt. Die IFN-γ Konzentrationen dieser Kontrollproben wurden für alle folgenden Darstellungen von denen der Peptidproben subtrahiert. Die durch das Peptid alleine induzierte IFN-γ Menge diente als Referenzwert und die bei allen weiteren Proben gemessene IFN-γ Menge wurden als das Vielfache davon dargestellt.

Wurde bei gleicher Peptidmenge mehr rhuHsp70 zugesetzt und diese Mischung vorinkubiert, so zeigte sich eine mit der rhuHsp70 Menge korrelierende Zunahme der T-Zell Stimulation (Abb. 2.34). Mit BSA, einem Molekül, das mit 60 kDa [172] eine ähnliche Größe wie Hsp70 hat und auch wasserlöslich ist, konnte die Kreuzpräsentation nicht verstärkt werden. Mit der *Surface Plasmon Resonance Spectroscopy* wurde gezeigt, dass rhuHsp70, nicht aber BSA, b-pep70-MART-1 bindet (Abb. 2.4).

Wurde rhuHsp70 ohne Vorinkubation direkt mit den DCs zu den b-pep70-MART-1 Peptid gegeben, konnte keine Verstärkung gemessen werden (Abb. 2.34). Dieses Ergebnis war ein Hinweis dafür, dass die verstärkende Funktion von der Komplexbildung abhing. Darüber hinaus konnte mit dieser Probe ausgeschlossen werden, dass die gemessenen Effekte von eventuellen frei vorliegenden Kontaminationen in der rhuHsp70 Präparation, wie den Nukleotiden, verursacht wurden. Im Vergleich zu gleichen Konzentrationen von Peptidantigen und dem Vollängenprotein MART-1 stimulierten die DCs aus dem Ansatz mit dem rhuHsp70:Peptid Komplex die höchste Freisetzung von IFN-γ (Abb. 2.34).

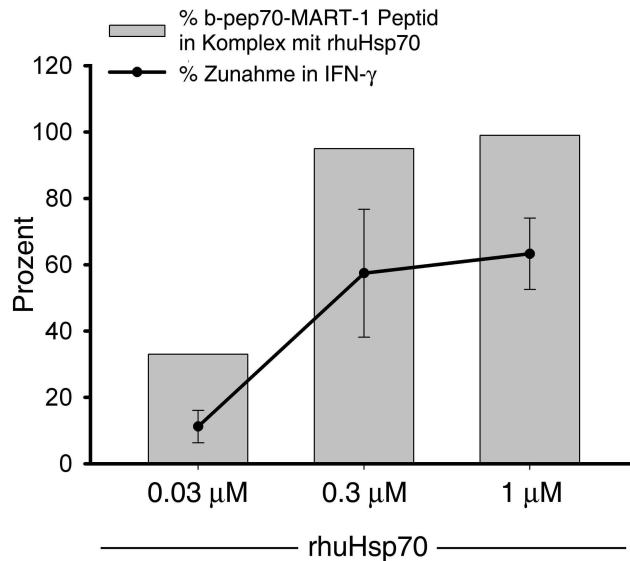
## Ergebnisse



**Abbildung 2.34** Präsentation von b-pep70-MART-1 durch DCs. 70 nM b-pep70-MART-1 Peptid wurden mit verschiedenen Konzentrationen rhuHsp70 oder 0,3 μM BSA bei RT inkubiert (Methoden 5.4.1). Die DCs wurden zu diesen vorinkubierten Ansätzen, 70 nM b-pep70-MART-1 Peptid ohne rhuHsp70 oder 70 nM MART-1 Protein gegeben. In einem weiteren Ansatz wurde die DCs zu einer Mischung von 70 nM b-pep70-MART-1 Peptid und 1 μM rhuHsp70, die nicht vorinkubiert wurde, zugesetzt. 24 h nachdem die MART-A42 T-Zellen zugegeben worden waren, wurde die Menge an IFN- $\gamma$  im Überstand mittels Elisa bestimmt. Die Balken repräsentieren den Mittelwert von Triplikaten  $\pm$  MWABW. Die Probe mit b-pep70-MART-1 allein diente als Referenz (=1) für alle weiteren Proben, die als Vielfaches davon dargestellt sind. Die Signifikanz der Steigerung durch die Inkubation des b-pep70-MART-1 Peptides mit 0,3 oder 1 μM rhuHsp70 wurde aus den Ergebnissen von drei unabhängigen Experimenten (DCs generiert aus Monozyten von drei verschiedenen Spendern) mit den Wilcoxon Rank Sum Test bestimmt ( $p < 0,005$ ).

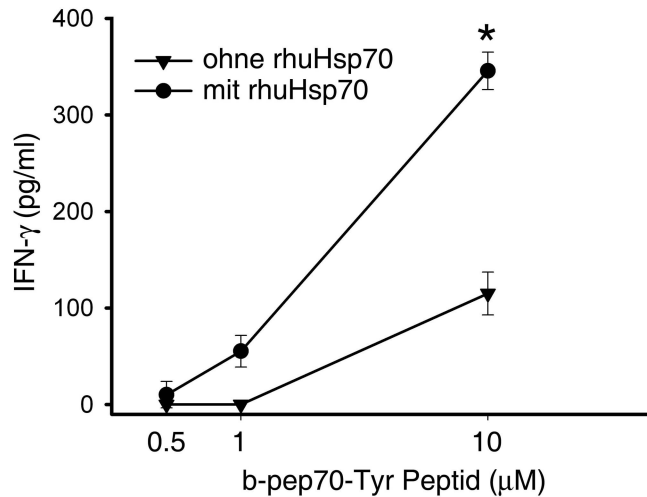
Das Fehlen der Steigerung bei dem Ansatz mit rhuHsp70 ohne Vorinkubation deutete daraufhin, dass die Komplexbildung zwischen Peptid und rhuHsp70 die Voraussetzung für den verstärkenden Effekt war. Die Kreuzpräsentation sollte demnach umso mehr verstärkt werden, je mehr Peptid durch rhuHsp70 gebunden war. Der Anteil des gebundenen Peptides wurde mit dem durch Fluoreszenztitration (Dr. Maya Pandya, Lehrstuhl Biotechnologie IV, Department of Chemistry, München Technische Universität, Garching) bestimmten  $K_d$ -Wertes von 0,093 μM und der quadratischen Bindungsgleichung berechnet (Material/Methoden 5.4.2.). In dem Voransatz vor Zugabe der Zellen waren bei einer Konzentration von 0,21 μM, 2,1 μM, oder 7 μM rhuHsp70 (finale Konzentrationen bei der Kreuzpräsentation: 0,03 μM, 0,3 μM, und 1 μM ) 33 %, 95 % bzw. 99 % des Peptides gebunden. Abbildung 2.35 zeigt, dass entsprechend dem Postulat, dass die Komplexbildung entscheidend für die Kreuzpräsentation ist, die Zunahme der IFN- $\gamma$  Sekretion mit dem Anteil des rhuHsp70 gebundenen Peptides korrelierte. Parallel zu der Sättigung im Anteil des komplexierten Peptides war eine Sättigung in der IFN- $\gamma$  Sekretion zu sehen.

## Ergebnisse



**Abbildung 2.35** Korrelation zwischen der Komplexbildung zwischen Peptid und rhuHsp70 und der Steigerung der IFN- $\gamma$  Freisetzung: Die Balken stellen den Anteil des b-pep70-MART-1 Peptids in Komplex mit rhuHsp70 vor Zugabe der DCs dar. Der prozentuale Anteil wurde mit der quadratischen Bindungsgleichung (siehe Methoden 5.4.2) und dem von Dr. M. J. Pandya, (Lehrstuhl Biotechnologie IV, Department of Chemistry, München Technische Universität, Garching) bestimmten  $K_d$ -Wertes berechnet. Die IFN- $\gamma$  Freisetzung wurde im Vergleich zwischen A42 T-Zellen, die mit den rhuHsp70:b-pep70-MART-1 Peptid Komplex oder b-pep70-MART-1 Peptid ohne rhuHsp70 gepulsten DCs stimuliert wurden, bestimmt. Die Linie zeigt die prozentuale Zunahme der IFN- $\gamma$  Sekretion durch die Inkubation des Peptides mit rhuHsp70, berechnet als Mittelwert  $\pm$  MWABW aus Triplikaten.

Abbildung 2.36 zeigt, dass rhuHsp70 auch die Kreuzpräsentation eines zweiten Peptids, b-pep70-Tyr, signifikant verstärkte. Um mit diesem Peptid eine messbare Antwort zu erhalten, mussten deutlich höhere Konzentrationen im Vergleich zu b-pep70-MART-1 eingesetzt werden. Durch Vorinkubation mit rhuHsp70 konnte das für das Testsystem bestehende Limit einer effektiven Peptidkonzentration herabgesetzt werden.



**Abbildung 2.36** Präsentation von b-pep70-Tyr oder rhuHsp70:b-pep70-Tyr durch DCs. Die DCs wurden zu der vorinkubierten Mischung von b-pep70-Tyr Peptid (0,5, 1 und 10 μM) und rhuHsp70 (1 μM) oder dem b-pep70-Tyr Peptid allein gegeben. Die TyrF8 T-Zellen wurden zugesetzt und nach 24 h wurde die Menge des freigesetzten IFN-γ bestimmt. Es ist der Mittelwert von Triplikaten ± MWABW eines repräsentativen Experimentes dargestellt. Die IFN-γ Freisetzung in den Proben mit rhuHsp70 vorinkubiertem Peptid war signifikant höher als die in den Proben mit Peptid allein (Wilcoxon Rank Sum Test:  $p < 0,005$ ,  $n=3$  unabhängige Experimente: DCs aus Monozyten von drei verschiedenen Spendern).

Die für die Kreuzpräsentation verwendeten DCs hatten eine relativ hohe Expression von CD32. Die Verstärkung durch rhuHsp70 konnte auch in DCs mit niedriger Expression von CD32 gemessen werden. Der beobachtete Unterschied in der CD32 Expression der IL-4/GM-CSF generierten DCs hatte somit keinen Einfluss auf die Kreuzpräsentation.

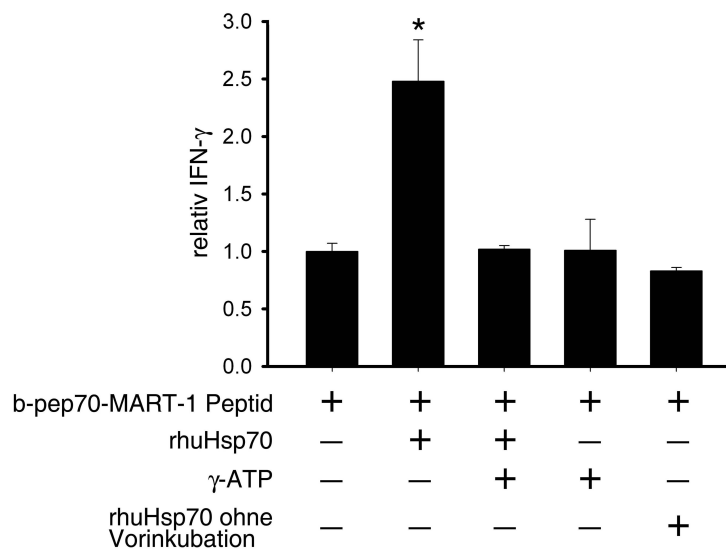
### 2.5.2. RhuHsp70 verstärkt die Kreuzpräsentation von b-pep70-MART-1 und b-pep70-Tyr durch eine B-Lymphozyten Zelllinie

Als eine weitere Antigen-präsentierende Zelle wurde die B-LCL (*lymphocyte cell line*) Zelllinie L721.45 verwendet. Die effektiven Konzentrationen für die Kreuzpräsentation durch diese Zellen waren wie für die DCs 70 nM b-pep70-MART-1 und 10 μM b-pep70-Tyr. Durch Vorinkubation der Peptide mit rhuHsp70 konnte die Kreuzpräsentation über das Zweifache verstärkt werden (Abb. 2.37 und 2.39). Die gleichzeitige Zugabe von rhuHsp70 mit den B-LCL zu b-pep70-MART-1 ohne Vorinkubation hatte keinen Effekt auf die durch die Peptid-Präsentation stimulierte Freisetzung von IFN-γ (Abb. 2.37).

### Die Verstärkung der Kreuzpräsentation benötigt die Bildung eines stabilen Komplexes

Die Bindung von Peptiden an Hsp70 wird durch den ATPase Zyklus des Chaperones reguliert. Die Art des an die N-terminalen ATPase-Domäne gebundenen Nukleotids (ATP oder ADP) bestimmt wesentlich die Substratbindungseigenschaften der C-terminalen

Hsp-Domäne. Ist ATP gebunden, binden und dissoziieren die Peptidsubstrate sehr schnell. Dieser labile Hsp70-ATP-Peptid Komplex wird durch die Hydrolyse von ATP zu ADP konformationsbedingt in einen hoch-affinen Komplex umgewandelt [173,174]. Abbildung 2.37 zeigt, dass durch Zugabe von nicht hydrolysierbarem  $\gamma$ -ATP zu der Mischung von b-pep70-MART-1 und Hsp70 zu Beginn der Inkubation die Verstärkung aufgehoben wurde. Dieses Ergebnis weist darauf hin, dass ein stabiler rhuHsp70-Peptid Komplex für die Verstärkung notwendig war. Wie in Abbildung 2.37 dargestellt, veränderte  $\gamma$ -ATP in der verwendeten Konzentration die Präsentation des b-pep70-MART-1 Peptides ohne Hsp70 nicht und hatte somit keinen Einfluss auf die Antigen-präsentierenden Eigenschaften der B-Zelllinie oder die Reaktionskapazität der T-Zellen.

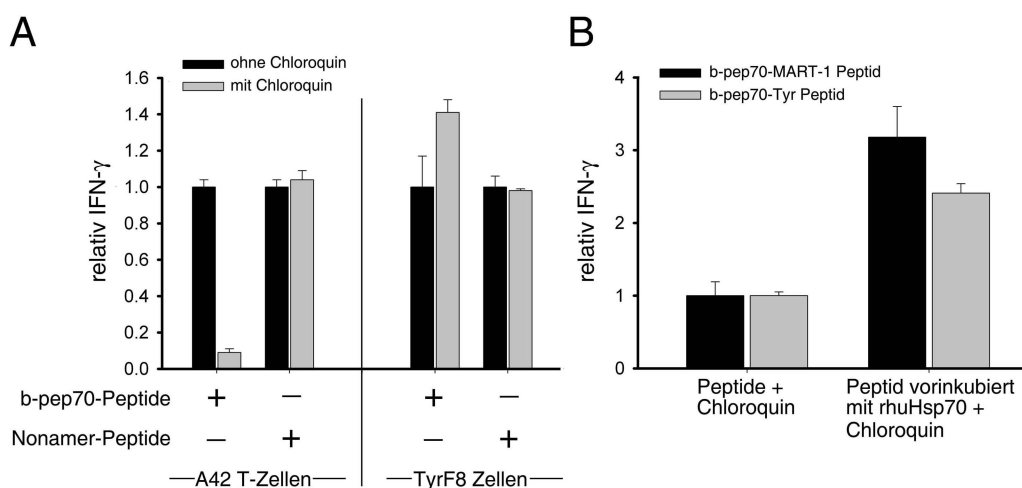


**Abbildung 2.37** Präsentation von b-pep70-MART-1 oder rhuHsp70:b-pep70-MART-1 durch B-LCL. Die Zellen der B-Zelllinie L721.45 wurden zu b-pep70-MART-1 Peptid (70 nM) alleine, b-pep70-MART-1 Peptid (70 nM) nach Vorinkubation mit rhuHsp70 (300 nM) in Anwesenheit und Abwesenheit von 600 nM  $\gamma$ -ATP oder der nicht vorinkubierten Mischung von b-pep70-MART-1 Peptid (70 nM) und rhuHsp70 (300 nM) gegeben. Das durch die MART A42 T-Zellen freigesetzte IFN- $\gamma$  wurde nach 24 h bestimmt. Die Balken repräsentieren den aus Triplikaten bestimmten Mittelwert  $\pm$  MWABW. Die Probe mit b-pep70-MART-1 allein wurde als Referenz 1 gesetzt und alle weiteren Proben sind als Vielfaches davon dargestellt. Die Signifikanz ( $p < 0,005$ ) der rhuHsp70 vermittelten Zunahme gegenüber der Probe mit Peptidantigen allein wurde wie beschrieben aus den Ergebnissen von drei unabhängigen Experimenten bestimmt.

### 2.5.3. Die rhuHsp70 vermittelte Verstärkung der Kreuzpräsentation ist proximal von Antigen-Prozessierung und intrazellulären Präsentationswegen

Der Prozess der Kreuzpräsentation beginnt mit der Internalisierung der exogenen Antigene in endosomale Kompartimenten [52,53]. Die für die MHC-Klasse-I Beladung geeigneten Peptide können nach dem Transport in das Zytosol oder auch in den Kompartimenten generiert werden. Endosomale Kompartimente enthalten Proteasen, die

die internalisierten Proteine degradieren. Viele der als Cathepsine bezeichneten Cysteinproteasen benötigen für ihre katalytische Aktivität einen niedrigen pH Wert, der durch die ATP abhängige vakuoläre Protonenpumpe (V-ATPase) reguliert wird. Für lösliche exogene Antigene wurden gezeigt, dass die Inhibition der endosomalens Ansäuerung die Kreuzpräsentation drastisch verstärkt [175]. Die Abhängigkeit der Kreuzpräsentation des b-pep70-MART-1 Peptides, b-pep70-Tyr Peptides und der rhuHsp70:Peptid Komplexe von dem endosomalens pH-Wert wurde in den IL-4/GM-CSF generierten DCs untersucht. Dafür wurde zu den DCs Chloroquin zugesetzt. Chloroquin ist als lysomotropes Reagenz beschrieben, das durch die Inhibition der intravesikalen Ansäuerung die Aktivität einiger Proteasen und somit die Proteolyse der Antigene beeinflusst [176,177].



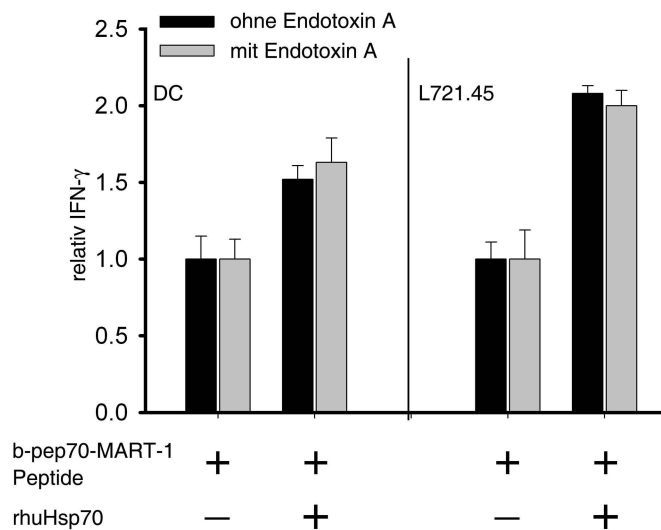
**Abbildung 2.38** Präsentation von b-pep70-MART-1 oder -Tyr oder der rhuHsp70:Peptidkomplexe durch DCs in Abhängigkeit von Chloroquin. (A) DCs wurden in An- und Abwesenheit von Chloroquin (10 µg/ml) mit den Nonamerpeptiden MART-1 (27-35) (12 µM) oder Tyrosinase (368-376) (10 µM) oder den b-pep70-Peptiden (70 nM b-pep70-MART-1 und 10 µM b-pep70-Tyr) gepulst. Die A42- oder TyrF8 T-Zellen wurden zugesetzt und die IFN-γ Freisetzung nach 24 h gemessen. Die Probe ohne Chloroquin wurde als Referenz (=1) genommen und die zugehörige Probe mit Chloroquin wurde als Vielfaches davon dargestellt. (B) DCs wurden in Anwesenheit von Chloroquin (10 µg/ml) mit den b-pep70-Peptiden allein (70 nM b-pep70-MART-1 und 10 µM b-pep70-Tyr) oder mit den mit rhuHsp70 (1 µM) vorinkubierten b-pep70-Peptiden gepulst. Die A42 oder TyrF8 T-Zellen wurden zugesetzt und die IFN-γ Freisetzung nach 24 h gemessen. Die Probe ohne rhuHsp70 diente als Referenz (=1) und die Proben mit rhuHsp70 wurden als Vielfaches davon dargestellt. Die Balken repräsentieren den aus Triplikaten bestimmten Mittelwert ± MWABW eines repräsentativen von zwei Experimenten.

Die Kreuzpräsentation der beiden Antigene wurde durch Chloroquin unterschiedlich beeinflusst. Während die Präsentation der b-pep70-MART-1 Peptide stark verringert wurde, wurde die der b-pep70-Tyr Peptide verstärkt (Abb. 2.38 A). Offensichtlich werden für die Generierung des MART-1 Epitops aus b-pep70-MART-1 endosomale Proteasen

benötigt, die bei niedrigem pH-Wert aktiv sind. B-pep70-Tyr hingegen wird unter diesen Bedingungen schlechter kreuzpräsentiert. Da die Präsentation der von außen auf MHC-Klasse-I geladenen Nonamer-Peptide MART-1 (27-35) und Tyrosinase (368-376) durch Chloroquin nicht verändert wurde (Abb. 2.38 A), konnten toxische Effekte von Chloroquin ausgeschlossen werden. Die Verstärkung durch rhuHsp70 wurde mit Chloroquin nicht blockiert (Abb. 2.38 B). Aus diesen Ergebnissen lässt sich schließen, dass rhuHsp70 die Kreuzpräsentation von unterschiedlich prozessierten Antigenen unterstützte. Deren Präsentierungseffizienz, nicht aber die Funktion von rhuHsp70, hing von der endosomalen Ansäuerung ab.

Für exogene Antigene wird der Transport ins Zytosol als entscheidende Bedingung für ihre Prozessierung diskutiert. Exogene Antigene können nicht nur von endosomalen Kompartimenten sondern auch von dem ER ins Zytosol gelangen. Ackermann et.al. zeigten, dass lösliche exogene Proteine, die in das ER der DCs gelangen, durch die das ERAD System involvierende Translokation den Zugang ins Zytosol erhalten und dass dieser Weg auch für die Kreuzpräsentation wichtig ist [62]. Eine zentrale Rolle spielt dabei der für die Retrotranslokation aus dem ER genutzte Sec61 Kanal [63]. Unter Annahme der ER-Phagosomenfusion könnte damit auch der Transport der Antigene aus dem Phagosomen erklärt werden. Der Proteintransport über diesen Kanal wird durch das bakterielle Exotoxin A (ExoA) inhibiert [63]. Ob rhuHsp70 speziell den Transport ins Zytosol über diesen Kanal unterstützt, wurde mit diesen Inhibitor untersucht. Dazu wurden die DCs in Anwesenheit mit Exotoxin A mit Peptid allein oder dem rhuHsp70:Peptid Komplex inkubiert. Abbildung 2.39 zeigt, dass durch Exotoxin A die verstärkende Funktion von rhuHsp70 nicht blockiert wurde.

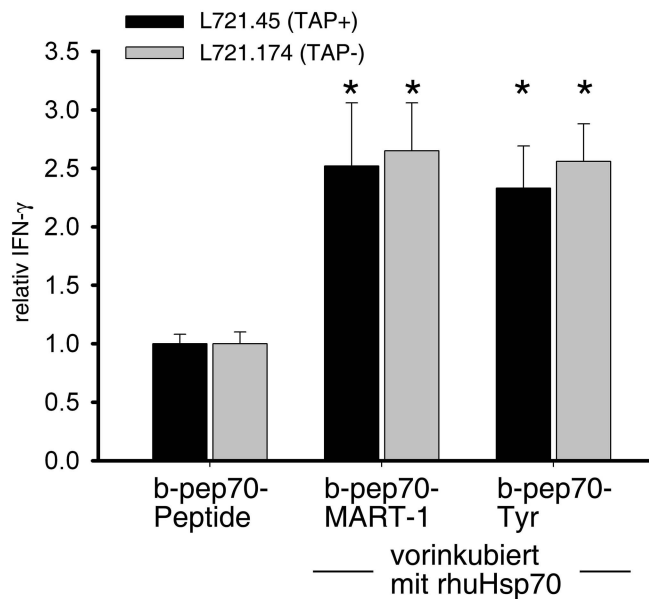
## Ergebnisse



**Abbildung 2.39** Abhängigkeit der rhuHsp70 vermittelten Verstärkung der Präsentation von Exotoxin A. DCs oder L721.45 B-LCL wurden in An- und Abwesenheit von Exotoxin A (10  $\mu$ g/ml) mit b-pep70-MART-1 Peptid (70 nM) allein oder vorinkubiert mit rhuHsp70 (1  $\mu$ M) gepulst. Nach 90 min wurden die A42 T-Zellen zugesetzt. Die relative IFN- $\gamma$  Freisetzung nach 24 h ist dargestellt. Die Probe ohne rhuHsp70 diente als Referenz (=1) und die Proben mit rhuHsp70 wurden als Vielfaches davon dargestellt. Die Balken zeigen den Mittelwert  $\pm$  MWABW aus Triplikaten.

Ein wichtiger Schritt nach dem proteasomalen Abbau der exogenen Antigene im Zytosol ist die Beladung der daraus resultierenden Peptide auf MHC-Klasse-I. Dafür werden die Peptide über die *transporter associated with antigen processing* Proteine (TAP) ins ER geleitet. Ob TAP für die Präsentation der Peptide aus dem Hsp70 Komplex erforderlich ist, ist kontrovers beschrieben [134,178-180]. Um die Abhängigkeit der rhuHsp70 vermittelten Verstärkung von den TAP-Molekülen zu untersuchen, wurden die TAP-positive B-LCL Zelllinie L721.45 und die TAP-negative B-LCL Zelllinie L721.174 verwendet. Die Verstärkung der Kreuzpräsentation des b-pep70-MART-1 Peptid als auch des b-pep70-Tyr Peptid durch rhuHsp70 war in der TAP-positiven und TAP-negativen Zelle gleich (Abb. 2.40). Es konnte somit ausgeschlossen werden, dass die rhuHsp70 Funktion mit TAP assoziiert ist.



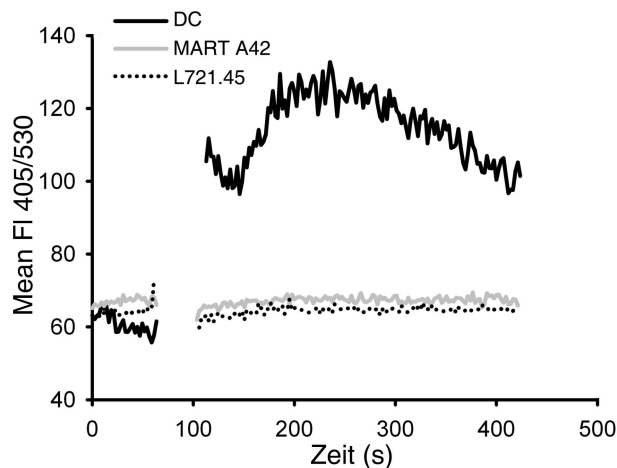


**Abbildung 2.40** Abhängigkeit der rhuHsp70 vermittelten Verstärkung der Präsentation von TAP. TAP-positive L721.45 oder TAP-negative L721.174 wurden mit b-pep70-MART-1 (70 nM) oder b-pep70-Tyr (10  $\mu$ M) oder den rhuHsp70:Peptid Komplexen, die durch Vorinkubation von 0,3  $\mu$ M rhuHsp70 mit 70 nM b-pep70-MART-1 oder 3  $\mu$ M rhuHsp70 und 10  $\mu$ M b-pep70-Tyr gebildet wurden, gepulst. A42 oder TyrF8 T-Zellen wurden zugegeben und die IFN- $\gamma$  Freisetzung nach 24 h gemessen. Die Balken zeigen den Mittelwert von drei unabhängigen Experimenten  $\pm$  MWABW. Die Probe ohne rhuHsp70 diente als Referenz (=1) und die Proben mit rhuHsp70 wurden als Vielfaches davon dargestellt. Die Signifikanz der höheren Freisetzung von IFN- $\gamma$  in den Proben mit dem rhuHsp70:Peptid Komplex im Vergleich zu den Proben mit Peptid allein, wurde mit den Wilcoxon Rank Sum Test ermittelt ( $p < 0,005$ ,  $n=3$ ).

#### 2.5.4. ADP inhibiert die Kreuzpräsentation des b-pep70-MART-1 Peptides

Aufgrund der beschriebenen stabilen rhuHsp70:ADP:Peptid-Form wird für die in vitro Rekonstitution der Komplexe der Einsatz ADP-haltiger Puffer vorgeschlagen [181]. Für alle unter 2.5.1-2.5.3 aufgeführten Versuche wurden allerdings Puffer ohne Zusatz von ADP verwendet.

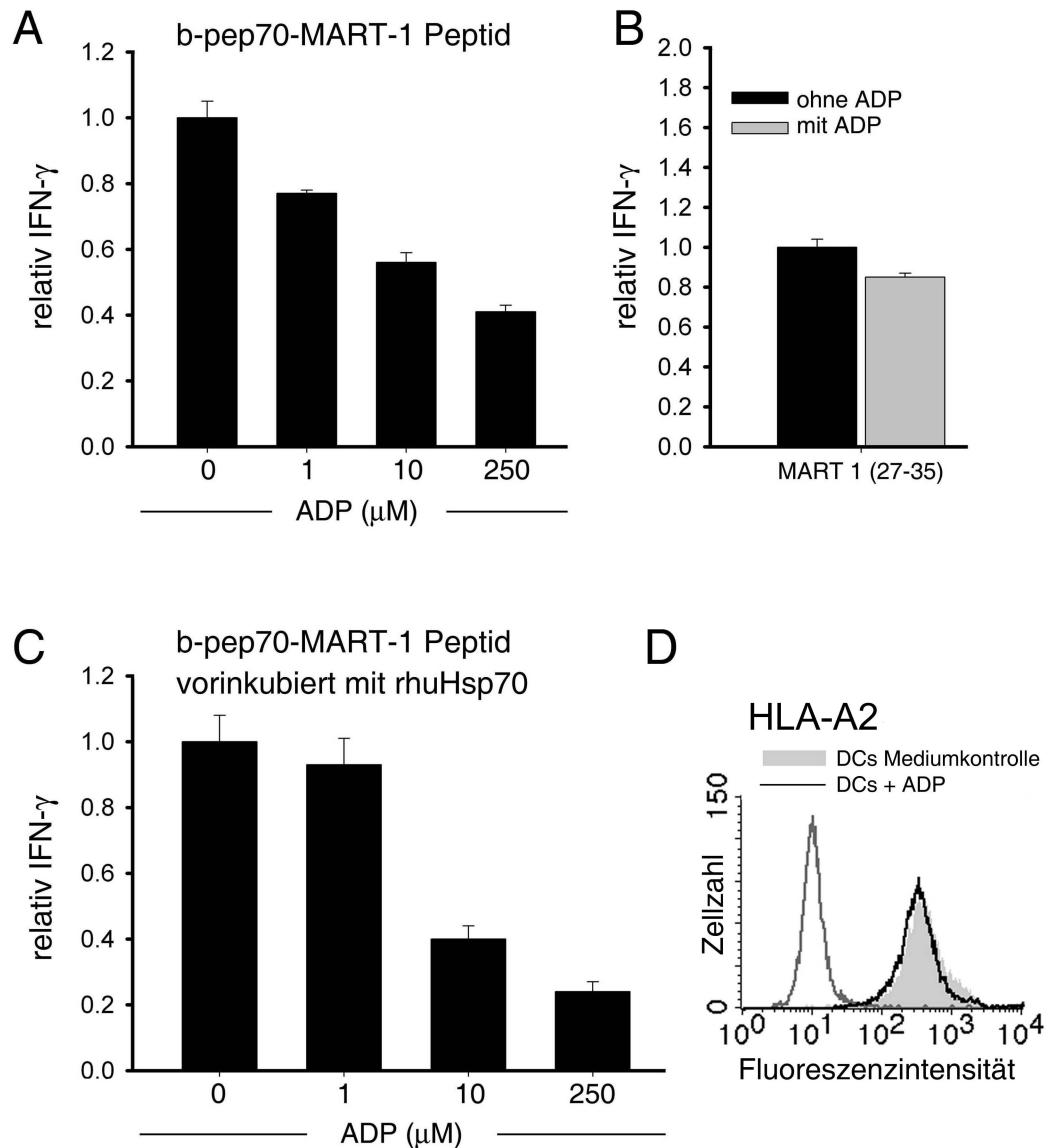
Wie unter 2.16 gezeigt, hatte ADP direkte Signalfunktion auf die DCs. Mit ADP in einer Konzentration von (250  $\mu$ M) konnte in DCs, nicht aber in der B-LCL und T-Zellen ein anhaltender Einstrom von Calciumionen induziert werden (Abb. 2.41). Verglichen mit niedrigeren Konzentrationen (Abb. 2.16) erhielt man bei Stimulation der DCs mit 250  $\mu$ M ADP eine Kurve, die nicht nur einen initialen Peak aufwies, sondern auch ein Plateau zeigte (Abb. 2.41).



**Abbildung 2.41** Intrazellulärer Einstrom von Calciumionen nach der Stimulation von DCs, L721.45 B-LCL oder A42 T-Zellen mit 250  $\mu\text{M}$  ADP. Es ist der Mittelwert der Werte für FI 405/530 dargestellt (=Mean FI 405/530). Die Zellen wurden zunächst 1 min ohne Stimulation gemessen (1. Teil der Kurve). Danach wurden sie stimuliert (2. Teil der Kurve; Unterbrechung =Zugabe von ADP).

Ob ADP einen Einfluss auf die Kreuzpräsentation hat, wurde mit DCs und dem b-pep70-MART-1 Peptid untersucht. Die resultierende T-Zellaktivierung durch DCs, die mit Peptid oder rhuHsp70:Peptid Komplex in Anwesenheit und Abwesenheit von ADP beladen wurden, wurde verglichen.

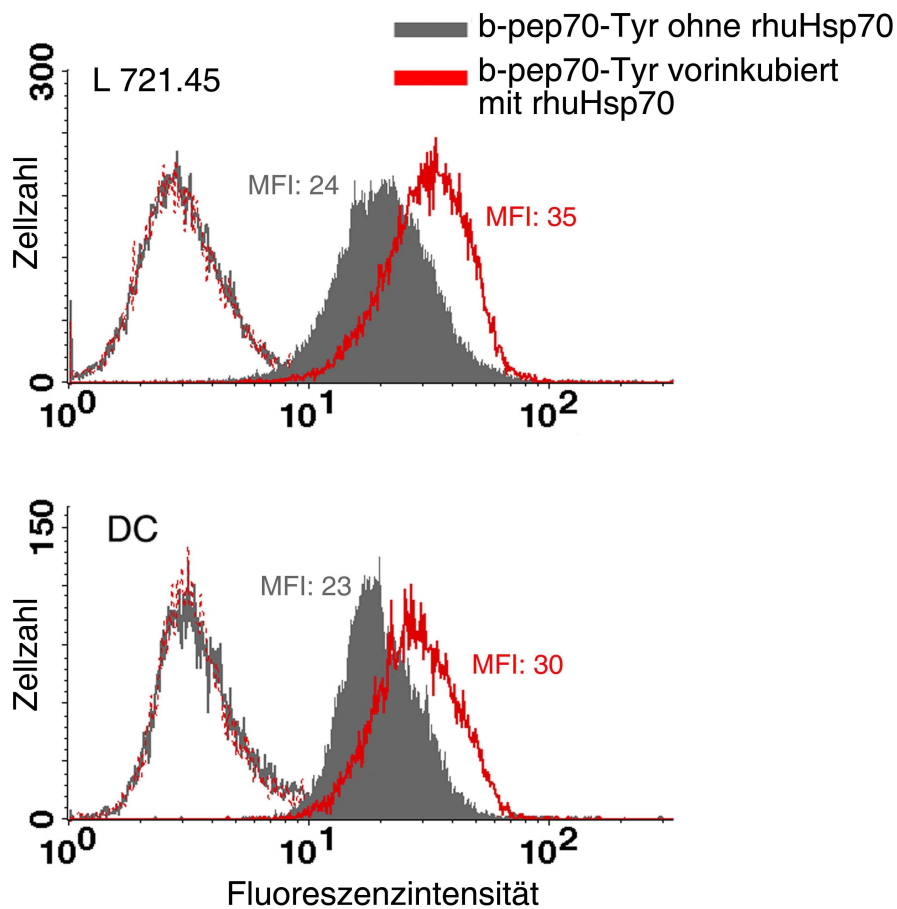
Abbildung 2.42 A zeigt, dass bereits ab einer Konzentration von 1  $\mu\text{M}$  ADP die Kreuzpräsentation des b-pep70-MART-1 Peptides inhibiert wurde. Wurden die DCs mit b-pep70-MART-1 in Anwesenheit von 250  $\mu\text{M}$  ADP beladen, so konnte nur noch 40 % der Antwort ohne ADP gemessen werden. Bei dieser ADP Konzentration wurde die T-Zellaktivierung durch das von außen auf MHC-Klasse-I geladene Nonamer-Peptid MART (27-35) nur marginal verringert (Abb. 2.42 B). Dass die Reduzierung der T-Zellstimulation durch ADP hauptsächlich durch zytotoxische Effekte auf DCs oder T-Zellen verursacht wurde, konnte damit ausgeschlossen werden. Die FACS Analyse ergab, dass nach Stimulation mit 250  $\mu\text{M}$  ADP die Expression der HLA-A2 Moleküle auf der Oberfläche der DCs nicht verringert war (Abb. 2.42 D). In einem weiteren Versuch wurde rhuHsp70 mit dem b-pep70-MART-1 Peptid in Anwesenheit von ADP inkubiert. Danach wurden die DCs zugegeben. ADP verringerte auch in diesem Ansatz bereits in niedrigen Konzentrationen die Kreuzpräsentationsantwort (Abb. 2.42 C). Zusammenfassend zeigen alle diese Experimente, dass ADP bei der Kreuzpräsentation des b-pep70-MART-1 Peptides inhibitorisch wirkte.



**Abbildung 2.42** Abhängigkeit der Präsentation von b-pep70-MART-1 und rhuHsp70:b-pep70-MART-1 von ADP. (A) DCs wurden in Anwesenheit von verschiedenen Konzentrationen ADP mit 70 nM b-pep70-MART-1 Peptid gepulst. 24 h nach Zugabe der A42 T-Zellen wurde die Menge an freigesetztem IFN- $\gamma$  bestimmt. Die IFN- $\gamma$  Menge der Proben mit ADP sind als Vielfaches der Menge der Probe ohne ADP dargestellt. Die Balken zeigen den Mittelwert  $\pm$  MWABW aus Triplikaten. (B) DCs wurden in An- und Abwesenheit von 250  $\mu\text{M}$  ADP mit den nonameren Peptid MART-1 (27-35) gepulst. 24 h nach Zugabe der A42 T-Zellen wurde die Menge an freigesetzten IFN- $\gamma$  bestimmt. Die Darstellung und Auswertung erfolgte wie unter (A) beschrieben. (C) B-pep70-MART-1 (70nM) wurde mit rhuHsp70 (300 nM) in Anwesenheit von verschiedenen Konzentrationen ADP inkubiert. Danach wurden die DCs und T-Zellen zugegeben und wie unter A beschrieben die Menge des freigesetzten IFN- $\gamma$  bestimmt. (D) FACS Analyse der Oberflächenexpression von HLA-A2 (MHC-Klasse-I) auf den DCs nach 24 h Stimulation mit ADP (grau gefülltes Histogramm). Das Histogramm mit der schwarzen Linie ist die Mediumkontrolle und die graue Linie die Isotypkontrolle. Histogrammachsen: x=Fluoreszenzintensität, y=Zellzahl.

## 2.6. Quantifizierung der intrazellulären Menge an Peptidantigen in DCs und B-LCL

Der durch Hsp70 und auch durch andere Chaperone wie gp96 vermittelte Effekt in der Kreuzpräsentation wird in der Literatur hauptsächlich auf eine effiziente Rezeptor vermittelte Aufnahme der gebundenen Antigene in die APCs zurückgeführt [131-133]. Ob mehr Antigen in DCs oder B-LCL vorliegt, wenn es zur Aufnahme an rhuHsp70 gebunden war, wurde mit einer intrazellulären FACS Analyse untersucht.



**Abbildung 2.43** Quantifizierung der intrazellulären Menge an Peptidantigen in DCs und B-LCL. DCs oder Zellen der B-LCL L721.45 wurden zu b-pep70-Tyr ( $10 \mu\text{M}$ ) allein oder b-pep70-Tyr ( $10 \mu\text{M}$ ), das mit rhuHsp70 ( $3 \mu\text{M}$ ) bei RT vorinkubiert wurde, gegeben. Nach 60 min (DCs) oder 120 min (L721.45) wurden die Zellen gewaschen und das oberflächengebundene und intrazelluläre Peptid wurde mit Streptavidin-FITC detektiert und mit dem FACS analysiert. Die Histogramme zeigen Zellen, deren Oberflächenfärbung nach Inkubation mit b-pep70-Tyr Peptid ohne rhuHsp70 (graue Linie) oder mit rhuHsp70:Peptid Komplex (rote gepunktete Linie) erfolgte und Zellen, deren intrazelluläre Färbung nach Inkubation mit b-pep70-Tyr Peptid ohne rhuHsp70 (grau gefüllt) oder mit rhuHsp70:Peptid Komplex (rote Linie) erfolgte. MFI bedeutet die mittlere Fluoreszenzintensität.

Dafür wurden die DCs oder L721.45 zu b-pep70-Tyr allein oder zu b-pep70-Tyr gegeben, das mit rhuHsp70 bei RT vorinkubiert wurde. Aufgenommenes und zelloberflächen-

gebundenes b-pep70-Tyr Peptid wurde über das kovalent gebundenem Biotin mit Streptavidin-FITC detektiert. Zu dem bestimmten Zeitpunkt konnte in den DCs und L721.45 bei den Ansätzen mit dem rhuHsp70:b-pep70-Tyr Peptid Komplex eine deutlich höhere intrazelluläre FITC-Intensität gemessen werden (Abb. 2.43), wie es aus dem Vergleich des Histogramms mit der roten Linie mit dem grau gefüllten Histogramm ersichtlich ist. Daraus konnte geschlossen werden, dass zu diesem Zeitpunkt eine größere Menge b-pep70-Tyr Peptid in den Zellen war, die zu den Peptidkomplex mit rhuHsp70 gegeben worden waren. Obgleich in Anwesenheit von rhuHsp70 mehr Peptid intrazellulär nachgewiesen wurde, war die Oberflächenfärbung in An- und Abwesenheit von rhuHsp70 identisch (Vergleich graue und rot gepunktete Linie Abb. 2.43).

## 2.7. T- Zell Priming mit rhuHsp70:Peptid Komplexen

Als Priming wird die Aktivierung und klonale Vermehrung einer naiven T-Zelle nach dem erstmaligen Kontakt mit dem Antigen auf der Oberfläche der Antigen-präsentierenden Zelle bezeichnet (Effektorzell-Induktionsphase). Dieser Prozess ist von der spezifischen Reaktion der kompetenten zytotoxischen T-Effektorzellen gegen Antigen-präsentierende Zellen zu unterscheiden (Effektorzell-Funktionsphase).

Die Ergebnisse der Versuche unter 2.5 zeigten, dass die eingesetzten APCs besser Antigene präsentieren, wenn zur Aufnahme das Peptid im Komplex mit rhuHsp70 vorlag. Nach der allgemeinen Meinung ist für die Steigerung des Primings von CD8<sup>+</sup> T-Zellen eine verbesserte Präsentation der Antigene allein nicht ausreichend, sondern als weitere Signale sind Costimulation und Zytokine nötig, die durch maturierte DCs bereitgestellt werden können.

Da die Priming-Kapazität stark an die von den DCs bereitgestellten Signale gebunden ist, und diese wiederum durch die innate Stimulation reguliert werden, musste für Versuche, die eine Funktion des rhuHsp70 beim Priming der T-Zellen zeigen sollten, das eingesetzte rhuHsp70 eine hohe Reinheit haben und intensiv von Endotoxinen abgereinigt sein. Da nach Inkubation von DCs mit rhuHsp70 keine Veränderungen im Phänotyp oder Zytokinprofil der DCs beobachtet wurde, war nun die Frage, in wieweit die durch rhuHsp70 vermittelte Steigerung der Kreuzpräsentation auch das Priming Antigen-spezifischer CD8<sup>+</sup> T-Zellen fördert. Für das Priming wurden autologe Monozyten-depletierte PBL mit Peptid oder rhuHsp70:Peptid gepulsten DCs inkubiert. Zunächst wurde wie für die Kreuzpräsentationsversuche rhuHsp70 mit dem b-pep70-MART-1 Peptid vorinkubiert, um den Komplex zu bilden. Danach wurden die DCs zu dem rhuHsp:Peptid Komplex oder dem Peptid ohne rhuHsp70 gegeben. Nach 1 h wurden die Monozyten depletierten PBL (gleicher Spender) zugesetzt. Die PBL wurden nach sieben Tagen erneut mit neu generierten und gepulsten DCs stimuliert. Nach der insgesamt 14-tägigen Stimulation wurde mittels Elispot untersucht, ob und wieviele Antigen-spezifischen T-Zellen induziert wurden. Mit der FACS Analyse wurden die Zusammensetzung der aktivierten Zellpopulationen analysiert. Diese Versuche wurden viermal mit Blut von verschiedenen Spendern durchgeführt (Priming Versuche 1-4 (P1-P4)). Die Ansätze in P 1-3 erfolgten in DC-Medium mit IL-4 und GM-CSF. Für den P4 Versuch wurde Medium ohne IL-4 und GM-CSF verwendet.

### **2.7.1. Quantifizierung der IFN- $\gamma$ sezernierenden Zellen nach dem Priming mittels Elispot**

Jeder Priming Versuch (P1-P4) bestand aus mehreren Ansätzen, in denen die DCs mit b-pep70-MART-1 unter unterschiedlichen Bedingungen beladen wurden. Zum einem wurden die DCs mit dem b-pep70-MART-1 Peptid allein gepulst (Ansatz 1). In einem anderen Ansatz wurden die DCs mit der gleichen Menge b-pep70-MART-1 Peptid, das mit rhuHsp70 vorinkubiert wurde, gepulst (Ansatz 2). In einem weiteren Ansatz wurden die DCs mit dem Peptid in Anwesenheit von LPS gepulst (Ansatz 3). Zu allen Ansätzen wurden die Monozyten depletierten PBL direkt dazu gegeben. Außerdem wurden für das Priming DCs eingesetzt, die 24 h mit Peptid oder dem rhuHsp70:Peptid Komplex gepulst wurden und vor Zugabe der Monozyten depletierten PBL gewaschen worden waren (w1 und w2).

Die aus den Priming Ansätzen gewonnenen Zellen wurden mit den Mel 93.04A12 Tumorzellen, die den HLA-A2 MART-1 Liganden auf ihrer Oberfläche präsentieren, inkubiert. Um die Antigen-spezifität der geprimten T-Zellpopulation zu beurteilen, wurden die geprimten Zellen auch mit einer MART-1 negativen HLA-A2 positiven Melanomzelllinie (A375) angesetzt. Das durch die T-Zellen freigesetzte IFN- $\gamma$  wurde direkt an die in der Kulturplatte enthaltene Membran, die mit anti-IFN- $\gamma$  beschichtet war, gebunden (Elispot). Nach 24 h Inkubation wurden die Zellen entfernt und die Anzahl der Zytokin-spots durch Zusatz von HRP-gekoppelten Antikörper und Substrat detektiert. IFN- $\gamma$  kann von zytotoxischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen, CD4<sup>+</sup> T<sub>H</sub>1 Zellen und NK-Zellen ausgeschüttet werden. CD8<sup>+</sup> T-Zellen werden durch MHC-Klasse-I gebundene Antigene aktiviert, T<sub>H</sub>1 Zellen erkennen Antigen-MHC-Klasse-II Komplexe. Da die eingesetzten Tumorzellen Mel 93.04A12 MHC-Klasse-II negativ sind, können nur MHC-Klasse-I restringierte Zellen zur Sekretion von IFN- $\gamma$  aktiviert werden. Entstehen auch IFN- $\gamma$  Spots im Ansatz mit Melanomzellen, die das MART-1 Epitop nicht tragen, so sind in der geprimten Zellpopulation T-Zellen enthalten, die unabhängig von der Anwesenheit von MART-1 reagieren. Möglicherweise könnten diese Spots auch durch NK-Zellen induziert werden. Da diese Zellen auch in den Ansätzen mit den MART-1 positiven Tumorzellen reaktiv sein können, kann für diese geprimte Zellpopulation mit dem Elispot keine quantitative Aussage bezüglich der Zahl der MART-1 Antigen-spezifischen T-Zellen gemacht werden.

## Ergebnisse

---

Folgende Ansätze aus den Priming Versuchen wurden mittels Elispot untersucht:

1=DCs + 70 nM b-pep70-MART-1

2=DCs + rhuHsp70:b-pep70-MART-1\*

3=DCs + 70 nM b-pep70-MART-1 + LPS (1 µg/ml)

w1=DCs + 70 nM b-pep70-MART-1; 24 h vorinkubiert, anschließend gewaschen

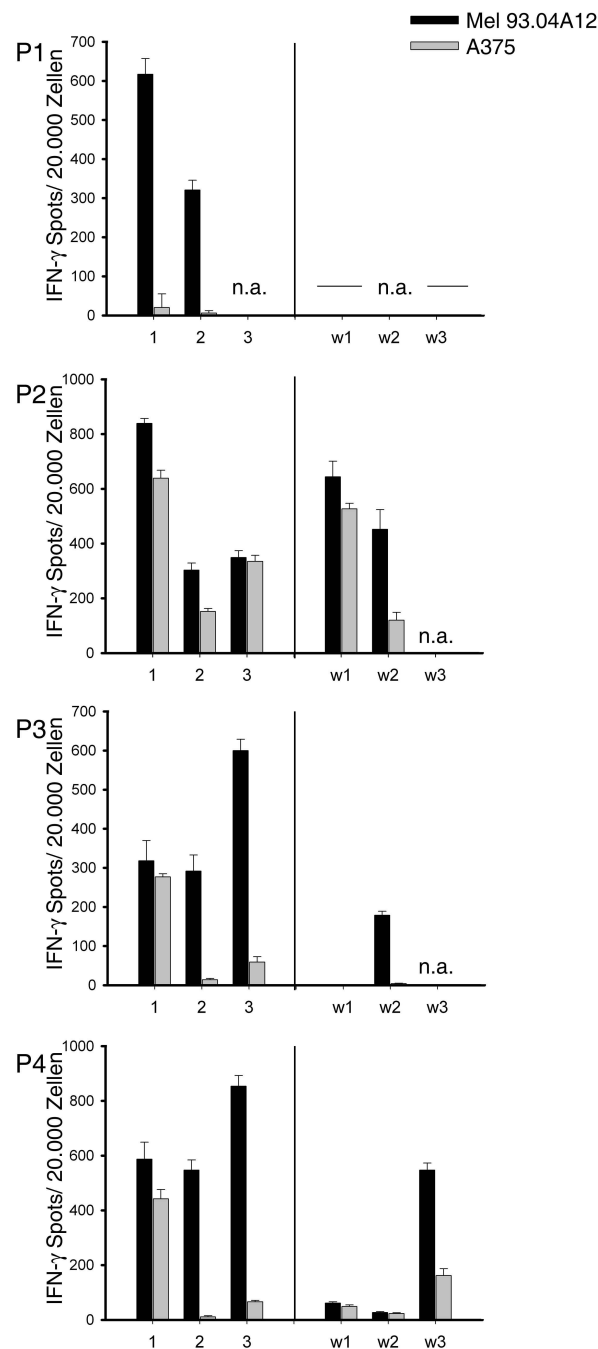
w2=DCs + rhuHsp70:b-pep70-MART-1\*; 24h vorinkubiert, anschließend gewaschen

w3=DCs + b-pep70-MART-1 +LPS (1 µg/ml); 24 h vorinkubiert, anschließend gewaschen

\*Für den rhuHsp70:Peptid Komplex wurden 70 nM b-pep70-MART-1 mit 1 µM rhuHp70 bei RT für mindestens 2 h vorinkubiert.



## Ergebnisse



**Abbildung 2.44** IFN- $\gamma$  sezernierende Zellen nach dem Priming. DCs wurden mit 70 nM b-pep70-MART-1 Peptid allein (1) oder vorinkubiert mit 1  $\mu$ M rhuHsp70 (2) oder 70 nM b-pep70-MART-1 Peptid in Anwesenheit von LPS (1  $\mu$ g/ml) (3) gepulst. Nach 1 h wurden die autologen Monozyten depletierten PBL zugesetzt. Für die mit w gekennzeichneten Ansätze wurden die DCs 24 h gepulst und vor Zugabe der PBL gewaschen. Nach 7 Tagen wurde die Stimulation der PBL mit neuen gepulsten DCs wiederholt. Nach weiteren 7 Tagen wurden die geprimten Zellen gewaschen. 20.000 geprimte Zellen wurden zusammen mit 10.000 Mel 93.04A12 oder 10.000 A375 für 24 h inkubiert. Es sind die IFN- $\gamma$  Spots bezogen auf 20.000 geprimte Zellen aus den verschiedenen Ansätze der Versuche P1-P4 dargestellt. P1-P4 sind verschiedene Spender, mit deren DCs und PBL das Priming durchgeführt wurde. Die Balken zeigen den Mittelwert aus Triplikaten  $\pm$  MWABW. n.a.: nicht angesetzt

Im folgenden sind die Ergebnisse des Primings für die Zellen der vier verschiedenen Spender P1-P4 einzeln dargestellt.

Die Ergebnisse des ersten **Versuches P1** zeigen, dass mit Mel 93.04A12 (MART-1 positiv) rund 600 IFN- $\gamma$  Spots pro 20.000 geprimter Zellen erhalten wurden, wenn mit b-pep70-MART-1 Peptid gepulsten DCs geprimt worden war (Abb. 2.44). Halb so viele IFN- $\gamma$  Spots wurden im Primingansatz mit den rhuHsp70:Peptid Komplex gepulsten DCs erhalten. Nur sehr wenige T-Zellen reagierten mit den MART-1 negativen A375 Zellen.

Für den **P2 Versuch** wurden in einer zusätzlichen Probe die DCs mit dem b-pep70-MART-1 Peptid gepulst und mit LPS stimuliert. Außerdem wurden mit DCs geprimt, die 24 h mit den Peptid oder dem rhuHsp70:Peptid Komplex gepulst und vor dem Einsatz gewaschen wurden. Auch in diesem Versuch zeigte die mit Peptid gepulsten DCs geprimte T-Zellpopulation (Ansatz 1) die meisten Spots (Abb. 2.44). Über 50 % weniger Spots wurden im Ansatz 2 mit rhuHsp:Peptid gepulsten DCs erhalten. Anders als in Versuch P1 reagierten in P2 viele Zellen auch mit den MART-1 negativen A375 Zellen (Ansatz 1). Wurden zum Priming rhuHsp70:Peptid gepulste DCs eingesetzt (Ansatz 2), so enthielt die geprimte Zellpopulation zwar insgesamt weniger IFN- $\gamma$  sezernierende T-Zellen, die mit Mel 93.04A12 reagierten (rund 300 Spots), aber die Spezifität war besser als im Primingansatz 1. Es waren im Ansatz 2 mit 150 Spots weniger A375 reaktive Zellen enthalten als im Ansatz 1 mit 640 Spots.

Wurden für das Priming Peptid gepulste und LPS stimulierte DCs verwendet (Ansatz 3), so enthielt die geprimte Zellpopulation eine vergleichbare Anzahl an Mel 93.04A12 reaktiven Zellen wie bei dem Ansatz 2. Allerdings waren ebenso viele MART-1 unabhängig reaktive Zellen enthalten.

Wurden die gepulsten DCs vor dem Einsatz im Priming gewaschen, enthielt die geprimte Zellpopulation im Ansatz w1 geringfügig weniger MART-1 reaktive Zellen wie in Ansatz 1 mit den nicht gewaschenen gepulsten DCs. In Ansatz w2 waren gegenüber Ansatz 2 mehr Zellen enthalten, die MART-1 abhängig IFN- $\gamma$  sezernierten. Auch die Spezifität der Zellpopulationen war vergleichbar. Die Zellen aus den Ansätzen 1 und w1 reagierten auch mit den MART-1 negativen A375 während der Anteil dieser Zellen in den Ansätzen 2 und w2 deutlich geringer war.

Die Ergebnisse der **Versuche P3** und **P4** waren vergleichbar (Abb. 2.44). Die gesamte Anzahl an IFN- $\gamma$  Spots war zwar in den jeweiligen Ansätzen in P4 größer, aber das Verhältnis zwischen den Spots in den einzelnen Ansätzen war ähnlich. Zellen, die mit Peptid gepulsten DCs geprimt worden waren (Ansatz 1), zeigten Reaktionen sowohl mit

Mel 93.04A12 als auch A375. Im Gegensatz dazu reagierten die mit rhuHsp70:Peptid gepulsten DCs geprimten Zellen (Ansatz 2) überwiegend nur mit den MART-1 positiven Tumorzellen und nicht mit den MART-1 negativen A375.

Die meisten Antigen-spezifischen T-Zellen wurden beim Ansatz mit Peptid gepulsten und LPS stimulierten DCs erhalten (Ansatz 3 in P3 und P4 Abb. 2.44). Auch hier war die Spezifität hoch. Es waren nur sehr wenige Zellen enthalten, die auch mit den MART-1 negativen A375 reagierten.

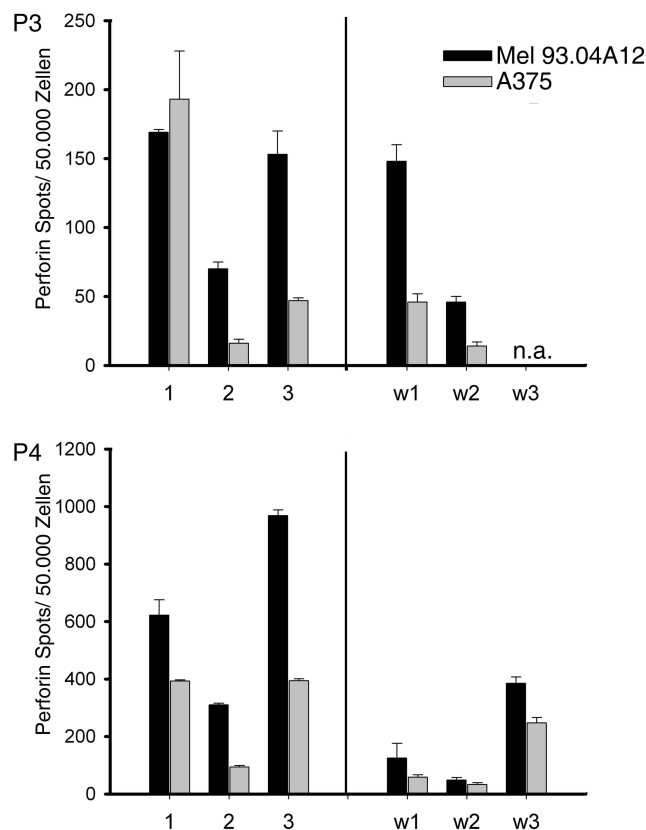
Wurden gewaschene gepulste DCs für das Priming eingesetzt, so war der Anteil der reaktiven Zellen gering in Versuch P3 und P4. Ein größerer Anteil an IFN- $\gamma$  sezernierenden Zellen wurde beim Priming mit Peptid gepulsten und LPS stimulierten DCs (Ansatz w3) erhalten, die vor Zugabe zu den PBL gewaschen wurden. In diesem Ansatz konnte LPS nicht direkt auf die zu primenden Zellen einwirken.

Zusammenfassend zeigen alle Versuche, dass mit Peptid gepulsten bzw. rhuHsp70:Peptid gepulsten DCs, die keinen weiteren Maturierungsstimulus erhielten, Melanom-reaktive T-Zellen geprimt werden konnten. Die mit rhuHsp70:Peptid Komplex gepulsten DCs geprimten Zellen (Ansatz 2) enthielten, im Vergleich zu den mit Peptid gepulsten DCs geprimten Zellen (Ansatz 1), überwiegend Antigen-spezifisch IFN- $\gamma$  sezernierende Zellen. Die Zahl der IFN- $\gamma$  sezernierenden Zellen war in Ansatz 2 geringer oder gleich wie in Ansatz 1, aber nie höher. Wurden Peptid gepulste und LPS stimulierte DCs eingesetzt, war die Anzahl der MART-1 spezifischen IFN- $\gamma$  sezernierenden Zellen nach dem Priming in zwei von drei Versuchen größer als bei den Ansätzen 1 und 2.

Die Unterschiede zwischen den verschiedenen Primingansätzen P1-P4 können darauf beruhen, dass das Priming mit Zellen von verschiedenen Spendern durchgeführt wurde.

### 2.7.2. Quantifizierung der Perforin sezernierenden Zellen nach dem Priming mittels Elispot

Für P3 und P4 wurde mittels Elispot auch bestimmt, wie viele der geprimten Zellen mit einer Perforinausschüttung reagierten (Abb. 2.45). Wie bei dem IFN- $\gamma$  Elispot wurde die Reaktion der geprimten Zellen gegen die MART-1 positive Mel 93.94A12 und die MART-1 negative A375 Melamonzelle untersucht.



**Abbildung 2.45** Perforin sezernierende Zellen nach dem Priming. DCs wurden mit 70 nM b-pep70-MART-1 Peptid allein (1) oder vorinkubiert mit 1  $\mu$ M rhuHsp70 (2) oder 70 nM b-pep70-MART-1 Peptid in Anwesenheit von LPS (1  $\mu$ g/ml) (3) gepulst. Nach 1 h wurden die autologen Monozyten depletierten PBL zugesetzt. Für die mit w gekennzeichneten Ansätze wurden die DCs 24 h gepulst und vor Zugabe der PBL gewaschen. Nach 7 Tagen wurde die Stimulation der PBL mit neuen gepulsten DCs wiederholt. Nach weiteren 7 Tagen wurden die Zellen gewaschen. 50.000 geprimte Zellen wurden zusammen mit 10.000 Mel 93.04A12 oder 10.000 A375 für 24 h inkubiert. Es sind die Perforin Spots bezogen auf je 50.000 geprimte Zellen aus den verschiedenen Ansätzen der Versuche P3 und P4 (Spender 3 und Spender 4) dargestellt. Die Balken zeigen den Mittelwert aus Triplikaten  $\pm$  MWABW. n.a.: nicht angesetzt

Die mit Peptid gepulsten DCs geprimte Zellpopulation (Ansatz 1) zeigte eine vergleichbare Anzahl an Spots gegen Mel 93.94A12 und A375. Somit kann die Anzahl Antigen-spezifisch reagierender T-Zellen ebenso wie bei dem IFN- $\gamma$  Elispot nicht quantifiziert

werden.

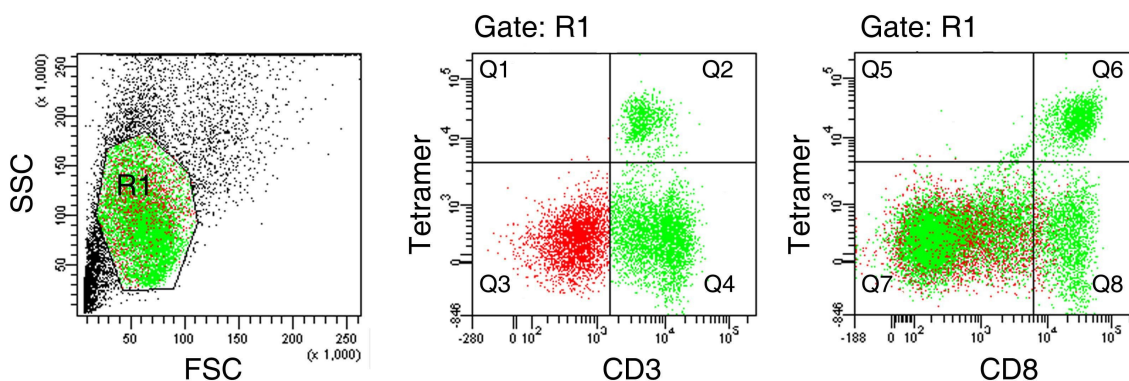
Die Anzahl der reagierenden Zellen war bei der mit rhuHsp70:Peptid gepulsten DCs geprimten Zellpopulation (Ansatz 2) zwar geringer, aber der Anteil an Antigen-unspezifisch reagierenden Zellen war hier viel kleiner als im Ansatz mit den Peptid gepulsten DCs (Ansatz 1).

Die mit Peptid und LPS geprimte T-Zellpopulation enthielt die höchste Zahl reaktiver Zellen und die Anzahl der auf A375 Antigen-unabhängig reagierenden Zellen war geringer als die Gesamtzahl der auf Mel 93.94A12 reagierenden Zellen. Somit waren eindeutig Antigen-reaktive Perforin sezernierende Zellen geprimt worden.

Die Anzahl der Perforin sezernierenden Zellen in den mit gewaschenen DCs geprimten Zellpopulationen (Ansätze w1 und w2) war geringer als in den entsprechenden Ansätzen, bei denen die DCs nicht gewaschen worden waren (Ansätze 1 und 2). Auffällig war, dass die Spezifität der reaktiven Zellen in Versuch P3 bei der mit Peptid gepulsten und gewaschenen DCs geprimten Zellpopulation (w1) größer war als bei der Zellpopulation, die direkt mit Peptid gepulsten DCs ohne Waschschrift(1) geprimt worden war. Dieses Ergebnis konnte in Versuch P4 nicht wiederholt werden. Der Waschschrift brachte somit keine konsistente Erhöhung der Anzahl der MART-1 spezifischen Perforin sezernierenden Zellen.

### **2.7.3. Quantifizierung der MART-1 spezifischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen mittels Tetramer Färbung**

Die Elispot Ergebnisse zeigten eine MART-1 unabhängige Reaktion der mit Peptid gepulsten DCs geprimten Zellpopulation, die eine Quantifizierung der Antigen-reaktiven T-Zellen unmöglich machte. Deshalb wurde versucht die Anzahl der MART-1 spezifischen T-Zellen mit einer HLA-A0201:Melan A/MART-1 (p27-35) Tetramer Färbung zu bestimmen. Dazu wurde die geprimten Zellen mit einer Kombination von anti-CD3 und anti-CD8 Antikörpern und HLA-A0201:Melan A/MART-1 p27-35 mod/H<sub>2</sub>m Tetramer gefärbt. Abbildung 2.46 zeigt, welche Zellpopulation im FSC/SSC Dot Plot ausgewählt wurde (R1). Die Tetramer positiven T-Zellen wurden gegen CD8<sup>+</sup>T-Zellen dargestellt und der prozentuale Anteil an Tetramer<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T-Zellen (Q6) innerhalb aller geprimten Zellen oder innerhalb der CD8<sup>+</sup> T-Zellpopulation (Q6+Q8=100 %) (Tab. 2.1) wurde bestimmt.



**Abbildung 2.46** Bestimmung der Tetramer<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T-Zellen nach dem Priming. Es sind die Dot Plots der geprimten Zellen aus Ansatz 3 Versuch P3 dargestellt. Hierfür wurden Monozyten depletierte PBL mit Peptid gepulsten LPS stimulierten DCs inkubiert. Nach 2 Stimulationsrunden von je 7 Tagen wurden alle Zellen geerntet, mit Antikörper gegen CD3, CD8 und dem HLA-A0201:MelanA/MART-1 (p27-35) mod. Tetramer gefärbt und mittels FACS (LSR II) analysiert. Rot sind alle Zellen in R1 und grün sind alle CD3<sup>+</sup> Zellen (Q2+Q4). Bei der Darstellung ist Grün in Front.

Tabelle 2.1 zeigt, dass die meisten Tetramer<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> Zellen im Primingansatz mit Peptid gepulsten und LPS stimulierten DCs ( Ansatz 3) enthalten waren.

	% Tet <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup> (von Gesamtzellen)		% Tet <sup>+</sup> (von CD8 <sup>+</sup> Zellen)	
	Versuch P3	Versuch P4	Versuch P3	Versuch P4
Ansatz 1 <sup>#</sup>	10,9	2	49,8	19,3
Ansatz 2 <sup>#</sup>	5,2	3,1	36,7	37,5
Ansatz 3 <sup>#</sup>	18,9	9,1	58,1	40,6

<sup>#</sup>1=DC + 70 nM b-pep70-MART-1

<sup>#</sup>2=DC + rhuHsp70:b-pep70-MART-1\*

<sup>#</sup>3=DC + 70 nM b-pep70-MART-1 + LPS (1 µg/ml)

\*Für den rhuHsp70:Peptid Komplex wurden 70 nM b-pep70-MART-1 mit 1 µM rhuHp70 bei RT vorinkubiert.

Im Vergleich dazu waren in den Ansätzen mit Peptid gepulsten DCs (1) und rhuHsp70:Peptid gepulsten DCs (2) weniger Tetramer<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T-Zellen enthalten. Dabei war der Anteil an Tetramer<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> Zellen in der mit rhuHsp70:Peptid gepulsten DCs geprimte Zellpopulation geringer (P3) oder etwa gleich (P4) wie in der mit Peptid gepulsten DCs geprimten Zellpopulation.

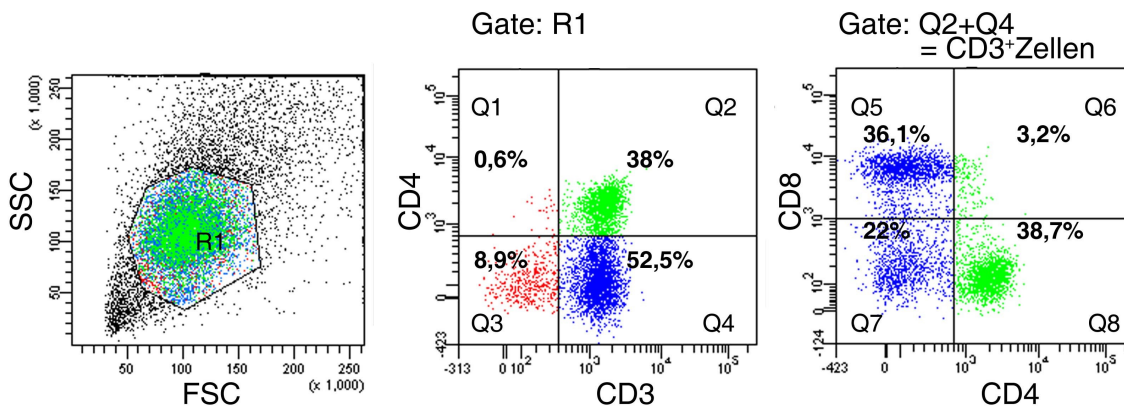
Innerhalb der CD8<sup>+</sup> Population war der Anteil der Tetramer<sup>+</sup> Zellen beim Priming mit rhuHsp70:Peptid gepulsten DCs (2) in Versuch P3 geringer und in Versuch P4 größer als beim Priming mit Peptid gepulsten DCs (1) (Tab. 2.1). Der Anteil der Tetramer<sup>+</sup> Zellen innerhalb der CD8<sup>+</sup> Zellen war bei dem Primingansatz mit Peptid gepulsten und LPS

stimulierten DCs (3) in beiden Versuchen größer als bei dem Ansatz mit Peptid gepulsten DCs (1). Durch den Einsatz von rhuHsp70 konnte demnach der Anteil an Tetramer<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> Zellen an allen Zellen im Priming nicht wesentlich gesteigert werden.

## 2.7.4. Zusammensetzung der geprimten Zellpopulation

### 2.7.4.1. Prozentualer Anteil der CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T-Zellen nach dem Priming

Nach dem 14-tägigen Priming wurden alle Zellen aus den jeweiligen Ansätzen mit Antikörpern gegen CD3, CD8, CD4, CD25 und FOXP3 gefärbt und im FACS analysiert. Abbildung 2.47 zeigt, wie die Regionen festgesetzt wurden, um den Anteil an CD8<sup>+</sup> T-Zellen an allen CD3<sup>+</sup> T-Zellen zu bestimmen. Zunächst wurden nach Auswahl der Population im FSC/SSC Dot Plot alle CD3<sup>+</sup> T-Zellen bestimmt (Q2 + Q4 in Abb. 2.47).



**Abbildung 2.47** Bestimmung des prozentualen Anteils an CD8<sup>+</sup> T-Zellen und CD4<sup>+</sup> T-Zellen in der CD3<sup>+</sup> T-Zellpopulation nach dem Priming. Als Beispiel sind die geprimten Zellen aus Ansatz 1 Versuch P2 dargestellt. Hierfür wurden Monozyten depletierte PBL mit Peptid gepulsten DCs inkubiert. Nach zwei Stimulationsrunden von je 7 Tagen wurden alle Zellen geerntet, mit Antikörper gegen CD3, CD4 und CD8 gefärbt und mittels FACS (LSR II) analysiert. Rot sind alle Zellen in R1 und blau sind alle CD3<sup>+</sup> Zellen (Q2+Q4). Grün sind alle CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> Zellen (Q2). Bei der Darstellung ist die Reihenfolge vom Vordergrund ausgehend: grün, blau, rot.

Tabelle 2.2 zeigt, dass der Anteil der CD3<sup>+</sup> T-Zellen an allen geprimten Zellen in allen Ansätzen etwa gleich groß war. Dieses Ergebnis war identisch in den Versuchen P1, P2 und P3. Größere Unterschiede waren zwischen den Ansätzen in Versuch P4. Die mit rhuHsp70:Peptid Komplex gepulsten DCs geprimten Zellen enthielten in P4 mit rund 90 % deutlich mehr CD3<sup>+</sup> T-Zellen als die geprimten Zellen aus Ansatz 1 und 3, deren Anteil an CD3<sup>+</sup> T-Zellen 58 % (1) und 49 % (2) betrug. In den Ansätzen 1 und 3 waren, wie später noch gezeigt wird, im Vergleich zu Ansatz 2 mehr CD3<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> Zellen enthalten.

Die Ansätze mit den gewaschenen DCs waren vergleichbar mit den jeweiligen Ansätzen,

in welchen die DCs nicht gewaschen worden waren. Eine Ausnahme war hier ebenfalls Versuch P4.

Tabelle 2.2	% CD3 <sup>+</sup> T-Zellen (von Gesamtzellen)			
	Versuch P1	Versuch P2	Versuch P3	Versuch P4
Ansatz 1 <sup>#</sup>	77	90	79	58
Ansatz 2 <sup>#</sup>	90	91	76	91
Ansatz 3 <sup>#</sup>	n.a.	92	86	49
Ansatz w1 <sup>#</sup>	n.a.	91	68	81
Ansatz w2 <sup>#</sup>	n.a.	92	86	86
Ansatz 4 <sup>#</sup>	n.a.	n.a.	75	57
PBL <sup>#</sup>	n.a.	71	79	57

<sup>#</sup> 1=DC + 70 nM b-pep70-MART-1

2=DC + rhuHsp70:b-pep70-MART-1\*

3=DC + 70 nM b-pep70-MART-1 + LPS (1 µg/ml)

w1=DC + 70 nM b-pep70-MART-1; 24 h vorinkubiert, anschließend gewaschen

w2=DC + rhuHsp70:b-pep70-MART-1\*; 24h vorinkubiert, anschließend gewaschen

4= ohne DC + 1 µM rhuHsp70

PBL: Monozyten depletierte PBL, Ausgangszellen für das Priming

\*Für den rhuHsp70:Peptid Komplex wurden 70 nM b-pep70-MART-1 mit 1 µM rhuHp70 bei RT vorinkubiert.

n.a.: nicht angesetzt

Ausgehend von den in Abbildung 2.47 dargestellten auf die CD3<sup>+</sup> Zellen gegateten CD4/CD8 Dot Plot wurde der prozentuale Anteil an CD8<sup>+</sup> T-Zellen bestimmt (Q5=CD8<sup>+</sup> CD3<sup>+</sup> T-Zellen). In dem CD4/CD8 Dot Plot ist zu sehen, dass ein kleiner Teil der CD3<sup>+</sup> Zellen CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> war. Dieser Anteil war in allen Ansätzen mit ca. 3 % oder weniger sehr gering. Wie in Abbildung 2.47 (Q7) zu sehen, wurden nach dem Priming auch CD3<sup>+</sup>CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup> Zellen erhalten. Diese Zellen wurden nicht weiter untersucht. Der Anteil an diesen Zellen war in der Regel bei den Ansätzen 1 und 2 und w1 und w2 gleich groß.

In Tabelle 2.3 ist der prozentuale Anteil an CD8<sup>+</sup> T-Zellen innerhalb der CD3<sup>+</sup> T-Zellpopulation dargestellt. Der Anteil an CD8<sup>+</sup> T-Zellen innerhalb der CD3<sup>+</sup> T-Zellpopulation war in den Ansätzen mit den rhuHsp70:Peptid gepulsten DCs geringer, als in denen mit den Peptid gepulsten oder Peptid gepulsten und LPS stimulierten DCs. Dieses Ergebnis



## Ergebnisse

wurde auch mit den gewaschenen DCs erhalten. Die mit dem Einsatz von rhuHsp70 verbundene Abnahme konnte demnach nicht durch direkte Interaktionen von rhuHsp70 mit den Monozyten depletierten PBL verursacht worden sein. Diese Annahme bestätigte sich auch in Ansatz 4. Durch Inkubation der PBL mit rhuHsp70 ohne DCs (Ansatz 4) entstanden in etwa genau so viele CD3<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T-Zellen wie in dem Ansatz mit Peptid gepulsten DCs ohne rhuHsp70 (Tab. 2.3 Vergleich von Ansatz 1 und 4 in P3 und P4).

Wurden DCs eingesetzt, die nach dem Pulsen gewaschen wurden, so war in der Regel der Anteil der CD8<sup>+</sup> T-Zellen geringer als in dem korrespondierenden Ansatz mit den nicht gewaschenen DCs. Eine Ausnahme hierbei waren die Ansätze 1 und w1 im Primingversuch P3.

Tabelle 2.3	% CD8 <sup>+</sup> T-Zellen (von CD3 <sup>+</sup> Zellen)			
	Versuch P1	Versuch P2	Versuch P3	Versuch P4
Ansatz 1 <sup>#</sup>	24	36	36	16
Ansatz 2 <sup>#</sup>	9	12	23	8
Ansatz 3 <sup>#</sup>	n.a.	29	45	54
Ansatz w1 <sup>#</sup>	n.a.	21	40	8
Ansatz w2 <sup>#</sup>	n.a.	10	10	5
Ansatz 4 <sup>#</sup>	n.a.	n.a.	39	14
PBL <sup>#</sup>	n.a.	29	28	21

<sup>#</sup> 1=DC + 70 nM b-pep70-MART-1

2=DC + rhuHsp70:b-pep70-MART-1\*

3=DC + 70 nM b-pep70-MART-1 + LPS (1 µg/ml)

w1=DC + 70 nM b-pep70-MART-1; 24 h vorinkubiert, anschließend gewaschen

w2=DC + rhuHsp70:b-pep70-MART-1\*; 24h vorinkubiert, anschließend gewaschen

4= ohne DC + 1 µM rhuHsp70

PBL: Monozyten depletierte PBL, Ausgangszellen für das Priming

\*Für den rhuHsp70:Peptid Komplex wurden 70 nM b-pep70-MART-1 mit 1 µM rhuHp70 bei RT vorinkubiert.

n.a.: nicht angesetzt

### 2.7.4.2. Prozentualer Anteil der CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> Zellpopulationen nach dem Priming

Die CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T-Zellpopulation wurde mittels FACS bestimmt (Q2 in Abbildung 2.47). Die Ergebnisse sind in Tabelle 2.4 dargestellt.

Tabelle 2.4	% CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> T-Zellen (von Gesamtzellen)			
	Versuch P1	Versuch P2	Versuch P3	Versuch P4
Ansatz 1 <sup>#</sup>	52	38	47	44
Ansatz 2 <sup>#</sup>	77	63	53	77
Ansatz 3 <sup>#</sup>	n.a.	51	45	17
Ansatz w1 <sup>#</sup>	n.a.	49	38	69
Ansatz w2 <sup>#</sup>	n.a.	45	72	78
Ansatz 4 <sup>#</sup>	n.a.	n.a.	30	43
PBL <sup>#</sup>	n.a.	37	53	37

<sup>#</sup> 1=DC + 70 nM b-pep70-MART-1

2=DC + rhuHsp70:b-pep70-MART-1\*

3=DC + 70 nM b-pep70-MART-1 + LPS (1 µg/ml)

w1=DC + 70 nM b-pep70-MART-1; 24 h vorinkubiert, anschließend gewaschen

w2=DC + rhuHsp70:b-pep70-MART-1\*; 24h vorinkubiert, anschließend gewaschen

4= ohne DC + 1 µM rhuHsp70

PBL: Monozyten depletierte PBL, Ausgangszellen für das Priming

\*Für den rhuHsp70:Peptid Komplex wurden 70 nM b-pep70-MART-1 mit 1 µM rhuHp70 bei RT vorinkubiert.

n.a.: nicht angesetzt

Der prozentuale Anteil der CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T-Zellen innerhalb der gesamten Zellen war bei mit Peptid gepulsten DCs geprimten Zellen (1) ungefähr so hoch wie bei den Monozyten-depletierten PBL, die als Ausgangszellen für das Priming verwendet wurden.

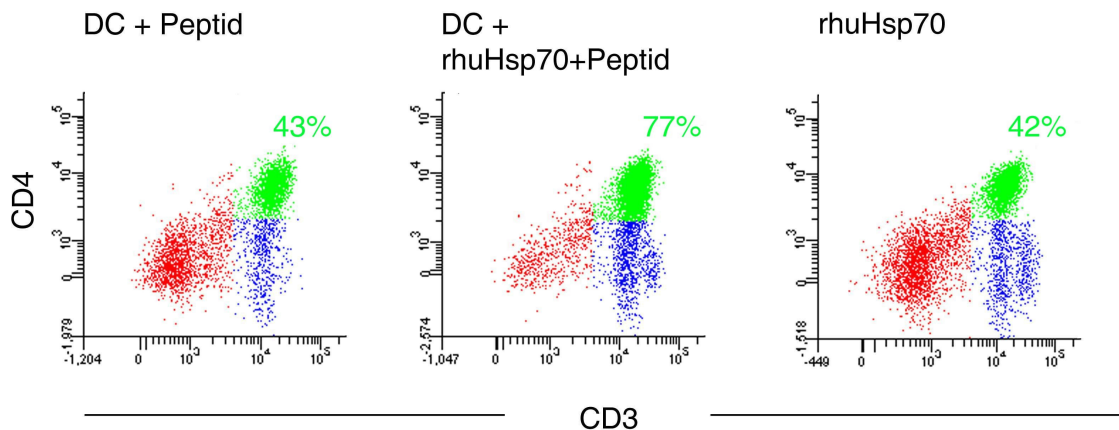
Der Anteil der CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T-Zellen war in den Primingansätzen mit rhuHsp70:Peptid gepulsten DCs (2) im Durchschnitt um 30 % größer als in den Primingansätzen mit Peptid gepulsten DCs (1). Eine Ausnahme war hierbei der Versuch P3, wo die Zunahme nur marginal war.

Beim Priming mit Peptid gepulsten und LPS stimulierten DCs wurden keine konsistenten Ergebnisse erzielt. Der Anteil der CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T-Zellen war hier im Vergleich zu Ansatz 1

größer bei Versuch P2, gleich bei Versuch P3 oder geringer bei Versuch P4.

Wurden die gepulsten gewaschenen DCs verwendet, so war auch hier im Ansatz w2 die Zunahme der CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T-Zellen gegenüber Ansatz w1 zu sehen (P3 und P4). In Versuch P2 wurde diese Steigerung mit den gewaschenen DCs nicht beobachtet. Dafür wurde in Versuch P2 eine Zunahme von CD3<sup>+</sup>CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup> T-Zellen nach dem Priming mit gewaschenen rhuHsp70:Peptid gepulsten DCs gemessen (Daten nicht gezeigt). Eine detaillierte Untersuchung dieser Zellen wurde nicht durchgeführt.

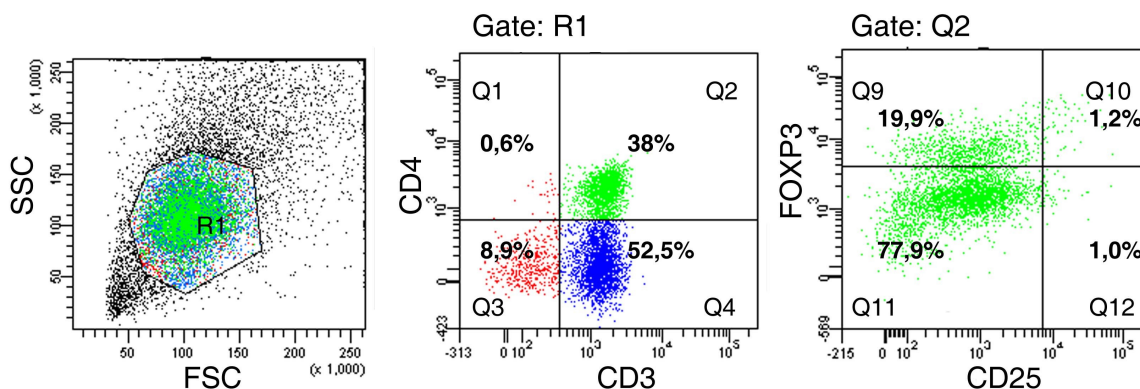
Die durch rhuHsp70 induzierte Proliferation der CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T-Zellen konnte nur dann beobachtet werden, wenn auch DCs eingesetzt wurden. Abbildung 2.48 zeigt die FACS Auswertungen des Versuches P4. Wurden die mit rhuHsp70:Peptid Komplex gepulsten DCs im Priming eingesetzt, stieg deutlich der Anteil der CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> Population. Wurde rhuHsp70 ohne DCs direkt zu den PBL gegeben, so war der Anteil der CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T-Zellen war genau so hoch wie der in den mit Peptid gepulsten DCs geprimten Zellen. Außerdem wurde auch durch das Priming mit den rhuHsp70:Peptid gepulsten und gewaschenen DCs der Anteil der CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T-Zellen erhöht (w1 und w2 in P3 und P4 Tab.2.5). Somit ist der Anstieg der CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T-Zellen nicht auf einen direkten Einfluss von rhuHsp70 auf die PBL zurückzuführen, sondern hierfür war die Anwesenheit von DCs erforderlich.



**Abbildung 2.48** FACS Analyse der CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> Population nach dem Priming von T-Zellen mit Peptid oder rhuHsp70:Peptid gepulsten DCs oder nach Stimulation der Monozyten depletierten PBL mit 1  $\mu$ M rhuHsp70. Es sind die Ansätze aus Versuch P4 dargestellt. Rot sind alle Zellen in R1 (siehe Abb. 2.47) und blau sind alle CD3<sup>+</sup> Zellen (Q2+Q4). Grün sind alle CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> Zellen (Q2). Bei der Darstellung ist die Reihenfolge vom Vordergrund ausgehend: grün, blau, rot.

### 2.7.4.3. Anteil der FOXP3<sup>+</sup> Zellen innerhalb der CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T-Zellpopulation

Innerhalb der CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T-Zellpopulation wurde der Anteil an FOXP3<sup>+</sup> T-Zellen untersucht. Abbildung 2.48 zeigt, wie die jeweiligen Zellpopulationen bestimmt wurden. Nach Auswahl der Population im FSC/SSC Dot Plot wurden die CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T-Zellen ausgewählt (Q2 in Abb. 2.48). Davon wurde der prozentuale Anteil der Zellen bestimmt, die FOXP3 positiv waren (Q9+Q10 in Abb. 2.48).



**Abbildung 2.48** Bestimmung des prozentualen Anteils an CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T-Zellen innerhalb aller geprimten Zellen und der FOXP3<sup>+</sup> T-Zellen und CD25<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup> T-Zellen innerhalb der CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T-Zellen. Für die Festlegung des Gate Q10 wurden nur die CD25 hoch positiven Zellen, die auch FOXP3 positiv sind, herangezogen. Als Beispiel sind die Zellen aus Ansatz 1 von Versuch P2 gezeigt. Rot sind alle Zellen in R1 und blau sind alle CD3<sup>+</sup> Zellen (Q2+Q4). Grün sind alle CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> Zellen (Q2). Bei der Darstellung ist die Reihenfolge vom Vordergrund ausgehend: grün, blau, rot.

Der Anteil der FOXP3<sup>+</sup> Zellen war nach dem Priming in allen Versuchen (P1-P4) wesentlich größer als in den PBL (Tab. 2.5). Die mit rhuHsp70:Peptid gepulsten DCs geprimten Zellen (Ansatz 2) hatten einen Anteil an FOXP3<sup>+</sup> Zellen, der ungefähr doppelt so groß war, wie der im Ansatz mit Peptid gepulsten DCs (Ansatz 1).

In den LPS-haltigen Ansätzen war der prozentuale Anteil größer (P2) oder marginal geringer (P3 und P4) als im Ansatz 1.

Auch in den Ansätzen mit den gewaschenen DCs, war die Steigerung des Anteils der FOXP3<sup>+</sup> Zellen in den CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T- Zellen nach dem Priming mit rhuHsp70:Peptid gepulsten DCs konsistent in allen Versuchen zu sehen (Vergleich w1 und w2 in P2-4 Tab. 2.5).

Wurden die PBL mit rhuHsp70 inkubiert (Ansatz 4), wurde ebenfalls ein Anstieg des Anteils an FOXP3<sup>+</sup> Zellen beobachtet. Da dieser Anstieg aber auch im Ansatz mit den gewaschenen DCs (w2 gegenüber w1) zu sehen war, kann geschlossen werden, dass die direkte Interaktion zwischen rhuHsp70 und den PBL dafür nicht unbedingt erforderlich

## Ergebnisse

war.

Tabelle 2.5	% FOXP3 <sup>+</sup> T-Zellen (von CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> T-Zellen)			
	Versuch P1	Versuch P2	Versuch P3	Versuch P4
Ansatz 1 <sup>#</sup>	8,9	21,1	7,8	21,9
Ansatz 2 <sup>#</sup>	22,3	39,9	11,8	40,4
Ansatz 3 <sup>#</sup>	n.a.	30,4	6,7	18,9
Ansatz w1 <sup>#</sup>	n.a.	31,5	9	22,9
Ansatz w2 <sup>#</sup>	n.a.	42,9	19,3	38,9
Ansatz 4 <sup>#</sup>	n.a.	n.a.	12,3	33,8
PBL <sup>#</sup>	n.a.	5,3	2,5	5,4

<sup>#</sup> 1=DC + 70 nM b-pep70-MART-1

2=DC + rhuHsp70:b-pep70-MART-1\*

3=DC + 70 nM b-pep70-MART-1 + LPS (1 µg/ml)

w1=DC + 70 nM b-pep70-MART-1; 24 h vorinkubiert, anschließend gewaschen

w2=DC + rhuHsp70:b-pep70-MART-1\*; 24h vorinkubiert, anschließend gewaschen

4= ohne DC + 1 µM rhuHsp70

PBL: Monozyten depletierte PBL, Ausgangszellen für das Priming

\*Für den rhuHsp70:Peptid Komplex wurden 70 nM b-pep70-MART-1 mit 1 µM rhuHp70 bei RT vorinkubiert.

n.a.: nicht angesetzt

#### 2.7.4.4. Anteil der CD25<sup>++</sup>FOXP3<sup>+</sup> T-Zellen innerhalb der CD3<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T-Zellpopulation

Von den CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T-Zellen wurde der Anteil an CD25<sup>++</sup>FOXP3<sup>+</sup> T-Zellen bestimmt (Q10 in Abb. 2.48). Die Färbung mit anti-human CD25 ergibt in der Regel keine abgegrenzten Populationen. Für die Festlegung von Q10 wurde sich an der Expression von FOXP3 orientiert und die Zellen mit mittlerer Expression von CD25 sind in Q10 nicht mit einbezogen. Die Ergebnisse sind in Tabelle 2.6 dargestellt.

Tabelle 2.6	% CD25 <sup>++</sup> FOXP3 <sup>+</sup> T-Zellen (von CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> T-Zellen)			
	Versuch P1	Versuch P2	Versuch P3	Versuch P4
Ansatz 1 <sup>#</sup>	2,7	1,2	2,4	4,0
Ansatz 2 <sup>#</sup>	6,4	1,7	1,8	3,4
Ansatz 3 <sup>#</sup>	n.a.	0,5	0,7	1,1
Ansatz w1 <sup>#</sup>	n.a.	1,3	1,9	4,3
Ansatz w2 <sup>#</sup>	n.a.	1,0	1,3	4,2
Ansatz 4 <sup>#</sup>	n.a.	n.a.	1,5	1,8
PBL <sup>#</sup>	n.a.	0	0,1	0

<sup>#</sup> 1=DC + 70 nM b-pep70-MART-1

2=DC + rhuHsp70:b-pep70-MART-1\*

3=DC + 70 nM b-pep70-MART-1 + LPS (1 µg/ml)

w1=DC + 70 nM b-pep70-MART-1; 24 h vorinkubiert, anschließend gewaschen

w2=DC + rhuHsp70:b-pep70-MART-1\*; 24h vorinkubiert, anschließend gewaschen

4= ohne DC + 1 µM rhuHsp70

PBL: Monozyten depletierte PBL, Ausgangszellen für das Priming

\*Für den rhuHsp70:Peptid Komplex wurden 70 nM b-pep70-MART-1 mit 1 µM rhuHp70 bei RT vorinkubiert.

n.a.: nicht angesetzt

Die Monozyten depletierten PBL enthielten im Vergleich zu den geprimten Zellen wesentlich weniger bzw. keine CD25<sup>++</sup>FOXP3<sup>+</sup> T-Zellen (Tab. 2.6).

Der Anteil der CD25<sup>++</sup>FOXP3<sup>+</sup> T-Zellen innerhalb CD3<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T-Zellen war in den Primingansätzen mit Peptid gepulsten DCs niedriger (P1 ) oder in etwa gleich (P2, P3, P4) wie in den Ansätzen mit rhuHsp70:Peptid gepulsten DCs (Tab. 2.6). Wurden für das Priming LPS stimulierte DCs verwendet, so war der Anteil an CD25<sup>++</sup>FOXP3<sup>+</sup> T-Zellen geringer als in den Ansätzen mit Peptid oder rhuHsp70:Peptid gepulsten DCs ohne LPS (Vergleich

Ansätze 1 und 2 mit 3 in Tab. 2.6). Wurden die gepulsten DCs vor Zugabe gewaschen, so war der Anteil an CD25<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup> T-Zellen in den Ansätzen mit rhuHsp70:Peptid (w2) im Vergleich zu denen mit Peptid allein (w1) marginal geringer (P2-P4).

Während durch das Priming mit den rhuHsp70:Peptid gepulsten DCs der Anteil an FOXP3<sup>+</sup> Zellen in der gesamten CD4<sup>+</sup> T-Zellpopulation deutlich zunahm, konnte eine konsistente Erhöhung der CD25<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T-Zellen nicht nachgewiesen werden.

#### 2.7.4.5. Quantifizierung der NK-Zellen

Der Anteil der NK-Zellen innerhalb aller geprimten Zellen wurde in den Versuchen P2 –P4 bestimmt. Dafür wurden die Zellen nach dem Priming mit Antikörpern gegen CD3 und CD56 gefärbt und im FACS analysiert. Der Anteil an CD3<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> Zellen (=NK-Zellen) war in den Versuchen P2 und P3 sehr niedrig. Deshalb sind nur die Ergebnisse aus P4 dargestellt.

Der Anteil der NK-Zellen in dem Ansatz 1 mit Peptid gepulsten DCs war gleich groß wie der in den Monozyten depletierten PBL, die für das Priming eingesetzt wurden (Tab. 2.7).

Eine deutliche Zunahme an CD3<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> Zellen wurde im Ansatz mit Peptid gepulsten und LPS stimulierten DCs (Ansatz 3) gemessen.

Die mit den rhuHsp70:Peptid gepulsten DCs (Ansatz 2) geprimte Zellen enthielten wesentlich weniger NK-Zellen (Tab. 2.7). Wurden die gepulsten DCs gewaschen, so verringerte sich der Anteil an NK-Zellen im Vergleich zu den nicht gewaschenen Ansätzen. Wurden die PBL mit rhuHsp70 ohne DCs inkubiert (Ansatz 4), so wurde hier eine Zunahme der NK-Zellen beobachtet. RhuHsp70 scheint einen direkten stimulatorischen Einfluss auf die NK-Zellpopulation zu haben.

Tabelle 2.7	% CD3 <sup>+</sup> CD56 <sup>+</sup> Zellen (von Gesamtzellen)						
	Ansatz 1 <sup>#</sup>	Ansatz 2 <sup>#</sup>	Ansatz 3 <sup>#</sup>	Ansatz w1 <sup>#</sup>	Ansatz w2 <sup>#</sup>	Ansatz 4 <sup>#</sup>	PBL <sup>#</sup>
Versuch P4	15,9	2,7	33,1	6	1,9	21,5	16,1

<sup>#</sup> 1=DC + 70 nM b-pep70-MART-1

2=DC + rhuHsp70:b-pep70-MART-1\*

3=DC + 70 nM b-pep70-MART-1 + LPS (1 µg/ml)

w1=DC + 70 nM b-pep70-MART-1; 24 h vorinkubiert, anschließend gewaschen

w2=DC + rhuHsp70:b-pep70-MART-1\*; 24h vorinkubiert, anschließend gewaschen

4= ohne DC + 1 µM rhuHsp70

PBL: Monozyten depletierte PBL, Ausgangszellen für das Priming

\*Für den rhuHsp70:Peptid Komplex wurden 70 nM b-pep70-MART-1 mit 1 µM rhuHp70 bei RT vorinkubiert. n.a.: nicht angesetzt

## Ergebnisse

---

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass durch das Priming mit den rhuHsp70:Peptid Komplexen im Vergleich zum Priming mit dem Peptid allein die Zusammensetzung der Zellpopulation verändert wurde: Der Anteil von CD8<sup>+</sup> T-Zellen an allen CD3<sup>+</sup> Zellen nahm ab. Der Anteil der CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T-Zellen nahm zu. Innerhalb der CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T-Zellen stieg der Anteil an FOXP3<sup>+</sup> Zellen. Es wurde aber keine Zunahme der CD25<sup>++</sup>FOXP3<sup>+</sup> T-Zellen innerhalb der CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T-Zellen beobachtet.



### 3. Diskussion

Ziel der Dissertation war es, die Interaktionen von rekombinantem humanem Hsp70 mit dendritischen Zellen und deren Funktionen in der Antigenpräsentation und dem T-Zell Priming zu präzisieren.

Die Rolle von Hsp70 bei der Immunantwort ist Gegenstand der aktuellen Forschung [114, 117,134,156,182]. Eine Reihe von Arbeiten zeigen, dass Hitzeschock-Proteine sowohl bei der innate als auch der adaptiven Immunantwort Funktionen ausüben. Laut Literatur aktivieren Hitzeschock-Proteine immunkompetente Zellen wie dendritische Zellen (DCs) [97,98,100,118]. Hierbei wurde gezeigt, dass die Aktivierung über verschiedene Mechanismen erfolgt. Unter anderem werden über die Toll-like Rezeptoren die Zytokinsekretion und Maturierung der DCs stimuliert [110,111]. Außerdem ist die Beteiligung von CD40 beschrieben [113]. Darüber hinaus zeigte eine aktuelle Arbeit CCR5 als *pattern recognition receptor* für mykobakterielles Hsp70 [156,157]. Allerdings gibt es keine umfassenden Studien, die eine Interpretation zu den Interaktionen aller beschriebenen Wege zulassen. Neben der Signalfunktion stimulieren Hitzeschock-Protein:Peptid Komplexe eine Antigen-spezifische Immunantwort [134,182]. Aufgrund dieser dualen Wirkung wurden Hitzeschock-Proteine, wie Hsp70, für den Einsatz in einer immunbasierten Tumorthherapie vorgeschlagen [142, 143]. Diesen Einsatz zu bewerten war jedoch nicht möglich, da in der Literatur widersprüchliche Daten über die Funktionen von Hsp70 vorliegen. So sind eine Reihe von Kontaminationen in den Präparationen der Hitzeschock-Proteine beschrieben, die möglicherweise die innate Stimulation auslösten [146-149]. Inwieweit diese Kontaminationen die Antigen-spezifische Immunantwort gegen Peptide, die an Hsp70 gebunden sind, beeinflussten, war nicht geklärt. Um die widersprüchlichen Befunde zur immunologischen Funktion von Hsp70 zu klären und auch das therapeutische Potential abzuschätzen, erfolgte in dieser Dissertation eine Verknüpfung von biochemischen und immunologischen Untersuchungen unter Berücksichtigung anwendungsorientierter Erfordernisse. Da Hsp70 in der erforderlichen Qualität nicht erworben werden konnte, wurde rHuHsp70 für alle Versuche selbst in einem intensiven Reinigungsverfahren hergestellt.

#### 3.1. Reinigung und Analyse des Hsp70

Die Reinigung des rekombinanten Hsp70 für den Einsatz in die *in vitro* Versuche mit DCs erforderte spezielle Schritte, die zu einer hohen Reinheit führten. Dabei war nicht nur die Proteinreinheit an sich von Bedeutung sondern auch der Gehalt an nicht von Proteinen

abgeleiteten Substanzen, die durch die Expression in den E.coli oder die Reinigung in die Präparation gelangen konnten. Die hohe Reinheit war sehr wichtig, um eine fälschliche Assoziation einer biologischen Aktivität mit rhuHsp70 auszuschließen. Bereits bekannt war, dass in den Hsp70 Präparationen Kontaminationen mit Endotoxinen vorhanden sein können. Diese Erkenntnis löste eine kontroverse Diskussion darüber aus, welche Funktionen das Hsp70 selbst im Immunsystem hat. In vielen Studien wird daher mit *LPS low* Hsp70 Präparationen gearbeitet. Als *LPS low* wird dabei noch ein Endotoxingehalt von 5 EU/ mg Protein bezeichnet [97,156,158]. Der bestimmte Wert bietet jedoch nur einen Anhaltspunkt. Ob LPS ausreichend entfernt wurde, kann allein aus diesem Wert nicht abgeleitet werden. Hierbei spielt es eine entscheidende Rolle, wie sensitiv die für das jeweilige Testsystem verwendeten Zellen auf LPS reagieren. Für die hier durchgeführte Arbeit musste das rhuHsp70 aus jeder Reinigung die unter 2.4 aufgeführten Anforderungen, wie ein LPS Gehalt unter 0,5 EU/mg Protein und eine hohe Proteinreinheit erfüllen. Um diese qualitativen Vorgaben zu erfüllen, wurden nach der Reinigung, die nach dem modifizierten Protokoll von Buchberger et al. [154] durchgeführt wurde, weitere Methoden zu Entfernung der Nukleotide und LPS angewendet. Durch intensive Dialyse und Diafiltration wurde der Gehalt an freien Nukleotiden stark reduziert. Um das LPS zu entfernen, wurde rhuHsp70 mehrmals chromatographisch mit an einer Matrix gebundenen Polymyxin B (Detoxi-Gel) gereinigt. Wichtig war, dass rhuHsp70 vor diesen zusätzlichen Schritten bereits eine hohe Proteinreinheit hatte, um zu verhindern, dass zum Beispiel noch enthaltene Proteasen es abbauen oder weitere Interaktion mit anderen Proteinen stattfinden.

Zusätzlich zur Identität und Reinheit wurde die intrinsische ATPase Kapazität des rhuHsp70 bestimmt. Da das rhuHsp70 eine der Literatur entsprechende intrinsische ATPase Aktivität aufwies, konnte ausgeschlossen werden, dass das Protein durch die intensive Reinigung denaturiert oder anderweitig beeinträchtigt worden war. Darüber hinaus wurde das intensiv gereinigte rhuHsp70 von einem Kooperationspartner (Lehrstuhl Biotechnologie IV, Department of Chemistry, München Technische Universität, Garching ) biochemisch untersucht. Hierbei zeigte die Analyse mittels Circular-Dichroismus Spektroskopie einem dem DnaK vergleichbaren Anteil an  $\alpha$ -Helices. Wichtige Sekundärstrukturelemente des rhuHsp70 waren demnach nach der intensiven Reinigung vorhanden.

### **3.2. Nukleotide in der rhuHsp70 Präparationen induzieren ein Calciumsignal in DCs**

Im Rahmen dieser Dissertation wurde festgestellt, dass freie Nukleotide in den rhuHsp70 Präparationen in IL-4/GM-CSF generierten DCs einen intrazellulären Einstrom von

Calciumionen induzierten. Hierfür reichten bereits Konzentrationen von ADP und ATP in nanomolarem bzw. mikromolarem Bereich aus.

Von anderen Arbeitsgruppen wurde berichtet, dass in DCs durch Stimulation mit mykobakteriellem Hsp70 der Einstrom von Calciumionen induziert wird [156-158]. In Monozyten wurde ein schneller Calciumioneneinstrom nach der Aktivierung mit humanen Hsp70 gezeigt [90]. Bis dato wurde das durch rHsp70 induzierte Calciumsignal nicht in Frage gestellt. Die beschriebenen Kontaminationen wie LPS oder Flagellin aktivieren die *Toll-like* Rezeptoren Signalkaskaden, die nicht mit dem Einstrom von Calciumionen verbunden sind. Somit konnte das Signal nicht auf das möglicherweise enthaltene LPS zurückgeführt werden. Der mögliche Anteil an Nukleotiden in den Hsp70 Präparationen wurde bislang nicht beachtet und auch nicht als Ursache für des Calciumsignal berücksichtigt. ATP oder ADP kann über die Reinigung mit ATP-Agarose in die rhuHsp70 Präparation gelangen. Auch nach den üblichen Dialyseverfahren und Pufferaustausch sind die Konzentrationen an Nukleotiden ausreichend, um den Einstrom von Calciumionen in DCs auszulösen, wie bei dem Einsatz des industriell hergestellten und des eigenen rhuHsp70 zu sehen war. Diese Arbeit zeigt, dass Nukleotide in den rhuHsp70 Präparationen enthalten sein können und erst nach intensiver Dialyse und Diafiltration zusätzlich zu der Umpufferung mit Sephadexgelen oder Dialyse im üblichem Umfang, der Gehalt an freien Nukleotiden genügend reduziert wurde, so dass kein Calciumsignal in den DCs ausgelöst wurde.

Immature DCs reagierten besonders sensitiv gegenüber ADP und ATP. Bereits Konzentrationen von 370 nM waren ausreichend, um den Einstrom der Calciumionen zu aktivieren. Mature DCs waren wesentlich weniger sensitiv: Erst bei einer Konzentration von 1  $\mu$ M ADP bzw. 10  $\mu$ M ATP konnte in maturen DCs das Calciumsignal induziert werden. Monozyten reagierten auch auf 10  $\mu$ M nicht mit den Einstrom von Calciumionen.

Innerhalb der immaturen DCs konnten zwei Gruppen hinsichtlich der Induzierbarkeit des Calciumsignals unterschieden werden. DCs mit hoher Expression von CD32 reagierten auf Nukleotide und die Nukleotid-haltige rhuHsp70 Präparation mit starkem Einstrom von Calciumionen. Kein oder nur ein sehr schwacher Calciumioneneinstrom wurde in DCs mit einer niedrigen Expression von CD32 beobachtet. Insgesamt wurden in dieser Arbeit DCs von zehn Spendern untersucht und konsistent konnte aus der Expression von CD32 die Stimulierbarkeit des Calciumsignals durch Nukleotide abgeleitet werden. Die Unterschiede in der Expression von CD32 waren unabhängig vom Spender und der Methode der Monozytenisolierung. Der mechanistische Zusammenhang zwischen der CD32 Expression und der Sensitivität gegenüber dem Nukleotid-induziertem Calciumsignal ist

nicht geklärt. Möglicherweise korreliert die Expression von CD32 mit der der Purinrezeptoren, was aber noch nicht untersucht ist. Humane DCs generiert aus Monozyten exprimieren Nukleotid-Rezeptoren [162]. Es werden zwei unterschiedliche Klassen dieser Rezeptoren unterschieden: P2X und P2Y Rezeptoren. Die P2Y Rezeptoren sind G-Protein gekoppelt und P2X Rezeptoren sind Ionenkanäle. Beide Klassen der Rezeptoren umfassen eine Reihe von Subtypen [162]. CD32 ist ein FcγRII Rezeptor ist. Das *Cross-Linking* von CD32 induziert die Maturierung von humanen aus Monozyten generierten DCs [183] und über FcγR werden die Fc-Fragmente von IgG gebunden, was eine Rolle bei der Aufnahme von Antigenen spielt, die von spezifischen Antikörpern opsoniert worden sind.

Im Rahmen der Versuche wurden zum ersten Mal gezeigt, dass humanes Hsp70 nicht, wie für mykobakterielles Hsp70 von Floto et al. aktuell in Science beschrieben wurde [156], über CCR5 einen Einstrom von Calciumionen stimuliert.

### **3.3. Funktionen von rhuHsp70 in der innate Aktivierung von DCs und der Kreuzpräsentation von Peptidantigenen**

In dieser Dissertation wurde gezeigt, dass der Calciumioneneinstrom durch Nukleotide in den rhuHsp70 Präparationen und nicht durch rhuHsp70 selbst verursacht wurde. Dass rhuHsp70 selbst nicht das Calciumsignal stimulierte, wurde mit verschiedenen Versuchsansätzen überprüft. Zum einem wurde gezeigt, dass die Induktion des Calciumsignals vollständig mit einem Purinrezeptorantagonisten blockiert werden konnte. Zum anderen zeigten Zellen, wie Monozyten, mature DCs oder CD32<sup>low</sup> DCs, die nicht auf Nukleotide reagierten, auch kein Calciumsignal nach Stimulation mit der rhuHsp70 Präparation. Desweiteren reagierten DCs, in denen der Calciumioneneinstrom durch Nukleotide induziert werden konnte, nicht auf eine rhuHsp70 Präparation, deren Nukleotidgehalt durch intensive Dialyse und Diafiltration stark reduziert worden war.

Um einen durch die Nukleotide maskierenden Effekt auf mögliche innate stimulatorischen Eigenschaften des Hsp70 auszuschließen, wurde für alle weiteren Versuche eine intensiv dialysierte Präparation verwendet und die Versuche mit CD32<sup>high</sup> und CD32<sup>low</sup> DCs durchgeführt. Weder die Calciumioneneinstrom aktivierende noch die nicht aktivierende rhuHsp70 Präparation induzierte eine Veränderung der Expression der Oberflächenmarker CD80, CD86, CD83 oder CD40 auf den CD32<sup>high</sup> und CD32<sup>low</sup> DCs. Ebenso wurde die Expression von CD38 durch rhuHsp70 nicht verändert. Außerdem zeigte diese Arbeit, dass die Expression der Chemokinrezeptoren CCR5, CXCR4 und CCR7 auf den DCs nicht durch rhuHsp70 verändert wurde.

RhuHsp70 induzierte auch nicht die Sekretion der Zytokine IL-12, TNF und IL-10.

Es ist beschrieben, dass Nukleotide in Konzentrationen von 10-250  $\mu\text{M}$  die Expression von Maturierungsmarkern verstärken können und die durch LPS induzierte Sekretion von IL-12 und TNF blockieren [184]. Da für die hier durchgeführten Versuche eine rhuHsp70 Präparation, die keinen Calciumioneneinstrom aktivierte, eingesetzt wurde, kann ausgeschlossen werden, dass eine Zytokinsekretion möglicherweise durch die Nukleotide inhibiert worden war. CD32<sup>low</sup> DCs, die, wie gezeigt, nicht durch Nukleotide aktiviert werden, wurden durch rhuHsp70 ebenso nicht zu Sekretion der Zytokine angeregt. Die in der Literatur beschriebene Aktivierung der Sekretion dieser Zytokine durch rhuHsp70 [98,94,140,111] konnte in dieser Arbeit somit nicht bestätigt werden. Die Daten dieser Arbeit lassen den Schluss zu, dass, wie auch bereits von anderen Arbeitsgruppen gezeigt [146-150], die Kontaminationen mit bakteriellen Substanzen wie LPS für die beobachtete phänotypische Maturierung und Zytokinsekretion verantwortlich sind.

Ein weiterer Beweis dafür, dass rhuHp70 nicht die Maturierung der DCs aktiviert, wurde durch Untersuchung der Makropinozytose erbracht. Die Makropinozytose der DCs ist eng an ihren Aktivierungszustand gebunden. Nicht aktivierte DCs nehmen über diesen, auch als *fluid phase uptake* bezeichneten Vorgang, unspezifisch viele Moleküle auf. Da bei einer Infektion der Fokus auf das vom Pathogen abstammende Antigen gelegt werden soll, wird die Aufnahme weiterer nicht Pathogen assoziierter Moleküle dadurch verhindert, dass Pathogen abstammende Moleküle die Makropinozytose stark reduzieren. Diese Reduktion wird durch Signalmoleküle wie LPS induziert und ist ein Indikator dafür, dass die DCs aktiviert wurden. Aber nicht nur klassischen PAMPs reduzieren die Makropinozytose, sondern auch Nukleotide in höheren Konzentrationen (250  $\mu\text{M}$ ), wie in dieser Arbeit gezeigt wurde. Die Änderung der Makropinozytosekapazität ist demnach ein Indikator für eine Aktivierung der DCs. Da durch Stimulation der DCs mit rhuHsp70 die Makropinozytose nicht verändert wurde, kann geschlossen werden, dass rhuHsp70 keine einem Maturierungssignal vergleichbare Aktivität hat.

Zusammenfassend zeigen alle Untersuchungen, dass rhuHsp70 kein Signal für die innate Aktivierung der DCs ist. RhuHsp70 induzierte in DCs keinen Einstrom von Calciumionen, aktivierte nicht die phänotypische Maturierung und Zytokinsekretion der DCs und veränderte nicht deren Makropinozytosekapazität. Darüber hinaus stellt diese Arbeit heraus, dass die Reinheit der für die Untersuchung verwendeten Proteine eine besondere Bedeutung für die Schlussfolgerung und Interpretation der Ergebnisse hat. So können schon geringe Mengen an Kontaminationen, wie Nukleotide oder Endotoxine dazu führen, dass beobachtete Effekte fälschlicherweise der Aktivität des rhuHsp70 zugeschrieben

werden.

In der vorliegenden Dissertation wurde weiterführend gezeigt, dass sehr reines Endotoxin- und Nukelotid-abgereinigtes rhuHsp70 auch ohne Kapazität zur Induktion einer Zytokinsekretion oder Induktion costimulatorischer Moleküle die Kreuzpräsentation von verschiedenen Peptidantigenen signifikant verstärkte. Diese Funktion wurde im Detail untersucht.

Zum ersten Mal wird mit dieser Dissertation die Steigerung durch rhuHsp70 in der Kreuzpräsentation quantifiziert. Für die Quantifizierung wurde die Kreuzpräsentation von gleichen Mengen Peptidantigen allein oder im Komplex mit rhuHsp70 verglichen.

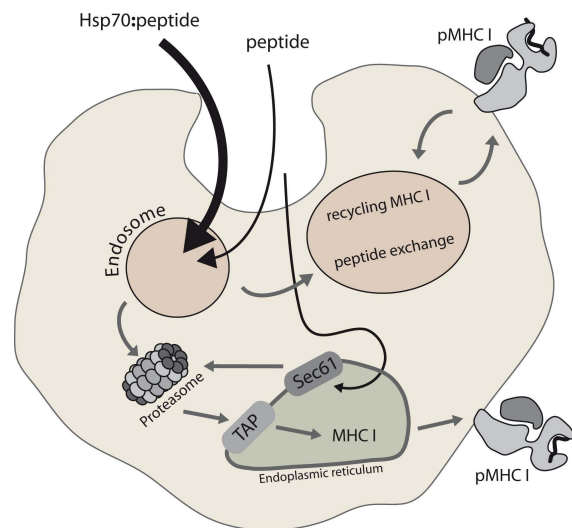
RhuHsp70 verstärkte die Kreuzpräsentation der Peptidantigene (b-pep70-MART-1 und b-pep70-Tyr) in verschiedenen APCs, z.Bsp. DCs und den B-LCL. Dass es sich um Kreuzpräsentation der Peptidantigene bzw. der rhuHsp70:Peptid Komplexe handelt, wird wie folgt begründet: Die eingesetzten Peptide b-pep70-MART-1 und b-pep70-Tyr bestehen aus 23 Aminosäuren und enthalten Biotin. An MHC-Klasse-I binden kurze, acht bis zehn Aminosäuren lange Peptide. Die eingesetzten längeren Peptide müssen also für die Beladung auf MHC-Klasse-I prozessiert werden. Dies geschieht durch Aufnahme in die APCs und der Prozessierung der Peptide in diesen Zellen. Anschließend werden diese exogen aufgenommen und prozessierten Peptide auf MHC-Klasse-I geladen (Kreuzpräsentation). Ein Beweis für diese Annahme zeigen die Versuche mit Chloroquin. Chloroquin hatte auf die Präsentation von b-pep70-MART-1 als auch von b-pep70-Tyr einen Einfluss. Die Präsentation der von außen auf MHC-Klasse-I ladbaren nonameren Peptide wurde dagegen von Chloroquin nicht beeinflusst. Zudem wurde durch Verringerung der Makropinozytose durch ADP die Präsentation von b-pep70-MART-1 als auch von rhuHsp70:b-pep70-MART-1 verringert.

Als wesentliche Voraussetzung für die durch rhuHsp70 vermittelte Verstärkung wurde die Komplexbildung zwischen dem Peptidantigen und rhuHsp70 nachgewiesen. Es zeigte sich eine direkte Korrelation zwischen dem Anteil an gebundenen Peptidantigenen und der prozentualen Zunahme der T-Zellaktivierung. Durch den Einsatz von Hybridpeptiden mit der hoch-affinen Hsp70 bindenden Sequenz (pep70) konnten die rhuHsp70:Peptid Komplexe erhalten werden.

Es wurde gezeigt, dass für die Verstärkung der Kreuzpräsentation nicht die Anwesenheit von rhuHsp70 allein ausreichte. So wurde keine Steigerung der Kreuzpräsentation gemessen, wenn die Affinität von rhuHsp70 für das Peptidantigen durch Zugabe von  $\gamma$ -ATP verringert wurde oder wenn rhuHsp70 direkt zu den APCs und Peptidantigen ohne

Vorinkubation gegeben wurde. Im letzteren Ansatz bestand nicht ausreichend Zeit für die Komplexbildung vor der Aufnahme durch die APCs [185]. Da die Kreuzpräsentation nicht gesteigert wurde, wenn rhuHsp70 ohne Vorinkubation direkt zu den DCs und dem Peptidantigen gegeben worden war, konnte ausgeschlossen werden, dass mögliche Kontaminationen in der rhuHsp70 Präparation die gesteigerte T-Zellaktivierung verursachten. Wäre die Steigerung der Kreuzpräsentation durch additive Signale verursacht worden, hätte die Anwesenheit von rhuHsp70 auch ohne Komplexbildung den beobachteten Effekt auslösen müssen.

Der genaue Mechanismus der Kreuzpräsentation von rhuHsp70:Peptid Komplexen durch DCs oder B-Zellen ist bis dato nicht vollständig geklärt. Tobian et al. beschreibt, dass Hsp70:Peptid Komplexe die Antigen-Prozessierung durch den vakuolären Weg in B-Zellen verstärken [179]. In DCs sind zytosolische Mechanismen für die Kreuzpräsentation von Hsp Komplexen beschrieben [178]. Zur Beteiligung des Proteasoms und TAP gibt es widersprüchliche Aussagen [134,180]. In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass die rhuHsp70 vermittelte Verstärkung unabhängig von der endolysosomalen Ansäuerung, unabhängig von dem für die Retrotranslokation wichtigen Sec61-Kanal und unabhängig von TAP war. Daraus lässt sich schließen, dass der Mechanismus der Verstärkung wahrscheinlich proximal der mit diesen Komponenten verbundenen Transportwege liegt (Abb. 3.1).



**Abbildung 3.1** Die rhuHsp70 vermittelte Verstärkung liegt wahrscheinlich proximal der Transportwege und Prozessierungsschritte, die mit der endolysosomalen Ansäuerung, Sec61 oder TAP verbunden sind. Ein mögliche Erklärung ist, dass durch die Bindung an rhuHsp70 die verlängerten Peptide (b-pep70-MART-1 und b-pep70-Tyr) besser von den APCs aufgenommen werden können. Somit würde mehr Antigen in den Zellen vorliegen, was unabhängig von den verschiedenen Wegen zu mehr präsentierten Antigen führen könnte.

Die Kreuzpräsentationsversuche mit zwei Peptidantigenen in Anwesenheit von Chloroquin lieferten wichtige Hinweise dafür, dass rhuHsp70 unabhängig von den unterschiedlichen Bedingungen für die Prozessierung die Kreuzpräsentation verstärkt. Chloroquin ist ein lysosomotropisches Agens, das die Ansäuerung der Endosomen verhindert. Viele der in den endolysosomalen Kompartimenten vorhandenen Proteasen (Cathepsine) haben eine optimale Aktivität bei niedrigem pH-Wert. Durch die Ansäuerung wird demnach die Degradation der Peptide durch diese Cathepsine gefördert. Eine Studie zeigte, dass durch Chloroquin die Effizienz der Kreuzpräsentation von löslichen Antigenen erheblich verbessert werden konnte [175]. Als Grund wird angeführt, dass das Antigen bei Anwesenheit von Chloroquin in geringerem Umfang degradiert wird, in den Endosomen akkumuliert und effizienter in das Zytosol exportiert wird [175]. Die Ergebnisse dieser Dissertation zeigten, dass Chloroquin die Kreuzpräsentation der verwendeten Peptidantigene unterschiedlich beeinflusste, was unterschiedliche Prozessierungswege widerspiegelt. So verstärkte Chloroquin die Präsentation von b-pep70-Tyr und inhibierte die Präsentation von b-pep70-MART-1. Die rhuHsp70 vermittelte Steigerung war dagegen unabhängig von Chloroquin.

Die Ergebnisse dieser Dissertation zeigen, dass die Komplexierung des Peptides an rhuHsp70 zu einem erhöhten intrazellulären Peptidgehalt führte. Mit intrazellulären FACS-Analysen wurde gezeigt, dass mehr Peptid in den DCs oder B-Zellen vorhanden war, die mit rhuHsp70:Peptid Komplex inkubiert worden waren. Die DCs oder B-Zellen, die mit der gleichen Menge Peptid ohne rhuHsp70 inkubiert wurden, hatten eine deutlich niedrigere Menge an intrazellulärem Peptid. Wahrscheinlich wird der rhuHsp70:Peptid Komplex besser aufgenommen als das Peptid allein und somit gelangt in die Zellen mehr Peptidantigen. Ein anderer Grund für die nachgewiesene erhöhte intrazelluläre Menge des Peptides könnte auch sein, dass das rhuHsp70 gebundene Peptid nicht so schnell abgebaut wird.

In der Literatur ist als Grund für eine bessere Kreuzpräsentation die Rezeptor-vermittelte Aufnahme beschrieben. In diesem Zusammenhang wurde eine starke Abhängigkeit der Kreuzpräsentation der rhuHsp70:Peptid Komplexe von CD91 in DCs, Makrophagen und B-Zellen gezeigt [132,178]. Die für diese Dissertation verwendeten B-Zelllinien exprimierten kein CD91. Dennoch verstärkte rhuHsp70 die Kreuzpräsentation von diesen Zellen signifikant. Somit konnte die Notwendigkeit von CD91 nicht bestätigt werden. Diese Daten sind konsistent mit der von Palliser et al. publizierten Ergebnissen, die eine Beteiligung von CD91 ebenfalls nicht für wahrscheinlich halten [186].



Im Rahmen dieser Dissertation wurde des Weiteren herausgefunden, dass freie Nukleotide die Kreuzpräsentation von Peptidantigenen stark beeinflussen. Da rhuHsp70, wenn es ADP gebunden hat, konformationsbedingt eine hohe Affinität zu dem Peptidsubstrat hat, wird für die Rekonstitution der Komplexe ein ADP-haltiger Puffer vorgeschlagen [181]. Die Ergebnisse dieser Dissertation zeigen allerdings, dass freies ADP kritisch für die Kreuzpräsentation von DCs ist. ADP inhibierte bereits in einer Konzentration von 1  $\mu\text{M}$  die Kreuzpräsentation des Peptidantigens. Eine mögliche Ursache dafür ist die schnelle Reduktion der Makropinozytosekapazität der DCs nach der Stimulation mit ADP. Die Präsentation von Nonamer-Peptiden, die direkt von außen auf MHC-Klasse-I geladen werden und hierfür nicht durch Makropinozytose aufgenommen werden müssen, wurde nicht durch ADP verringert. Die Ergebnisse zeigen, dass bei der Beladung der DCs mit Antigenen, die über Kreuzpräsentation auf MHC-Klasse-I geladen werden, freies ADP aufgrund seiner inhibitorischen Aktivität nicht vorliegen sollte.

### **3.4. Funktionen von rhuHsp70 bei dem Priming von T-Zellen**

Für das Priming von T-Zellen sind, wie in der Einleitung beschrieben, drei Signale der DCs erforderlich: Peptid:MHC Komplex, Costimulation und Zytokinsekretion.

Wie in dieser Dissertation gezeigt, wird durch die Bindung des Peptidantigens an rhuHsp70 deren Präsentation signifikant gesteigert. In der Literatur ist beschrieben, dass mit rhuHsp:Peptid Komplexe nicht nur eine effiziente Kreuzpräsentation erfolgt, sondern auch zytotoxische CD8<sup>+</sup> T-Zellen geprimt werden können [134-139]. In dieser Dissertation wurde gezeigt, dass DCs gegenüber rhuHsp70 inert sind. RhuHsp70 erhöhte weder die costimulatorischen Moleküle noch induzierte es die Zytokinsekretion. Die Frage war nun, ob die verbesserte Kreuzpräsentation auch ein besseres T-Zellen-Priming ermöglicht. Dazu wurden Priming Ansätze mit Peptid gepulsten DCs und rhuHsp70:Peptid gepulsten DCs verglichen. Auch hierbei wurden gleiche Mengen an Peptid, allein oder in Komplex mit rhuHsp70 eingesetzt. Diese vergleichende Untersuchung wurde zum ersten Mal so durchgeführt und brachte neue Erkenntnisse über die Zusammensetzung der geprimten Zellen, die durch den Einsatz des rhuHsp70:Peptid Komplexes entstehen.

Die im Priming mit rhuHsp70:b-pep70-MART-1 Peptid gepulsten DCs bzw. b-pep70-MART-1 Peptid gepulsten DCs induzierten T-Zellpopulationen wurden auf den Anteil an MART reaktiven T-Zellen mit IFN- $\gamma$  und Perforin Elispot untersucht. Die Primingansätze mit den rhuHsp70:Peptid gepulsten DCs enthielten entweder gleich viel oder weniger IFN- $\gamma$  oder Perforin sezernierende Zellen als die Primingansätze mit Peptid gepulsten DCs. Mit rhuHsp70:Peptid Komplex gepulsten DCs wurden wie in der Literatur [134-138]

beschrieben Antigen-spezifische T-Zellen erhalten, aber deren Anzahl war gegenüber den nur mit Peptid gepulsten DCs geprimten Zellen nicht erhöht. Die durch rHuHsp70 vermittelte gesteigerte Kreuzpräsentation von exogenen Peptidantigenen führte demnach nicht zu mehr reaktiven T-Zellen unter Primingbedingungen. Bemerkenswert war aber, dass durch Priming mit Peptid gepulsten DCs eine T-Zellpopulation entstand, die auch deutliche Antigen-unabhängige Reaktionen zeigte. Der Anteil solcher Zellen war in den Primingansätzen mit rHuHsp70:Peptid gepulsten DCs geringer bei allen Primingversuchen. Hier entstanden bevorzugt Antigen-spezifisch reagierende Zellen. Diese Antigen-unabhängig reagierenden Zellen in den Primingansätzen mit Peptid gepulsten DCs machten eine Quantifizierung der Antigen-reaktiven T-Zellen unmöglich. Daher wurde als weitere Methode zur Quantifizierung Antigen-spezifischer T-Zellen die geprimten Zellen mit Tetramer gefärbt und im FACS analysiert. Die Daten der Tetramer FACS Analyse korrelierten nicht für alle durchgeführten Versuche mit den Ergebnissen aus dem Elispot. Bei der Interpretation dieser Daten muss allerdings beachtet werden, dass das Epitop des verfügbaren Tetramers sich in einer Aminosäure von dem im Priming verwendeten Peptidantigen unterschied. Dies könnte ein möglicher Grund für die Diskrepanzen zwischen den Elispot und FACS Daten sein. Im Rahmen dieser Dissertation konnte eine genaue Analyse mit verschiedenen Tetrameren nicht durchgeführt werden.

Zusätzlich zur Quantifizierung von Antigen-spezifischen T-Zellen in den Primingansätzen wurde auch die Zusammensetzung hinsichtlich der CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> T-Zellen und NK-Zellen untersucht.

Konsistent wurde in allen Versuchen beobachtet, dass der Anteil an den CD8<sup>+</sup> T-Zellen innerhalb der CD3<sup>+</sup> T-Zell Population geringer war, wenn das Priming mit den rHuHsp70:Peptid Komplex gepulsten DCs erfolgte. Dies entspricht der Beobachtung von Winau et al., dass die Vakzinierung mit rHuHsp70:Peptid Komplexen nicht zur Proliferation von CD8<sup>+</sup> T-Zellen führt [187]. Auch in den Primingansätzen mit den rHuHsp70:Peptid gepulsten DCs, die vor Zugabe zu den PBL gewaschen wurden, wurde beobachtet, dass der Anteil an den CD8<sup>+</sup> T-Zellen an der CD3<sup>+</sup> T-Zell Population geringer war. Somit konnte diese Beobachtung nicht mit direkten Interaktionen zwischen rHuHsp70 und den PBL erklärt werden. Der Anteil der CD8<sup>+</sup> T-Zellen wurde gesteigert, wenn mit Peptid gepulste und mit LPS stimulierte DCs eingesetzt wurden.

Bei einem Spender wurde der Anteil der NK-Zellen untersucht. Es wurde festgestellt, dass der Anteil an CD3<sup>-</sup>CD56<sup>+</sup> Zellen (NK-Zellen) durch das Priming mit rHuHsp70 gepulsten DCs deutlich abnahm. Eine Zunahme dagegen wurde beobachtet, wenn rHuHsp70 ohne

DCs direkt zu den PBL gegeben wurde. Direkte Interaktionen zwischen NK-Zellen und Hsp70 sind in der Literatur beschrieben **[188-190]**, wodurch die Proliferation dieser Zellen ausgelöst werden könnte. In zukünftigen Experimenten wird geklärt werden, welche Subpopulation der NK-Zellen **[191]** durch rhuHsp70 aktiviert wird.

Konsistent in allen Versuchen war die Beobachtung, dass durch Einsatz von rhuHsp70:Peptid im Vergleich zum Peptid allein, der Anteil an CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T-Zellen erheblich zunahm. Bis dato wurde diese Zunahme beim Priming mit rhuHsp70:Peptid-Komplexen nicht beschrieben. Die detailliertere Analyse ergab, dass innerhalb der CD4<sup>+</sup> T-Zellen durch die Stimulation mit rhuHsp70:Peptid gepulsten DCs im Vergleich zur Stimulation mit Peptid gepulsten DCs der Anteil an FOXP3<sup>+</sup> T-Zellen erhöht wurde. Die Ursache für die Zunahme der CD4<sup>+</sup> T-Zellen sowie deren Spezifität werden derzeit in der Arbeitsgruppe untersucht.

Eine mögliche Erklärung, warum der Anteil an CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T-Zellen durch die Aktivierung mit rhuHsp70:Peptid gepulsten DCs zunimmt, ist wie folgt: Die DCs präsentieren nach Aufnahme und Prozessierung Epitope aus dem rhuHsp70 über MHC-Klasse-II den CD4<sup>+</sup> T-Zellen, worauf diese proliferieren. Ob die CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T-Zellen Sequenzen aus dem rhuHsp70 erkennen, wird derzeit untersucht. Ein erster Hinweis für diese Annahme ist jedoch, dass die Proliferation der CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T-Zellen nur erfolgte, wenn auch DCs anwesend waren. Wurden die mit dem rhuHsp70:Peptid gepulsten DCs vor der Zugabe zu den Monozyten depletierten PBL gewaschen, nahm der Anteil der CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T-Zellen ebenfalls zu. Wurden die Monozyten depletierten PBL nur mit rhuHsp70 ohne DCs inkubiert, wurde diese Proliferation nicht beobachtet. RhuHsp70 scheint die T-Zellen also nicht direkt zu stimulieren.

In der Literatur ist die Existenz von Hsp-spezifischen T-Zellen beschrieben. Im speziellen Hsp60 und Hsp70 spezifische T-Zellen wurden sowohl in Assoziation mit chronischen Entzündungen als auch in gesunden Individuen gefunden **[192-194]**. Mehrere Studien zeigen, dass von Hsp70 abstammende Peptide einen relativ großen Anteil der Peptide ausmachen, die von den MHC-Klasse-II Molekülen eluiert wurden **[195,196]**. Weiterhin wurde beobachtet, dass gestresste APCs von CD4<sup>+</sup> T-Zellen erkannt werden, die spezifisch für eine hoch konservierte Sequenz des mykobakteriellen Hsp60 sind. In einem Tiermodell konnte durch Transfer dieser CD4<sup>+</sup> T-Zellen ein wirksamer Schutz gegen induzierte Arthritis erreicht werden **[197]**. Diese CD4<sup>+</sup> T-Zellen produzierten IFN- $\gamma$ , IL-4 und IL-10. Die Existenz von CD4<sup>+</sup> T-Zellen, die Epitope aus eigenem Hsp erkennen und unter bestimmten Bedingungen regulatorische Funktionen ausüben, ist beschrieben **[198]**. Hierbei ist zu diskutieren, warum die Hsp70-spezifischen CD4<sup>+</sup> T-Zellen nicht

depletiert wurden. Ein denkbarer Grund ist, dass die Präsentation von Hsp70 abstammenden Peptide auf MHC-Klasse-II unter normalen gesunden Bedingungen nicht auftritt, da MHC-Klasse-II in der Regel Peptide von exogenen Proteinen präsentieren und Hsp70 ein intrazelluläres Protein ist. Somit ist eine Depletion Hsp70-spezifische CD4<sup>+</sup> T-Zellen unter Normalbedingungen möglicherweise nicht erforderlich. Darüber hinaus wird diskutiert, ob die Hsp Erkennung ein wichtiges Element vieler Immunantworten ist, das zur Regulierung der Immunreaktion führt [192].

Ob die im Priming induzierten CD4<sup>+</sup> T-Zellen regulatorische Funktionen haben, lässt sich nicht ohne weiteres aus den Daten dieser Arbeit ableiten. Das klassische phänotypische Merkmal von suppressorischen oder regulatorischen T-Zellen ist die hohe Expression von CD25 und die Expression von FOXP3 [199-203]. Die CD4<sup>+</sup>CD25<sup>++</sup>FOXP3<sup>+</sup> T-Zellen können die Aktivierung anderer T-Zellen unterdrücken. Die Bedeutung dieser T-Zellpopulation als Suppressoren im Immunsystem zeigt sich darüber, dass Mutationen in FOXP3 zu fatalen Autoimmunerkrankungen mit starker Lymphozytenproliferation führen [204-206]. Allerdings ist im humanem System die transiente Expression von FOXP3 auch für aktivierte nicht-regulatorische T-Zellen beschrieben. Sie korreliert in dem Fall nicht mit suppressorischen Eigenschaften der T-Zellen [207]. Demnach kann im humanem System nicht aus der FOXP3 Expression allein auf regulatorische T-Zellen geschlossen werden. Die in dieser Arbeit mittels FACS Analyse beobachtete Zunahme der CD4<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup> T-Zellen beim Priming mit rhuHsp70:Peptid gepulsten DCs darf somit nicht als Erhöhung der Anzahl an regulatorischen T-Zellen interpretiert werden. Möglicherweise sind die CD4<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup> T-Zellen, Zellen, die durch Erkennung des Antigens (Hsp70 oder Peptidantigen) aktiviert wurden und in Folge dessen transient deren FOXP3 Expression erhöht wurde. Es wurde beim Priming mit rhuHsp70:Peptide gegenüber dem Priming mit Peptid ohne rhuHsp70 keine konsistente Zunahme der CD4<sup>+</sup>CD25<sup>++</sup>FOXP3<sup>+</sup> T-Zellen beobachtet. Ob die nach dem Priming erhaltenen CD4<sup>+</sup>CD25<sup>++</sup>FOXP3<sup>+</sup> T-Zellen tatsächlich regulatorisch sind, muss durch Nachweis ihrer suppressorischen Funktionen bei der Aktivierung anderer T-Zellen bewiesen werden.

Zusammenfassend wurde gezeigt, dass das Priming mit rhuHsp70:Peptid Komplexen gegenüber dem Priming mit Peptid allein nicht zu mehr Antigen-spezifischen T-Zellen führt. Allerdings hatten die mit den rhuHsp70:Peptid Komplex geprimten Zellen eine bessere Antigen-spezifität. Darüber hinaus zeigen die Ergebnisse dieser Dissertation, dass die Zusammensetzung der geprimten Zellen sich deutlich unterscheidet, wenn das Peptid im Komplex mit rhuHsp70 eingesetzt wird. Es wurde eine Zunahme der CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T-Zellen in allen Versuchen beobachtet.

### 3.5. Bewertung des rhuHsp70 für den Einsatz in der Therapie und Perspektiven

Durch die Bindung von Peptiden an rhuHsp70 wird die Effizienz der Kreuzpräsentation dieser Peptide signifikant verbessert. RhuHsp70 hat dabei selbst keine Signalfunktionen auf die humanen DCs. Für die Steigerung der Kreuzpräsentation ist demnach die Aktivierung der DCs nicht notwendig. Die fehlenden immun-stimulatorischen Eigenschaften des rhuHsp70 eröffnen vielfältige Einsatzmöglichkeiten des rhuHsp70 als *Transfervehicle* von Peptidantigenen. Als Formulierung für Peptidantigenen ist rhuHsp70 anderen Carriersystemen wie den Nanopartikeln und Liposomen [208,209] überlegen, da es keine toxischen Effekte hat und von den APCs ohne Probleme abgebaut werden kann. Darüber hinaus können die Peptide über hoch-affine Bindungssequenzen effizient mit rhuHsp70 komplexiert werden und chemische Modifikationen, die möglicherweise das Antigen nachteilig verändern, sind nicht nötig.

Viele Arbeiten diskutieren den Einsatz von Hsp70:Peptid Komplexen in der Tumorthherapie [142-144]. Wesentliche Grundlagen für diese therapeutische Eignung waren die Beobachtungen, dass Hsp70 sowohl die Fähigkeit zum Antigentransfer als auch zur Aktivierung der DCs besitzt. Da sich vor allem die Funktionen bei der innativen Aktivierung nicht bestätigen ließen, muss die Eignung von rhuHsp70 für den Einsatz bei einer Therapie neu bewertet werden. Positiv für den Einsatz der rhuHsp70:Peptid Komplexe als Tumorimpfstoff ist die Effizienzsteigerung der Kreuzpräsentation durch DCs und andere APCs und die erstmals mit dieser Arbeit gezeigte erhöhte Antigen-Spezifität der durch rhuHsp70:Peptid induzierten T-Zellen. Allerdings zeigte sich durch das Priming mit rhuHsp70:Peptid Komplexen gegenüber dem Priming mit Peptid allein keine prozentuale Zunahme an Antigen-spezifischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen, aber eine Zunahme der CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T-Zellen.

Bei dem Einsatz von rhuHsp70 muss bedacht werden, dass es wie andere exogene Proteine prozessiert und die daraus resultierenden Peptide über den MHC-Klasse-II Moleküle den CD4<sup>+</sup> T-Zellen präsentiert werden können. Beim Priming von naiven T-Zellen könnte dies eine Rolle spielen, da laut Literatur Hsp-spezifische CD4<sup>+</sup> T-Zellen existieren, die bestimmte regulatorische Funktionen besitzen. RhuHsp70 könnte demnach über adaptive Mechanismen, vermutlich über die Präsentation seiner Peptide im Komplex mit MHC-Klasse-II, bedeutend auf die finale Immunantwort Einfluss nehmen.

Die beschriebenen Funktionen der Hsp-spezifischen CD4<sup>+</sup> T-Zellen scheinen sich zunächst nicht mit den Zielen einer Tumorstimmung vereinbaren zu lassen [210]. Die Literatur zeigt, dass diese CD4<sup>+</sup> T-Zellen vielmehr für die Therapie von Autoimmunerkrankungen geeignet sein könnten [211-215].

Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine deutliche Zunahme von CD4<sup>+</sup> T-Zellen beim Priming mit rhuHsp70:Peptid Komplexen gepulsten DCs beobachtet. Die Funktionen dieser Zellen werden derzeit untersucht. Sollten diese CD4<sup>+</sup> T-Zellen wie beschrieben Hsp70 spezifisch sein und regulatorische Funktionen aufweisen, stellt sich die Frage, ob diese Zellen nachteilig sind oder ob sie durch die Verhinderung einer überschießenden Immunreaktion nützliche therapeutische Effekte haben, wie zum Beispiel den Aufbau einer immunologischen Gedächtnisantwort zu unterstützen [216,217].

### 4. Zusammenfassung

Ziel dieser Dissertation war es, die Funktionen des rekombinanten humanen Hitzeschock-Protein 70 (rhuHsp70) in der durch dendritischen Zellen (DCs) vermittelten innate und adaptiven Immunantwort zu untersuchen. Intrazellulär hat das Hitzeschock-Protein 70 vielfältige Funktionen unter anderem bei der Proteinfaltung und der Verhinderung von Aggregationen. Die Rolle des extrazellulären Hsp70 im Immunsystem ist Gegenstand der aktuellen Forschung. Aufgrund seiner verschiedenen beschriebenen Funktionen, die die innate Aktivierung von immunkompetenten Zellen, wie DCs, und die effiziente Präsentation von gebundenen Antigenen umfassen, wurde ein bedeutendes therapeutisches Potential des rekombinanten oder aus Tumormaterial isolierten Hsp70 für die immun-basierte Tumorthherapie postuliert. Allerdings gibt es zu der Rolle von Hsp70 im Immunsystem widersprüchliche Daten. Mit dem Nachweis von Kontaminationen in dem für viele Studien verwendeten rekombinanten Hsp70, die auf die E.coli Kultur zurückgeführt wurden, wurden die Funktionen von Hsp70 angezweifelt. Welches therapeutisches Potential Hsp70 tatsächlich hat, war offen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde gezeigt, dass rhuHsp70 die Kreuzpräsentation von Peptidantigenen signifikant steigerte. Durch den Vergleich von gleichen Mengen Peptidantigenen, allein oder im Komplex mit rhuHsp70, wurde zum ersten Mal die Steigerung durch rhuHsp70 quantifiziert. Dabei zeigte rhuHsp70 selbst keine Signal-Funktion auf die DCs. RhuHsp70 induzierte keinen intrazellulären Einstrom von Calciumionen, induzierte nicht die phänotypische Maturierung, aktivierte nicht Zytokinsekretion und veränderte nicht die Makropinozytoseeigenschaften der DCs. Demnach hat rhuHsp70 keine dem einem Maturierungssignal vergleichbaren Eigenschaften. Die Ergebnisse dieser Arbeit verdeutlichen, dass die Reinheit des verwendeten rhuHsp70 entscheidend für die korrekte Schlussfolgerung und Interpretation der experimentellen Ergebnisse ist. Schon geringe Mengen an Kontaminationen wie Endotoxine haben stimulatorische Aktivität auf DCs, die fälschlicherweise dem rhuHsp70 zugeschrieben wird. Mit dieser Arbeit wurde erstmals nachgewiesen, dass die in den rhuHsp70 Präparationen in nanomolaren Konzentrationen enthaltenen freien Nukleotide und nicht rhuHsp70 selbst den intrazellulären Einstrom von Calciumionen in DCs induzieren. Bis dato wurden die Nukleotide nicht als Ursache für das mit Hsp70 induzierte Calciumsignal beachtet.

Mit der vorliegenden Arbeit wurde weiterhin gezeigt, dass die Funktion von rhuHsp70 in der Kreuzpräsentation nicht an eine innate Signalfunktion gebunden ist. Durch eine bisher nicht durchgeführte Verknüpfung von biochemischer Analyse der Substrat- rhuHsp70

Interaktionen und immunologischer Antigenpräsentation wurde als wichtige Voraussetzung für die Verbesserung der Kreuzpräsentation die Komplexbildung zwischen Peptid und rHuHsp70 nachgewiesen. Die gesteigerte Kreuzpräsentation korreliert direkt mit der biochemischen Komplexbildung. Dabei war die rHuHsp70 vermittelte Steigerung unabhängig von TAP, Sec61 und der Ansäuerung der endolysosomalen Kompartimente. Die Kreuzpräsentation von verschiedenen Peptiden mit unterschiedlichen Prozessierungsbedingungen wurde durch Bindung an rHuHsp70 verstärkt. Es wurde gezeigt, dass mehr Peptidantigen in den APCs vorhanden war, die mit rHuHsp70:Peptid inkubiert wurden, im Vergleich zu den APCs, die mit der gleichen Menge Peptid ohne rHuHsp70 inkubiert wurden.

Darüber hinaus wurde untersucht, ob die verbesserte Kreuzpräsentation der Peptidantigene durch rHuHsp70 auch zu einer Zunahme von Antigen-spezifischen T-Zellen unter Primingbedingungen führt. Dabei wurden beim Priming mit rHuHsp70:Peptid gepulsten DCs im Vergleich zu Peptid gepulsten DCs weniger oder gleich viel Antigen-spezifische IFN- $\gamma$  und Perforin sezernierenden Zellen erhalten. Bemerkenswert ist, dass die Zellen aus dem Primingansatz mit den rHuHsp70:Peptid gepulsten DCs eine deutlich bessere Antigen-spezifität als die Zellen aus dem Primingansatz mit Peptid gepulsten DCs aufwiesen. Die Quantifizierung der Zusammensetzung der geprimten Zellpopulation ergab, dass mit rHuHsp70:Peptid gepulsten im Vergleich zu Peptid gepulsten DCs weniger CD8<sup>+</sup> T-Zellen erhalten wurden. Konsistent wurde eine Zunahme der CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T-Zellen beobachtet. Innerhalb dieser CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T-Zellpopulation war der Anteil der FOXP3<sup>+</sup> T-Zellen in den Ansätzen mit rHuHsp70:Peptid gepulsten DCs erhöht, aber es wurde hierbei keine konsistente Zunahme der CD25<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup> Zellen beobachtet.

Ausgehend von den Ergebnissen dieser Arbeit ergeben sich neue interessante Fragen zu der Interaktion von rHuHsp70 mit dem Immunsystem. So ist zu klären, welche Funktionen die durch das Priming mit rHuHsp70:Peptid Komplex gepulsten DCs entstehenden CD4<sup>+</sup> T-Zellen ausüben. Wichtig ist auch, den Grund der besseren Antigen-spezifität der mit rHuHsp70:Peptid Komplex geprimten Zellen zu untersuchen.



## 5. Methoden

### 5.1. Proteinchemische Methoden

#### 5.1.1. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-Page)

Die mit SDS beladenen Proteine wurden in einer SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese nach Laemmli (1970) nach ihrer Größe aufgetrennt. SDS wird verwendet, um die Trennung der Proteine vom Ladungszustand unabhängig durchzuführen. SDS denaturiert die Proteine. Über die unpolaren Teile assoziiert SDS mit den Proteinen. Die Proteine erhalten alle viel negative Ladung. Die Wanderungsgeschwindigkeit hängt somit nur von der Größe der Proteine ab. Diese denaturierende Gelelektrophorese wird als SDS-Page bezeichnet. Dafür wurden Gele mit einer Dicke von 1 cm verwendet, die mit einem Sammelgel überschichtet waren. Die Zusammensetzung der Gele war wie folgt:

#### **Trenngel:**

10 %Gel

Wasser	11,9 ml
Acrylamidlösung, enthält 30 % Acrylamid	10,0 ml
1,5 M Tris(hydroxymethyl)aminomethan (TRIS) (pH 8,8)	7,5 ml
10 % Natriumdodecylsulfat (SDS)	0,3 ml
10 % Ammoniumperoxodisulfat	0,3 ml
1,2 Bis (dimethylamino)ethan (TEMED)	0,012 ml

#### **Sammelgel:**

5 % Gel

Wasser	6,8 ml
Acrylamidlösung, enthält 30 % Acrylamid	1,7 ml
1,5 M TRIS (pH 6,8)	1,25 ml
10 % SDS	0,1 ml
10 % Ammoniumsulfat	0,1 ml
TEMED	0,01 ml

Die Proteine wurden vor dem Auftragen auf das Gel denaturiert. Dazu wurden sie mit reduzierendem Gelladepuffer (Roti-Load 1, Roth) versetzt und bei 95 °C 5 min erhitzt. Der Elektrophoreselauf erfolgte mit dem angegebenen Elektrophoresepuffer mit 40 mA pro Gel. Als Standard wurde der Precision Plus Protein™ Standard (BioRad) genutzt.

Elektrophoresepuffer (10X):	TRIS	250 mM, pH 8,3
	Glycin	1,9 M
	SDS-Na	35 mM
	in Wasser	

### 5.1.2. Coomassie-Färbung von Proteingelen

Zur Detektion der Proteine (mehr als 0.3 µg/Bande) wurden die Gele für 2 h in die Coomassie Färbelösung gelegt. Diese Lösung färbt und fixiert die Proteine im Gel. Anschließend wurde mit der Entfärbelösung bis zum gewünschten Farbgrad entfärbt.

Färbelösung	0,25 % Coomassie Brilliant Blue R-250
	45 % Ethanol
	10 % Essigsäure
	in Wasser

Entfärbelösung	30 % Ethanol
	10 % Essigsäure
	in Wasser

### 5.1.3. Silberfärbung von Proteingelen

Zur Bestimmung der Reinheit wurden die Proteine mit der Silberfärbung [218] detektiert. Mit dieser Methode können Proteine bis zu einer Menge von 5 ng/ Bande nachgewiesen werden. Die Proteine wurden nach der elektrophoretischen Auftrennung zur Fixierung in einer Formaldehyd-haltigen Lösung für 10 min geschwenkt. Danach wurden die Proteingele für 1 min in Natriumthiosulfatlösung (0,8 mM) gelegt. Nachdem sie mit Wasser gewaschen worden waren, wurden sie 10 min in 0,1 % Silbernitratlösung gegeben. Nach einem weiteren Waschschrift wurden sie solange in Entwicklungslösung gegeben bis die

## Methoden

---

Banden angefärbt waren. Die Farbreaktion wurde mit 2,3 M Zitronensäurelösung (5 ml/100 ml Entwicklungslösung) gestoppt. Die Gele wurden gewaschen und in die Trocknungslösung für 1 h gegeben.

Fixierungslösung	40 % Methanol in Wasser
Natriumthiosulfatlösung	0,8 mM in Wasser
Silbernitratlösung	6 mM in Wasser
Entwicklungslösung	280 mM Natriumcarbonat 16 µM Natriumthiosulfat in Wasser
Trocknungslösung	10 % Ethanol 4 % Glycerol in Wasser

Zu der Fixierungslösung und der Entwicklungslösung wurde unmittelbar vor Gebrauch Formaldehyd (50 µl von einer 37 % Formaldehydlösung in 100 ml Lösung) gegeben.

### 5.1.4. Proteinbestimmung nach Bradford

Für die Proteinbestimmung nach Bradford (1976) wurde der saure Farbstoff Coomassie Brilliant Blue G-250 (Bio-Rad Protein Assay) verwendet. Durch die Bindung von Coomassie Brilliant Blue G-250 an basische und aromatische Aminosäurereste im Protein wird das Absorptionsmaximum von 465 nm (braun) zu 595 nm (blau) verschoben. Die verwendete Bio-Rad Lösung mit dem Farbstoff wurde 1:5 verdünnt. Zu 200 µl dieser Verdünnung wurde 4 µl Proteinlösung gegeben. Nach 15 min wurde die Extinktion bei 595 nm mit dem Spektralphotometer vermessen. Als Standard wurde BSA (Bio-Rad) verwendet.

### 5.1.5. Western Blot

Die Identität der Proteine wurde mit Western Blot und anschließender Detektion mit Antikörpern geprüft. Dazu wurden die elektrophoretisch aufgetrennten Proteine von dem SDS-Gel auf eine Polyvinylfluorid (PVDF)-Membran transferiert. Dies erfolgte bei einer Spannung von 70 mV in den angegebenen Geltransferpuffer.

Geltransferpuffer                    40 mM TRIS  
    190 mM Glycin  
    5 M Methanol  
    in Wasser

Nach dem Transfer wurde die Membran für mindestens 1 h in 5 % Milchpulver in TBS gegeben, um unspezifische Bindungsstellen zu blockieren. Danach wurden die Membranen mit der Antikörperlösung (mit 5 % Milchpulver in TBS) für 2 h inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit TBS Puffer mit 0,05 % Tween wurden die Membranen mit dem sekundären Peroxidase-konjugierten Antikörper (in 5 % Milchpulver in TBS) 1 h inkubiert. Danach wurden sie erneut gründlich gewaschen und mit dem ECL-System (Amersham Pharmacia) entwickelt. Die eingesetzten Substrate waren Luminol und H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Die bei der Peroxidase katalysierten Oxidation von Luminol entstehende Chemolumineszenz wurde durch Auflegen eines Photofilms und anschließender Entwicklung detektiert. Das Vorhandensein und die Position des Peroxidase-markierten Proteins auf der Membran waren somit bestimmt.

TBS (10X)                    100 mM TRIS, pH 7,4  
    1,5 M NaCL  
    in Wasser

Antikörper	Verdünnung
Ratte anti-human Hsp70 (eigene Herstellung)	1:100
Ratte anti-human Hsc70 (SPA-815 Stressgen)	1:2000
Peroxidase-konjugierte Maus anti-Ratte IgG (Immuno Research)	1:2000

## 5.2. Herstellung des rekombinanten humanen Hsp70

### 5.2.1. E.coli Kultur

Das Plasmid (Hsp70 in pMPM-A4) wurden von M.P.Mayer [219] erhalten. Der zu Verfügung gestellte Expressionsvektor enthielt eine Ampicillinresistenz und eine L-Arabinose regulierte Expressionskassette [219]. Die verwendeten E.coli Zellen WKG 191  $\Delta$  DnaK enthielten nicht das bakterielle Hsp70 (=DnaK). Sie wurden in LB-Medium mit Ampicillin (100  $\mu$ g/ml) bei 30 °C kultiviert. Zunächst wurden Zellen aus der E.coli Stock Präparation auf Ampicillin-haltige Agarplatten ausgestrichen. Nach 24 h Inkubation bei 30 °C wurde der ausgewählte Klon in Medium überführt und für weitere 24 h inkubiert. Aus dieser Kultur wurden Kulturen mit einer OD<sub>600</sub> von 0,1 angesetzt. Wenn die OD<sub>600</sub> von 0,5 erreicht war, wurde mit 0,1 % L-Arabinose die Induktion gestartet. Durch Bindung von Arabinose an den Arabinose induzierbaren Promotor wird das Gen für Hsp70 exprimiert. Nach 15 h wurden die Zellen geerntet. Die Kultur von 15 Liter ergab 50-70 g Zellpellet. Die Zellpellets wurden für die Proteinreinigung aufgeschlossen und nicht unmittelbar benötigte Mengen wurden bei -80 °C gelagert.

### 5.2.2. Aufschluss der E.coli Bakterien

30-40 g E.coli Zellpellets wurden in 200 ml Lysepuffer 1 mit 1 mM Phenylmethansulfonylfluorid (PMSF) und Protease Inhibitoren (*protease inhibitor cocktail complete EDTA free* (Roche), 1 Tablette/ 50 ml Puffer) resuspendiert. Zu dieser Suspension wurde der Lysepuffer 2 (10 % des gesamten Volumens) mit 0,4 mg/ml Lysozym und 1  $\mu$ g/ml DnaseI gemischt. Diese Mischung wurde bei RT für 15 min inkubiert. Danach wurden die Bakterien mit einem Ultraschallgerät aufgeschlossen (Branson Sonifier 250: 80 % Leistung, *large tip output* 4-5). Die Zellen wurden dabei mit Eis gekühlt. Alle nicht gelösten Bestandteile wurden nach dem Aufschluss durch Ultrazentrifugation entfernt (40.000 g, 4 °C, 45 min).

### 5.2.3. Fällung der wasserlöslichen Proteine

Die Proteine in dem durch die Ultrazentrifugation erhaltenen Überstand wurden durch Zugabe von Ammoniumsulfat (0,326 g/ml) gefällt. Die Fällung erfolgte in einem eisgekühlten Gefäß. Die ausgefällten Produkte wurden von der Lösung durch Zentrifugation (17.000 g, 15 min, 4 °C) abgetrennt und in Puffer A gelöst. Anschließend wurde gegen das 40fache Volumen von Puffer A dialysiert (12 h, 4 °C).

#### **5.2.4. Reinigung der Proteine durch Säulenchromatographie**

Alle Reinigungsschritte mittels Chromatographie wurden bei 4 °C durchgeführt. Für die Anionenaustauschchromatographie wurde das FPLC-System (Bio-RAD) genutzt.

##### **5.2.4.1. Anionenaustauschchromatographie**

Die Anionenaustauschchromatographie wurde mit der DEAE Sepharose *Fast Flow* (GE, Helathcare) durchgeführt. Als Austauscherguppe dient dabei das Diethylaminoethylanion. Bei der Ionenaustauschchromatographie erfolgt die Trennung der Proteine aufgrund ihrer unterschiedlichen Ladung. Dabei wird der pH-Wert so gewählt, dass das zu isolierende Protein an die Matrix bindet. Bei einem Anionenaustauscher soll der pH Wert oberhalb des isoelektrischen Punktes des Proteins liegen. Durch elektrostatische Wechselwirkungen wird das Protein an die Matrix gebunden. Nicht gebundene Proteine werden zunächst heraus gewaschen. Danach erfolgt die Elution des zu isolierenden Proteins durch Zugabe von Salzen, in diesem Fall KCL. Durch Zusatz der Ionen wird das Protein von der Matrix verdrängt. Durch Anwendung eines linearen KCL Gradienten werden Fraktionen mit Proteinen mit unterschiedlichen Ladungseigenschaften erhalten.

Die Equilibrierung der DEAE Sepharose Säule erfolgte mit 1xSäulenvolumen (SV) Puffer A, 1x SV Puffer B und abschließend mit 2x SV Puffer A. Der filtrierte Überstand aus der Dialyse wurde mit einer Fließgeschwindigkeit von 2 ml/min auf die Säule geladen. Danach wurde die Säule mit 2 SV Puffer A gewaschen. Die Elution erfolgte mit 2,25x SV Puffer A und graduell bis 50 % zugemischten Puffer B. Mit 1x SV Puffer B und abschließend 2x SV Puffer A wurde nachgewaschen. Nach dem Start der Gradienten-Elution wurden Fraktionen von 4 ml gesammelt. Die Proteine aus jeder zweiten Fraktion wurden mit SDS-Page elektrophoretisch getrennt und durch Coomassie Blue Färbung detektiert.

##### **5.2.4.2. Affinitätschromatographie**

Die Affinitätschromatographie erfolgte mit ATP-Agarose (Sigma). Hsp70 hat eine N-terminale ATP bindende Domäne und bindet darüber an die Matrix. Nicht ATP- bindende Proteine werden heraus gewaschen. Die ATP-Agarose (25 ml) wurde 2 h mit Wasser gequollen und anschließend mit 30 ml Puffer A, 2x 30 ml Puffer B und 3x 30 ml Puffer A equilibriert. Die ausgewählten Fraktionen aus der Trennung mittels DEAE Sepharose wurden mit der ATP-Agarose für 30 min bei 4 °C auf den Rotationsschüttler inkubiert. Die ATP-Agarose wurde in Säulen gegeben und intensiv gewaschen. Pro 10 ml Gel wurde mit 2x 10 ml Puffer A, 5x 10 ml Puffer B und min. 8x 10 ml Puffer A gewaschen. Als Elutionspuffer (9 ml pro 10 ml Gel) wurde Puffer A mit 10 mM ATP (pH 7,6) verwendet.

### 5.2.5. Aufkonzentrierung von Proteinen

Die Proteine wurden mit dem Vivaspin System (Vivascience) aufkonzentriert. Die hierbei verwendeten Membranen waren aus Polyethersulfon und hatten eine Molekulargewichtsausschlussgrenze von 30 kD. Die Polyethersulfonmembranen wurden gewählt, weil sie nur sehr geringe Mengen an extrahierbaren Substanzen (*Index Extractables*) aufweisen. Membranen aus den üblichen Cellulosederivaten können Produkte enthalten, die mit wässrigen Lösungen extrahiert werden können und in der Endotoxinbestimmung falsch positive Ergebnisse anzeigen.

### 5.2.6. Pufferaustausch

Die Proteine wurden 36-48 h gegen HKM-Puffer (mindestens 150 x Volumen der rhuHsp70 Präparation) dialysiert. Für die Dialyse wurden Slide-A-Lyzer<sup>R</sup> Kassetten mit einem MWCO (*molecular weight cut off*) von 10 kD verwendet. Es wurde mindestens dreimal der Puffer gewechselt. Der  $\beta$ -Mercaptoethanolgehalt wurde bei jedem Pufferwechsel reduziert (0,07 %, 0,035 %, 0 %). Anschließend wurde mit einer Sephadex G-25 Säule (PD10, GE Healthcare) der Präparationspuffer nochmals gegen HKM-Puffer ohne  $\beta$ -Mercaptoethanol ausgetauscht. Die Diafiltration erfolgte mit dem Vivaspin System.

### 5.2.7. Entfernung der Endotoxine

Für die Endotoxinentfernung wurden die Detoxi-Gele<sup>TM</sup> (Pierce) verwendet. Die Gele wurden wie vorgeschrieben mit 1 % Desoxycholat in Wasser regeneriert und, nachdem das Detergenz mit Wasser ausgewaschen wurde, mit HKM-Puffer equilibriert. Die Proteinpräparation wurde auf die Gele geladen und mindestens 1 h inkubiert. Die Eluation erfolgte mit HKM-Puffer in Fraktionen und der Proteingehalt der einzelnen Fraktionen wurde mit dem Bradford Assay bestimmt. Die Reinigung wurde wiederholt bis der Gehalt an Endotoxin nach der Limulus-Bestimmung unter 0,5 EU/mg Protein lag. Für eine Menge von 5 mg Protein wurde dafür mindestens 3x 10 ml Detoxi-Gel benötigt.

**5.2.8. Puffer für die Reinigung des rhuHsp70**

Alle Puffer wurden mit Aqua injectabilia (Braun) hergestellt.

**Puffer A**

Hepes/KOH pH7,6	25 mM
KCL	50 mM
MgCL <sub>2</sub> x 6 Wasser	5 mM
EDTA	1 mM
β-Mercaptoethanol	10 mM

**Puffer B**

Hepes/KOH pH7,6	25 mM
KCL	1 M
MgCL <sub>2</sub> x 6 Wasser	5 mM
EDTA	1 mM
β-Mercaptoethanol	10 mM

**Lysepuffer 1**

TRIS/HCL pH 7,6	50 mM
Sucrose	10%

**Lysepuffer 2**

Spermidin CL pH7,6	0,18 M
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1 M
EDTA	50 mM
DTT	50 mM

**HKM-Puffer**

HEPES/ KOH 7,6	25 mM
KCL	150 mM
MgCl <sub>2</sub>	5 mM



### 5.3. Biochemische Charakterisierung des rhuHsp70

#### 5.3.1. Bestimmung des Endotoxingehaltes

Der Gehalt an Endotoxin (LPS) wurde mit dem Limulus Test QCL (Cambrex) bestimmt. Der chromogene Limulus Amoebocyte Lysate (LAL) Test ist ein quantitativer Test für gramnegative bakterielle Endotoxine. Die Lysatlösung und Substratlösung wurde nach Anleitung hergestellt. Die zu untersuchenden Proteinpräparationen wurden mit LAL gemischt und bei  $37\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$  für 10 min inkubiert. Für weitere 6 min wurde die Substratlösung zugesetzt. Die Reaktion wurde mit 25 % Essigsäure abgestoppt. Das vorhandene Endotoxin katalysiert die Aktivierung der im Lysat enthaltenen Proenzyme. Diese aktivierten Proenzyme katalysieren die Abspaltung von p-Nitroanilin von dem farblosen Peptidsubstrat. Das freigesetzte p-Nitroanilin wurde photometrisch bei 405 nm vermessen. Als Endotoxin-Standard wurde LPS aus E.coli (0111:B4) verwendet. Die Endotoxin Units dieses Standards wurden relativ zu dem Referenz Standard Endotoxin bestimmt. Die Abhängigkeit der Absorption von der Endotoxinkonzentration wurde mit einer sigmoidalen Kurve beschrieben. Die Kurvenfunktion wurde mit einer 4-Parametergleichung dargestellt, mit der die Endotoxinkonzentrationen der Proben berechnet wurden. Die LPS-Konzentration wird als Endotoxin Units (EU) pro mg Protein angegeben. Diese Einheit beschreibt die biologische Aktivität von LPS. 1 EU wird in 100 pg LPS umgerechnet.

#### 5.3.2. Bestimmung der freien Nukleotide

Für die Bestimmung der freien Nukleotide wurde das Protein von der Stock-Präparation mit einer Membran mit einem *Cut off* von 30 kD abgetrennt. Die so erhaltene Lösung ohne rhuHsp70 wurde bei 259 nm mit dem Spektrophotometer vermessen und der Gehalt an Nukleotiden mit dem Lambert-Beerschen Gesetz und dem Extinktionskoeffizienten ( $\epsilon=15400\text{ mol/l}$ ) berechnet.

#### 5.3.3. Bestimmung der ATPase-Aktivität

Die ATPase Aktivität wurde nach dem Protokoll von Gässler et al. [155] bestimmt. RhuHsp70 wurde in HKM-Puffer vorgelegt und bei  $30\text{ °C}$  5 min vorinkubiert. Das Ansatzvolumen betrug 20  $\mu\text{l}$ . Die finale rhuHsp70 Konzentration war 1  $\mu\text{M}$ . Die Reaktion wurde durch Zugabe von 2  $\mu\text{l}$  ATP Premix mit 0,1  $\mu\text{Ci}$  [ $\alpha\text{-}^{32}\text{P}$ ]-ATP (GE-Healthcare) und 2,5 mM ATP gestartet. Nach 0, 10, 20, 40, 60, 90, 120 und 150 min wurden Proben gezogen und die enthaltenen Nukleotide durch Dünnschichtchromatographie getrennt. Hierfür wurden die Proben auf DC-Platten mit PEI Cellulose F (Merck) aufgetragen. Für

den Lauf wurde 400 mM LiCl in 10% Essigsäure verwendet. Nach dem Trocknen wurden die „Counts“ pro Spots mit dem Phosphoimager (Packard) quantifiziert. ADP läuft oberhalb von ATP. Nach Subtraktion des Hintergrundes der DC-Platte wurde das Verhältnis  $ATP/(ATP+ADP)$  gegen die Zeit aufgetragen. Die Steigung wurde mit einem linearen Kurven Fit (Software: Microsoft Excel) berechnet. Für die Auswertung wurde die Basalrate (Produkt aus dem Betrag der Steigung der Geraden und dem Verhältnis von ATP zu ATPase) berechnet [155].

### 5.3.4. Surface Plasmon Resonance Spectroscopy (BIAcore Messung)

Bei der *Surface Plasmon Resonance Spectroscopy* wird ein mit Gold, Silber oder Platin bedampfter Glaschip benutzt. Polarisiertes monochromatisches Licht induziert an der Grenze zwischen Glas und der Metallschicht elektromagnetische Oberflächenwellen (Plasmon). Diese Wellen stehen mit dem reflektierten Strahl in Resonanz. Das evanescente Feld, das durch den weiten Austritt der elektrischen Feldkomponenten entsteht, wird durch gebundene Moleküle verändert. Diese Veränderungen wirken sich auf den letztlich gemessenen Totalreflexionswinkel aus. Der Winkel ist direkt proportional zum Beladungsgrad der Metalloberfläche.

Die *Surface Plasmon Resonance Spectroscopy* erfolgte mit dem BIAcore X Gerät. Für die Messung wurden ein mit Streptavidin beschichteter Chip verwendet, der mit dem b-pep70-MART-1 Peptid (3,8  $\mu$ M in HKM Puffer) beladen wurde. Die resultierenden *resonance units* (RU) des immobilisierten Peptides betragen 500. Die Messung wurde bei 37 °C durchgeführt. Die Flussrate betrug 20  $\mu$ l/min. RhuHsp70 oder BSA (1-4  $\mu$ M in HKM Puffer) wurden über Chip geleitet. Der Chip wurde mit 0,5 % SDS regeneriert. Für die Datenanalyse wurde die lineare Abhängigkeit zwischen dem Anstieg der *resonance units* und der Menge des gebundenen Proteins genutzt. Die *resonance units* der Kontrollzelle des Chips, die nicht mit Peptid beladen wurde, wurden von denen der Messzelle mit Peptid abgezogen. Die Daten wurden mit den BIAevaluation 4.1 und Sigma Plot Software Programmen ausgewertet.

## 5.4. RhuHsp70:Peptide Komplexes für die Kreuzpräsentation

### 5.4.1. Bildung des rhuHsp70:Peptide Komplexes für die Kreuzpräsentation

RhuHsp70 in bestimmten Konzentrationen (0,21-7  $\mu\text{M}$ ) wurde in 96-Well Platten mit b-pep70-MART1 Peptid (490 nM) oder b-pep70-Tyr Peptid (70  $\mu\text{M}$ ) in 30  $\mu\text{l}$  HKM Puffer bei RT für mindestens 2 h (in der Regel 4 h) inkubiert. Zu bestimmten Ansätzen wurden weitere Substanzen (4,2  $\mu\text{M}$   $\gamma$ -ATP oder verschiedene Konzentrationen von ADP) gegeben. Durch den Zusatz der DCs und T-Zellen für die Kreuzpräsentation wurde das Gesamtvolumen auf 210  $\mu\text{l}$  erhöht und die Proteine und Peptide 1:7 verdünnt. Alle für die Kreuzpräsentationsversuche angegebenen Konzentrationen sind finale Konzentrationen.

### 5.4.2. Berechnung des Peptidanteiles in Komplex mit rhuHsp70

Der  $K_d$  –Werte wurden durch Fluoreszenztitration (Kooperation Prof. Buchner, Dr. Maya. J. Pandya, Lehrstuhl für Biotechnologie, TUM, Garching) bestimmt. Für b-pep70-MART-1 wurde ein  $K_d$  –Werte von  $0,093 \pm 0,002$  bestimmt. Der Anteil des Peptides in Komplex mit rhuHsp70 bevor die Zellen für die Kreuzpräsentation zugesetzt wurden, wurde mit der Quadratischen Bindungsgleichung berechnet:

$$\alpha = \frac{P_0 + L_0 + K_d - \sqrt{(P_0 + L_0 + K_d)^2 - 4P_0 \cdot L_0}}{2P_0}$$

$P_0$  ist die Konzentration des Peptides (b-pep70-MART-1),  $L_0$  ist die Konzentration des rhuHsp70 und  $K_d$  ist die Dissoziationskonstante.

## **5.5. Zellbiologische Methoden**

### **5.5.1. Allgemeine Bemerkungen**

Die Zellkultivierung erfolgte bei einer Temperatur von 37 °C und einem CO<sub>2</sub>-Gehalt von 5 %. Alle Arbeiten mit vitalen Zellen wurden unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Adhärent wachsende Zellen wurden zu Passagieren mit Trypsin/EDTA abgelöst.

### **5.5.2. Bestimmung der Zellzahl**

Die Zellzahl wurde mit der Neubauer Zählkammer bestimmt. Zur Unterscheidung von toten und lebendigen Zellen, wurden diese mit Trypanblau in dem geeigneten Verhältnis verdünnt. Lebendig sind die nicht blau angefärbten Zellen. Die Zellzahl ergibt sich aus folgender Gleichung:

Zellzahl/ml= mittlere Zellzahl pro Großquadrat x Verdünnungsfaktor x 10<sup>4</sup>

### **5.5.3. Einfrieren von Zellen**

Für die Lagerung der Zellen in flüssigen Stickstoff muss das Medium einen Gefrierschutz enthalten, der die Bildung großer Eiskristalle verhindert. Zum Einfrieren wurden die Zellen in Medium mit 50 % Fötale Kälberserum (FCS) oder Humanserum (HS) und 10 % Dimethylsulfoxid (DMSO) aufgenommen. Die Arbeiten erfolgten auf Eis, da DMSO für die Zellen toxisch ist. Je 1 ml der Zellsuspension wurde in Einfriereröhrchen gegeben, die mit Zellstoff isoliert und bei -80 °C eingefroren wurden. Nach 12 h wurden die Zellen in flüssigen Stickstoff überführt, worin sie gelagert wurden.

### **5.5.4. Auftauen von Zellen**

Die gefrorenen Zellen wurde bei 37 °C angetaut und durch Zugabe von 5 ml Humanserum oder 5 ml FCS vollständig aufgetaut, sofort abzentrifugiert und wieder in den entsprechenden Kultivierungsmedium aufgenommen.

### **5.5.5. Gewinnung von Monozyten aus Vollblut**

#### **5.5.5.1. Gewinnung von Monozyten aus Vollblut durch positive Isolierung**

Das mit Heparin versetzte Blut (1000 I.E. /50 ml Blut) wurde mit AIM-V-Medium 1:1 verdünnt und über Ficoll (Pancoll) geschichtet. AIM-V Medium ist ein serumfreies Medium, das speziell für Lymphocyten entwickelt wurde. Serumfreies Medium wurde gewählt, um eine mögliche Aktivierung durch Kontaminationen in FCS oder HS zu vermeiden. Nach Zentrifugation bei 2000 rpm (840 g) für 20 min (ohne Abbremsen) wurden die peripheren Blutlymphocyten (PBL) geerntet, mit AIM-V Medium gewaschen

und in eiskaltem Isolationspuffer (PBS mit 0,5 % HS und 2 mM EDTA) aufgenommen. Zellaggregate wurden mit dem Cell Strainer (100  $\mu$ M, Falcon) entfernt. Zu je  $1 \times 10^7$  Zellen wurden 15  $\mu$ l der CD14-Mikro-Bead Lösung (MACS, Miltenyi) zugesetzt. Die Mikrobeads sind mit monoklonalen Maus anti-humanen CD14-Antikörper konjugiert. Nach 15 min Inkubation bei 4 °C wurden die Zellen mit dem Isolationspuffer gewaschen und auf die magnetischen Säulen (MACS 25 LS *Separation Columns*, Miltenyi) geladen. Im Magnetfeld werden die Säulen mit 3x5 ml Isolationspuffer gewaschen. Nach Entfernung des Magnetfeldes werden die CD14 positiven Zellen mit Isolationspuffer von den Säulen eluiert, abzentrifugiert und in AIM-V Medium aufgenommen. Die so isolierten Monozyten hatten eine Reinheit von über 90 %.

### **5.5.5.2. Gewinnung von Monozyten aus Vollblut durch negative Isolierung**

Zur Entfernung der Blutplättchen wurde das mit AIM-V Medium 1:1 verdünnte Blut bei 160 g für 20 min ohne Bremse zentrifugiert. Der plättchenhaltige Überstand wurde entfernt. Die PBL wurden wie beschrieben durch Dichtegradientenzentrifugation (Ficoll) gewonnen. Die PBL wurden in Puffer (PBS mit 0,1 % HS) aufgenommen ( $5 \times 10^7$  Zellen/ml). Die Isolierung wurde mit dem „*Monocyte Negative Isolation Kit*“ von Dynal Biotech durchgeführt. Mit diesem Kit werden T-, B-, NK-Zellen und Granulozyten über Antikörper an magnetische Beads gekoppelt, die anschließend mit einem Magneten entfernt werden. Der Anleitung zufolge wurden zu den PBL die *Blocking Reagent*-Lösung und der Antikörper Mix zugesetzt. Der Antikörper Mix enthält Maus monoklonale Antikörper gegen humanes CD2, CD7, CD16, CD19, CD56 und CD235a. Die Blockierung der Fc-Rezeptoren auf den Monozyten erfolgte mit Gammaglobulin. Nach 10 min Inkubation mit beiden Lösungen bei 4 °C wurden die PBL gewaschen. Zu  $1 \times 10^7$  Zellen wurde 100  $\mu$ l der *Depletion- Dynabeads*-Suspension (Dynal Biotech) gegeben. Zur Bindung dieser Beads an die Antikörper besetzten Zellen wurde die Mischung 15 min bei 4 °C auf dem Rollershaker inkubiert. Anschließend wurde das Röhrchen mit dem Ansatz in den Magneten (Dynal) gestellt. Die mit den magnetischen Dynal-Beads beladenen Zellen wurden an den Magneten gezogen und der Überstand wurde abgenommen. Dieser Vorgang wurde zur gründlichen Entfernung der Bead-gekoppelten Zellen zweimal wiederholt. Die Reinheit der negativ isolierten Monozyten lag zwischen 60-80 %.

### 5.5.6. Generierung der dendritischen Zellen

Die CD14 positiven Zellen aus den Isolierungen wurden in AIM-V Medium aufgenommen und in 6-Well Platten (Nunc) ausgesät. Dabei wurden  $5 \times 10^6$  Zellen in 4 ml pro Well gegeben. Am Tag 0, 3 und 6 wurden 400 U/ml rhIL-4 (Cell Genix) und 800 U/ml rhuGM-CSF (Leukine, Berlex) zugesetzt. Diese IL-4/GM-CSF generierten DCs wurden zwischen Tag 6-9 für die Versuche verwendet. Die Expression der Oberflächenmarker CD209, CD 11c, CD80, CD86, CD83, CD40, CD32 und CD14 von jeder Zellcharge wurde mit FACS analysiert.

### 5.5.7. Maturierung der dendritischen Zellen

Zu den dendritischen Zellen wurde am Tag 6 der Maturierungscocktail nach Junleit [163] zugesetzt. Am Tag 8 wurden die maturierten DCs im FACS analysiert und in die Versuche eingesetzt.

Maturierungscocktail:

Zytokine	Konzentration
rhIL-4 (Cell Genix)	400 U/ml
rhuGM-CSF (Leukine, Berlex)	800 U/ml
rhuTNF $\alpha$ (R&D Systems)	500 U/ml
rhIL-1 $\beta$ (R&D Systems)	20 ng/ml
rhIL-6 (R&D Systems)	1000 U/ml
PGE <sub>2</sub> (Sigma Aldrich)	10 $\mu$ M

### 5.5.8. Kultivierung der zytotoxischen T-Zellen MART A42 und TyrF8

Der HLA-A\*0201 restrinkierte Tyrosinasepeptide tyr368-376 (YMNGTMSQV) spezifische zytotoxische T -Zell Klon TyrF8 [220] wurde von Dr. P. Schrier (Dept.of Clinical Oncology, Leiden University Hospital, NL) erhalten. Der HLA-A2 restrinkierte Melan-A/MART-1 Peptid (ELAGIGLTV) spezifische zytotoxische T-Zell Klon A42 [221,222] wurde von M.C. Panelli (National Institute of Health, Bethesda, Maryland, USA) zu Verfügung gestellt. TyrF8 und A42 T-Zellen wurden in 24-Well Platten mit RPMI1640 Medium mit 2 mM L-Glutamin, 1 mM Natriumpyruvat und 1 % MEM nicht- essentielle Aminosäuren, 7,5 % Hitze inaktiviertes FCS (1 h bei 57 °C) und 7,5 % Hitze inaktiviertes Humanserum kultiviert. Das Medium enthielt 50 U/ml für die TyrF8 Zellen und 200 U/ml für A42 Zellen von rhIL-2 (Proleukine, Cetus). Aller zwei Wochen wurden die TyrF8 und A42 T-Zellen mit bestrahlten (10.000 rad) IL-2 sekretierenden HLA-A\*0201 positiven Tyrosinase- und Melan-A/MART-1-positiven Melanomzellen, bestrahlten (5000 rad) gepoolten allogenen PBL und bestrahlten (15.000 rad) EBV transformierten B-LCL stimuliert. Jeden dritten Tag

wurde die Hälfte des Mediums gegen frisches Medium mit den entsprechenden Konzentrationen an rhuIL-2 ersetzt. Konfluente Zellen wurden 1:2 gesplittet. Die A42 Zellen wurden am Tag 6 in T25 Kulturflaschen mit 10 ml Medium überführt. TyrF8 und A42 T-Zellen wurden zwischen Tag 7-10 für die Versuche verwendet.

### 5.5.9. Herstellung CCR5 positiver Monozyten

Die Monozyten wurden durch Plattenadhärenz gewonnen. Dazu wurden PBL, die durch die Dichtezentrifugation (Ficoll) aus Vollblut isoliert wurden in 6-Well Platten (Falcon) gegeben.  $20 \times 10^6$  PBL wurden in 5 ml AIM-V Medium pro Well gegeben und im Brutschrank inkubiert. Nach 2 h wurden alle nicht adhärennten Zellen durch fünfmaliges Waschen mit je 3 ml AIM-V entfernt. Anschließend wurden in jedes Well je 3 ml AIM-V Medium mit 800 U/ml GM-CSF gegeben. Nach 12 h Inkubation im Brutschrank wurden die Monozyten für die Tests eingesetzt.

### 5.5.10. Kultivierung der B-Zelllinien

Die humane B-lymphoiden Zelllinie (B-LCL), L721.45 (positiv für *transporter associated with antigen presentation*, TAP) und L721.174 (negativ für TAP) [223] wurden in RPMI1640 mit 2 mM L-Glutamin, 1 mM Natriumpyruvat und 1 % MEM nicht-essentielle Aminosäuren und 10% Hitze inaktiviertes FCS kultiviert. Die Zellen wurden alle 4-6 Tage 1:2 gesplittet.

### 5.5.11. Kultivierung der Tumorzelllinien

Die Tumorzelllinien A375 und Mel 93.04A12 wurden in RPMI1640 mit 2 mM L-Glutamin, 1 mM Natriumpyruvat und 1 % MEM nicht-essentielle Aminosäuren und 10 % Hitze inaktiviertes FCS kultiviert. Die Zellen wurden alle 4-6 Tage 1:2 oder 1:4 gesplittet.

## 5.6. Analytische Methoden der zellbiologischen Versuche

### 5.6.1. Quantifizierung der Zytokine nach Stimulation der DCs

Die DCs wurden für 48 h mit rhuHsp70 (0,3  $\mu$ M, 1  $\mu$ M oder 3  $\mu$ M), LPS (1  $\mu$ g/ml) oder ohne Stimulation im Brutschrank inkubiert. Die Zytokine im Überstand wurden mit dem *Bio-Plex Cytokine Assay* oder Elisa bestimmt. Mit dem *Bio-Plex Cytokine Assay* können gleichzeitig verschiedene Zytokine in den Zellkulturüberständen quantifiziert werden. Bei diesem Test werden die Zytokine von Antikörpern gebunden, die wiederum an Kügelchen gebunden sind. Die Kügelchen der verschiedenen Antikörper sind mit jeweils verschiedenen Verhältnissen von roten und grünen Fluoreszenzfarbstoff gefärbt und können so von einer Photozelle im Messgerät unterschieden werden. Das zu

bestimmende Zytokin wird über den Antikörper an des jeweilige Kügelchen gebunden. Über eine anderes Epitop bindet der Biotin-markierte Detektionsantikörper an das Zytokin. Die Menge des gebundenen Zytokins kann dann durch Bindung von fluoreszenzmarkierten Avidin (PE) photometrisch bestimmt werden. Die Auswertung erfolgt mit dem Bio-Plex Manager™ Software Programm für die Bio-Plex Daten.

Mit dem Elisa kann jeweils nur ein Zytokin bestimmt werden. Hierfür werden 96-well Platten (Corning Costar) mit dem Antikörper, der das zu untersuchende Zytokin bindet, beschichtet. Der Biotin-markierte Detektionsantikörper bindet an ein anderes Epitop des Zytokines. Die Detektion erfolgt durch Bindung von *Horseradish-Peroxidase* (HRP)-Streptavidin an den Detektionsantikörper. Die HR-Peroxidase oxidiert das zugesetzte Substrat TMB/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Das entstandene Produkt hat eine blaue Farbe. Die Reaktion wird durch Zusatz von 1 M Phosphorsäure abgestoppt. Es entsteht ein stabiler gelber Komplex, der bei einer Wellenlänge von 450 nm mit dem Photometer quantifiziert wird. Durch die Erstellung einer Standardkurve für jede Platte wird die absolute Menge des Zytokins bestimmt. Die Elisa Daten wurden mit dem Sigma Plot Programm ausgewertet. Die Abhängigkeit der Zytokinkonzentrationen von den photometrisch bestimmten OD-Werten wurde mit einer sigmoidalen Kurve beschrieben. Diese Kurve wurde mit der 5-Parameter Gleichung beschrieben.

### **5.6.2. Durchflusszytometrie**

#### **5.6.2.1. Allgemeines**

Mit der Durchflusszytometrie am *fluorescence activated cell scanner* (FACS) kann die Expression bestimmter Moleküle analysiert werden. Die Moleküle werden durch die Bindung von spezifischen Fluoreszenz-markierten Antikörpern detektiert. Für die Messung wurde der FACS Calibur oder der LSR II (beide Becton Dickinson) verwendet. Diese Geräte können mit Lasern (488 nm Argon, 633 nm He/Ne im FACSCalibur oder 466 nm Saphir, 633 nm, 405 nm und UV Laser (alle Feststoff) im LSR II) den an den Antikörper gebundenen Farbstoffe anregen. Die unterschiedlichen verwendeten Farbstoffe emittieren nach Anregung Licht verschiedener Wellenlänge, das von den Photozellen der Geräte erfasst wird. Mit dieser Methode kann eine relative Quantifizierung verschiedener Moleküle, die von einer Zelle exprimiert werden, erfolgen. Für jede Zelle wird außerdem das Vorwärtsstreulicht (*forward scatter*, FSC) und das Seitwärtsstreulicht (*side scatter*, SSC) gemessen. Aus diesen Parametern lassen sich Größe und Granularität der Zellen beurteilen und somit die zu untersuchende Zellpopulation von den Zelltrümmern abtrennen.



Die Daten wurden mit der Cell Quest Software (FACSCalibur) oder mit der DIVA Software (LSRII) ausgewertet.

#### **5.6.2.2. Färbung der Moleküle auf der Zelloberfläche**

Für die Analyse der Expression der Oberflächenmarker wurden pro Ansatz  $0,1 \times 10^6$  Zellen in 50  $\mu$ l FACS-Puffer (2 % HS in PBS) aufgenommen. Nach Zugabe der spezifischen Antikörper (Tabelle) wurden diese Ansätze im Dunklen 30 min auf Eis inkubiert. Danach wurden die Zellen gewaschen in FACS-Puffer aufgenommen und sofort mit dem FACS gemessen. Zellen die nicht sofort vermessen werden konnten, wurden mit 1 % Paraformaldehyd in PBS fixiert.

#### **5.6.2.3. Indirekte Färbung der MHC-Klasse I Oberflächenmoleküle**

Zur Analyse der HLA-A2 Expression wurden die DCs zunächst wie unter 5.6.2.2 beschrieben mit dem erstem Antikörper MA 2.1 inkubiert. Danach wurden die Zellen gewaschen und für weitere 30 min mit FITC markierten Kaninchen anti Maus Immunglobulin (1:25 ) inkubiert. Anschließend wurden die Zellen wie beschrieben behandelt. Zur Einstellung der Negativkontrolle wurde ein entsprechender Ansatz nur mit dem zweiten Antikörper gefärbt.

#### **5.6.2.4. Indirekte Färbung der CCR7 Oberflächenmoleküle**

Die DCs wurden wie unter 5.6.2.2 beschrieben mit dem ersten Antikörper Maus anti-human CCR7 inkubiert und anschließend gewaschen. Danach erfolgte eine Inkubation mit einem biotinylierten anti Maus IgM für weitere 30 min auf Eis. Nach einem weiteren Waschschrift wurde PE markiertes Streptavidin zugesetzt und wieder für 30 min auf Eis im Dunklen inkubiert. Anschließend wurden die Zellen gewaschen. Als Negativkontrolle diente der entsprechenden Ansatz, der mit dem biotinylierten Maus IgM und dem PE markierten Streptavidin gefärbt wurde.

#### **5.6.2.5. Intrazelluläre Färbung von FOXP3**

Für die intrazelluläre Färbung wurde das *Intracellular staining buffer set* von eBiosciences verwendet. Alle hierfür verwendeten Antikörper waren direkt markiert. Nach der Oberflächenfärbung wurden die Zellen nach Anleitung fixiert ( $0,4 \times 10^6$  Zellen in 0,5 ml Fix-Puffer 30 min bei 4 °C im Dunklen). Nach einem Waschschrift mit PBS wurden die Zellen mit der Permeabilisationspuffer ( $0,4 \times 10^6$  Zellen in 0,5 ml pro Ansatz) für 15 min bei 4 °C inkubiert. Ohne weiteres Waschen wurde dann pro Ansatz 10  $\mu$ l anti-human FOXP3 oder 1  $\mu$ l der Isotypkontrolle für 40 min zugegeben. Die Zellen wurden anschließend zweimal mit dem Permeabilisationspuffer gewaschen, in PBS aufgenommen und umgehend mit

dem FACS gemessen.

#### **5.6.2.6. Markierung der toten Zellen**

Die Zellen wurden für bestimmte Messungen nach der Oberflächenfärbung mit 7-Aminoactinomycin D (7-AAD) (10 µg/ml) für 30 min auf Eis im Dunklen inkubiert. Nicht gebundenes 7-AAD wurde durch Waschen entfernt. 7-AAD ist eine DNA interkalierende Substanz, die in die toten Zellen gelangen kann. Das nach Anregung mit dem Argon-Laser emittierte Licht wird bei 648 nm gemessen. Die für diese Fluoreszenz positiven Zellen sind somit tot und können aus der Analyse ausgeschlossen werden.

#### **5.6.2.7. Analyse der intrazellulären Menge des b-pep70-Tyr Peptides**

Die IL-4/GM-CSF generierten DCs oder die L721.45 Zellen wurden zu 10 µM b-pep70-Tyr Peptide oder 10 µM b-pep70-Tyr Peptide, das mit 2,7 µM rhuHsp70 bei RT für 12 h inkubiert wurde, gegeben. Für jede Probe gab es zwei identische Ansätze. Nach 120 min (L721.45) oder nach 60 min (DC) wurden die Zellen mit Puffer (PBS mit 0,1 % NaN<sub>3</sub> und 3 % FCS) gewaschen. Für die Analyse der an der Zelloberfläche gebundenen Peptide wurden die Zellen des einen Ansatzes in azidhaltigem Puffer mit Streptavidin-FITC (1:50) für 20 min auf Eis im Dunklen inkubiert. Die Zellen wurden intensiv gewaschen und wie die Zellen für die intrazelluläre Färbung fixiert und permeabilisiert (Methode unter 5.6.2.5). Zu diesen Zellen wurde nicht erneut Streptavidin-FITC zugesetzt wurde. Die Zellen des anderen Ansatzes wurden erst nach Fixierung und Permeabilisation mit Streptavidin-FITC (1:50) gefärbt.

#### **5.6.2.8. Intrazelluläre Calcium Analyse**

Die Analyse der intrazellulären Calciumionenmobilisierung wurde nach dem modifizierten Protokoll nach Grundler et. al. durchgeführt [224]. Die Messung der intrazellulären Calciumionen beruht auf der Bestimmung die Verschiebung der Emission von 530 nm zu 405 nm durch Bindung von Calciumionen an den mit Lasern angeregt Farbstoff Indo-1 AM, mit dem die Zellen zuvor beladen wurden. Die Detektion der Emissionen erfolgt mit Photozellen.

Frisch isolierte Monozyten, IL-4/GM-CSF generierte DCs (Tag 6-8), maturaire DCs, B-Zellen, TyrF8 oder A42 (1x10<sup>6</sup> Zellen in 1 ml AIM-V Medium) wurden mit dem Calcium Indikator Indo-1 AM (5 µg/1x10<sup>6</sup> Zellen) bei 37 °C im Brutschrank für 30 min inkubiert. Indo-1 AM wurde in DMSO mit 10 % nicht-ionischem Detergenz (Pluronic F-127; 2 mg/ml) gelöst. Die gefärbten Zellen wurden gewaschen und in AIM-V Medium resuspendiert (1x10<sup>6</sup> Zellen/1,5 ml). Mögliche Zell-Aggregate wurden vorher mit einem Cell Strainer

(Porengröße: 100  $\mu\text{M}$ ) entfernt. Der Calcium Influx wurde mit dem MoFlo Gerät (Anregung mit Argon Laser (365 nm)) und der Software Summit von Dako gemessen. Für die Bestimmung des Hintergrundes wurden die Zellen zunächst 1 min ohne Stimulation gemessen. Danach wurden verschiedene Konzentrationen von rhuHsp70, ADP, ATP, LPS, BSA oder Ionomycin zugegeben und für weitere 6 min gemessen. Für die Inhibition wurden die DCs 5 min mit 250  $\mu\text{M}$  Suramin vorinkubiert. Die violette (405nm) vs. die grüne (530 nm) Fluoreszenz wurde aufgenommen. Durch Bindung von Calciumionen an Indo-1 AM verschiebt sich die Emission von 530 nm zu 405 nm. Das Verhältnis 405/530 nm ist der Menge an intrazellulären Calciumionen proportional. Für die Auswertung wurden die Einzelzellereignisse, die durch die Auswahl im FSC/SSC Dot Plot und anhand der Puls Weite des FSC Signals bestimmt wurden, genommen. Die Auswertung erfolgte mit der Summit Software und Sigma Plot.

### **5.6.2.9. Untersuchung der Makropinozytose der DCs**

DCs ( $2 \times 10^6$  Zellen in 5 ml AIM-V Medium) wurden mit 300 nM, rhuHsp70, 250  $\mu\text{M}$  ADP, 1  $\mu\text{g/ml}$  LPS oder ohne Stimulus für 24 h im Brutschrank inkubiert. Danach wurden die DCs gewaschen, in AIM-V Medium aufgenommen ( $0,3 \times 10^6$  Zellen in 0,6 ml AIM-V Medium) und zusammen mit 1 mg/ml BSA-FITC für 90 min im Brutschrank inkubiert. Eine parallele Probe wurde auf Eis inkubiert. Danach wurden die DCs mit PBS mit 2% FCS und 0,01 %  $\text{NaN}_3$  zweimal gewaschen und mit 1 % Paraformaldehyd in PBS fixiert. Bei einem anderen Ansatz wurden die DCs ( $0,3 \times 10^6$  Zellen in 0,6 ml AIM-V Medium) zusammen mit 1 mg/ml BSA-FITC und 250  $\mu\text{M}$  ADP oder ohne Stimulus für 2 h im Brutschrank oder auf Eis inkubiert und anschließend wie beschrieben gewaschen und fixiert. Die Zellen wurden im FACS analysiert. Für die Auswertung wurde die mittlere Fluoreszenz der auf Eis inkubierten DCs von der mittleren Fluoreszenz der im Brutschrank bei 37 °C inkubierten DCs subtrahiert [225]. Diese Differenz von der Probe mit der Mediumkontrolle wurde als Referenz (=1) genommen und alle weiteren Proben wurden als ein Vielfaches davon dargestellt.

### **5.6.3. Kreuzpräsentation**

In eine 96-Well Platte wurden wie unter 6.4.1 der Komplex mit den Peptiden, b-pep70-MART-1 oder b-pep70-Tyr, und rhuHsp70 gebildet. Danach wurden 15.000 APCs, DCs oder B-LCL, in 100  $\mu\text{l}$  AIM-V zugesetzt. Nach 1 h wurden die A42- oder TyrF8 T-Zellen (4000 Zellen im 70  $\mu\text{l}$  T-Zellmedium) zugegeben. Das T-Zellmedium war RPMI1640 Medium mit 2 mM L-Glutamin, 1 mM Natriumpyruvat und 1 % MEM nicht-essentielle Aminosäuren, 10 % Hitze inaktiviertes FCS, 10 % Hitze inaktiviertes Humanserum und

50 U/ml rhuIL-2. Nach 24 h Inkubation im Brutschrank wurden die Platten 10 min bei 600 g zentrifugiert. Die Überstände wurden abgenommen und die Konzentration von IFN- $\gamma$  wurde mit dem Elisa bestimmt.

#### **5.6.4. Priming von T-Zellen**

Für das Priming wurden DCs (150.000 DCs in 0,7ml AIM-V) mit 70 nM b-pep70-MART-1 in An- und Abwesenheit von 1  $\mu$ g/ml LPS oder 70 nM b-pep70-MART-1, das mit 1  $\mu$ M rhuHsp70 vorinkubiert wurde (5.4.1) für 1 h im Brutschrank inkubiert. Danach wurden pro Ansatz  $1,5 \times 10^6$  Monozyten-depletierte PBL in 0,7 ml AIM-V mit 20 % HS dazugegeben. Die Monozyten-depletierten PBL wurden aus der positiven Monozytenisolierung mit der MACS-Methode gewonnen. Für weitere Ansätze wurden die DCs mit dem b-pep70-MART-1 Peptid allein oder im Komplex mit rhuHsp70 für 24 h im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurden die DCs gewaschen. 150.000 gepulste und gewaschene DCs wurden mit  $1,5 \times 10^6$  Monozyten depletierte PBL in 1,4 ml AIM-V mit 10 % HS inkubiert. Am Tag 2 und 5 wurden zu den Ansätzen je 25 U/ml rhuIL-2 zugesetzt. Innerhalb von 6 Tagen wurden die Zellen ein-zweimal 1:2 gesplittet. Die Zellen waren vor dem Splitten sehr dicht und das Medium war sehr gelb. Am Tag 7 wurden die gepimten Zellen mit DCs, die wie oben beschrieben gepulst wurden, erneut stimuliert. Am Tag 10 und 13 wurden 25 U /ml rhuIL-2 zugesetzt und die Zellen wurden, wenn nötig, gesplittet. Am Tag 14 nach der ersten Stimulation wurden alle Zellen geerntet, gewaschen und mit Elispot und FACS untersucht. Das Priming wurden mit DCs und PBL aus dem Blut von vier verschiedenen Spendern durchgeführt (P1-P4). In P1-P3 waren während des Primings auch IL-4 und GM-CSF im Medium enthalten. In P4 wurden diese Zytokine nicht für das Priming zugesetzt.

##### **5.6.4.1. Quantifizierung von IFN- $\gamma$ und Perforin sezernierenden Zellen mit dem Elispot**

Bei dem Elispot Testverfahren wird das ausgeschüttete IFN-g oder Perforin direkt an eine im Assay enthaltene Membran, die mit dem jeweiligen Antikörper beschichtet ist, gebunden. Nach Detektion wird das von einer Zelle sezernierte IFN- $\gamma$  oder Perforin als Spot sichtbar. Die Anzahl der Spots entspricht der Anzahl der IFN- $\gamma$  oder Perforin sezernierenden Zellen.

Für die Durchführung wurden Testsysteme von Mabtech verwendet. 96-Well Multiscreen Platten mit hydrophoben PVDF-Membranen (Millipore) wurden mit 70 % Ethanol befeuchtet. Anschließend wurden die Platten fünfmal mit Aqua injectabilia gewaschen. Danach wurde der IFN- $\gamma$  oder Perforin-Antikörper entsprechend der Vorgaben verdünnt

und in die Wells der Platten gegeben. Die Platten wurden mit dem Antikörper für 12 h im Kühlschrank inkubiert. Um ungebundenen Antikörper zu entfernen wurden die Platten im Anschluss fünfmal mit PBS gewaschen. Bei RT wurden die Platten mit AIM-V Medium mit 10 % HS für mindestens 30 min inkubiert. Das Medium wurde entfernt und pro Well wurden je 10.000 A375 oder Mel 93.04A12 in 50 µl RPMI1640 mit 2 mM L-Glutamin, 1 mM Natriumpyruvat und 1 % MEM nicht-essentielle Aminosäuren und 10 % HS gegeben. Dazu wurden je 20.000 oder 50.000 geprimte Zellen (Tag 14) in 150 µl AIM-V mit 10 % HS und 25 U/ml rhIL-2 zugesetzt. Nach 24 h wurden die Zellen durch Waschen mit PBS entfernt. Nach Inkubation der Platten mit dem biotinylierten Detektionsantikörper (1 µg/ml in PBS mit 0,5 % FCS) und Streptavidin- HRP (*horseradish-peroxidase*) oder Streptavidin-ALP (Alkalische Phosphatase) (1:500 in PBS mit 0,5 % FCS) wurden die Spots durch Zusatz des Tetramethylbenzidin (TMB) Substrates (für Streptavidin-HRP) oder 5-Brom-4-chlor-3-indoxylphosphat/ Nitroblau-Tetrazoliumchlorid (BCIP/NBT) Substrat (für Streptavidin-ALP) sichtbar gemacht. Die Farbentwicklung wurde durch Waschen mit Leitungswasser abgestoppt. Die Spots wurden mit dem Elispot EL Reader System (AID) und der zugehörigen Software ausgezählt.

### **5.6.4.2. FACS Analyse**

Die geprimten Zellen wurden nach 5.6.2.3 und 5.6.2.5 für die FACS Analyse mit Antikörpern gegen CD3, CD4, CD25, CD8, CD56 und FOXP3 gefärbt. Die FACS Analyse wurde am LSR II Gerät durchgeführt. Die Auswertung erfolgte mit der BD FACS DIVA Software.

### **5.6.4.3. Tetramer Färbung**

Die Zellen aus den Primingansätzen wurden mit PBS gewaschen und in PBS mit 2% FCS aufgenommen. Die Zellen wurden für 25 min auf Eis mit dem Tetramer gefärbt und anschließend wurden für weitere 20 min Antikörper gegen CD3 und CD8 zugegeben. Danach wurden die Zellen mit PBS zweimal gewaschen und mit dem FACS (LSR II) analysiert.

## **5.7. Statistik**

Für die Berechnung der Signifikanz wurde das S-Plus Programm (S-Plus 6.2 Professional) genutzt. Die Signifikanz wurde durch Anwendung des *Wilcoxon Rank Test* bestimmt.

## 6. Material

### 6.1. Geräte und Verbrauchsmaterial

<b>6.1.1. Geräte</b>	<b>Hersteller</b>
Ultraschallgerät Branson Sonifier	G. Heinemann
Zentrifugen	
Heraus Sepatech	Heraus
Sorvall RC 5B Plus	Heraus
Ultrazentrifuge L7	Beckmann
Megafuge 2.0 und 2.0R	Heraus
Centrifuge 54417R	Eppendorf
Spektrophotometer SmartSpec™Plus	BioRad
Photometer SLT.Spectra	STL Labinstruments
Phosphoimager	Packard
pH-Meter 766 Calimatic	Knick
Waagen	
Mettler PM 460	Mettler
Mettler Toledo	Mettler
Elektrophoreseapparaturen	BioRad
BiologicLP+ Fraction collector	BioRad
Heizblock BT 130-2	HLC
Thermomixer comfort	Eppendorf
Mikroskop	Leica
Brutschränke	Heraus
Sterilwerkbank	BDK
Pipettus akku	Hirschmann Laborgeräte
Durchflusszytometer FACS Calibur	Becton Dickinson
Durchflusszytometer FACS BD LSR II	Becton Dickinson
MoFlow	Dako
Pipetten	Eppendorf

## Material

---

SPR Messgerät Biacore-X	Biacore, GE Healthcare
Neubauer Zählkammer	
Elispot Auslesegerät	AID
Vortexer	NeoLab
MACS Magnet	Macs
Dynal Magnet	Dynal

<b>6.1.2. Verbrauchsmaterial</b>	<b>Hersteller</b>
Einfrierröhrchen	Nunc
Well Platten	Nunc
Elisa Platten	Corning Costar
Zellkulturflaschen	Greiner
Zentrifugenröhrchen 50ml	Falcon
FACS Röhrchen	Falcon
Zellsieb Cellstrainer	Falcon
Reaktionsgefäße BioPur	Eppendorf
Reagenz Reservoirs	Matrix
Zellschaber	TPP
Plastikpipetten	Greiner
Pipettenspitzen	ratiolab
Pasteurpipetten	Roth
Objektträger	Menzel-Gläser
Sterilfiltrationseinheiten	Milipore
Aufkonzentrierungseinheiten	Vivaspin
Spritzen	Becton Dickinson
MultiScreen™ HTS Platten	Milipore
Plastiksäulen	BioRaD
Dialyseschlauch Typ 36/32	Roth
Slide-A-Lyzer™	Pierce

## 6.2. Reagenzien

### 6.2.1. Reagenzien für die E.coli Kultur

Reagenz	Hersteller
LB-Medium	GibcoInvitrogen
Ampicillin	Sigma
L-Arabinose	Sigma
Agar	GibcoInvitrogen

### 6.2.2. Reagenzien für die Reinigung und Analytik der Proteine

Reagenz	Hersteller
Aqua injectabilia	Braun
Phenylmethansulfonylflurid (PMSF)	Sigma
Lysozyme	Sigma
Dnase I	Sigma
Protease Inhibitor Cocktail	Roche
Ammoniumsulfat	Sigma
4-(2-Hydroxyethyl)piperazine-1-ethansulfonsäure (HEPES)	Sigma
KCL	Sigma
MgCL <sub>2</sub>	Sigma
Ethylendiaminteraacetat	
Natriumsalz (EDTA Na )	Sigma
Sucrose	Sigma
Tris	Sigma
Dithiothreitol (DTT)	Sigma
LiCL	Merck
[ $\alpha$ - <sup>32</sup> P]-ATP	GE Healthcare
Spermidine	Sigma
$\beta$ -Mercaptoethanol	Sigma
ATP Dinatriumsalz	Sigma



## Material

---

DEAE Sepharose	GE Healthcare
ATP-Agarose	Sigma
Sephadex G-25 (PD10 Säulen)	GE Healthcare
Detoxi Gel	Pierce
PEI-Cellulose-F DC-Platten	Merck
30% Acrylamidlösung	Roth
SDS-Na	Sigma
TEMED	Serva
Coomassie Brilliant Blue R-250	Serva
Ethanol	Merck
Essigsäure	Roth
Salzsäure	Merck
Natriumcarbonat	Merck
Natriumthiosulfat	Merck
Glycerol	Sigma
Proteinstandard	BioRad
Protein Assay	BioRad
BSA Standard	BioRad
Sodiumdeoxycholat	Sigma

### 6.2.3. Reagenzien für die Zellbiologischen Versuche

Reagenzien	Hersteller
BSA Bovine Fraction	
V IgG free Low Endotoxin	Sigma
ADP	Sigma
ATP	Sigma
$\gamma$ -ATP	Sigma
LPS aus E.coli 0111:B4	Sigma
Exotoxin A aus Pseudomonas Aeruginosa	Sigma
7-Aminoactinomycin	Sigma

## Material

---

Chloroquindiphosphat	Sigma
Ionomycin	Sigma
Suramin Natriumsalz	Sigma
Paraformaldehyd	Sigma
Indo-I AM	Sigma
Dimethylsulfoxid	Sigma

### 6.2.4. Medien, Medienzusätze

Medien, Zusätze	Hersteller
AIM-V	GibcoInvitrogen
RPMI	GibcoInvitrogen
MEM nonessential Aminoacids	GibcoInvitrogen
Natriumpyruvat	GibcoInvitrogen
EDTA-Lösung	GibcoInvitrogen
Prostaglandin E <sub>2</sub> (PGE <sub>2</sub> )	Sigma
Fetales Kälberserum (FCS)	GibcoInvitrogen
Humanes Serum (AB Serum)	Cambrex oder Pool von verschiedenen Spendern (eigene Herstellung)

### 6.2.5. Testkits

Kit	Hersteller
Dynal Neagtiv Isolationskit	Dynal
CD14 Beads	MACS
Elispots (IFN- $\gamma$ und Perforin)	Mabtech
Elisa (IFN- $\gamma$ , TNF, IL-12(p40), IL-10)	Becton Dickinson
Bioplex	BioRad
LAL Test	Cambrex

### 6.2.6. Antikörper und sekundäre Färbereagenzien

Alle verwendeten Antikörper waren gegen humane Moleküle.

Antikörper und Reagenzien	Markierung	Verdünnung	Hersteller
IgG2b	PE	1:25	BD Pharmingen
IgG2b	FITC	1:10	BD Pharmingen
CD209	FITC	1:25	BD Pharmingen
CD11c	PE	1:10	BD Pharmingen
CD80	PE oder FITC	1:25	BD Pharmingen
CD86	PE oder FITC	1:25	BD Pharmingen
CD40	FITC	1:10	BD Pharmingen
CD14	FITC	1:25	BD Pharmingen
CD32	PE	1:25	Immunotech
CD91	FITC	1:25	BD Pharmingen
CD38	FITC	1:10	Immunotech
CD56	APC	1:15	BD Pharmingen
CD3	PB	1:15	Dako
CD25	PE	1:10	BD Pharmingen
CD4	PerCP	1:10	BD Pharmingen
CD4	PE	1:10	BD Pharmingen
CD8	FITC	1:10	BD Pharmingen
CD8	Alex-Fluor 750	1:12	BD Pharmingen
FOXP3	APC	1:10	eBiosciences
Isotyp FOXP3	APC	1:100	eBiosciences
CCR5	PE	1:5	R&D Systems
CCR7	unkonjugiert	1:15	BD Pharmingen
Mouse IgM	Biotin	1:100	BD Pharmingen
Streptavidin	PE	1:500	BD Pharmingen
CXCR4	PE	1:10	BD Pharmingen
MA 2.1	unkonjugiert	Überstand	ATCC
Anti-Maus IgG	FITC	1:25	Dako
Streptavidin	FITC	1:25	Dako
Tetramer*	PE	1:25	#

\* HLA-A0201/MelanA p27-35 mod./H $\beta$ <sub>2</sub>m; Sequenz: ELAGIGILTV

# Dirk Busch, Institut für Med. Mikrobiologie, Immunologie u. Hygiene, TUM, München

### 6.3. Proteine und Peptide

rhuHsp70 <i>LPS low</i>	Stressgen
rhuMART-1/Melan A	ProSpecTechnoGene
CD40 Ligand	Alexis Biochemicals

#### Peptide

b-pep70-MART-1*1	biotin-GSGHWDFAWPWGSGLAGIGILTV
Melan-A/MART-1 (27-35)*2	LAGIGILTV
b-pep70-Tyr*3	biotin-GSGHWDFAWPWGSGYMNGTMSQV
Tyrosinase (368-376)*4	YMNGTMSQ
pep70	HWDFAWPW

#### Aminosäuresequenz (single letter code)

**pep70**= Hsp70 bindende Sequenz

\*Hersteller:

- 1: LMU, Laboratorium für molekulare Biologie, Genzentrum, München
- 2: TU, Department für Chemie, München
- 3: Biosyntan, Berlin
- 4: Eigene Herstellung, GSF München

### 6.4. Zytokine

Zytokin	Hersteller
rhuIL-4	CellGenix
rhuGM-CSF	Berlex
rhuTNF	R&D Systems
rhuIL-1 $\beta$	R&D Systems
rhuIL-6	R&D Systems
rhuIL-2	Proleukin, Cetus

### 6.5. Zelllinien

B-LCL L724.45	[222]
B-LCL L724,174	[222]
MART A42	M.C. Panelli (National Institut of Health, Bethesda, Maryland, USA)

## Material

---

TyrF8	Dr.P. Schierer (Dept. of Clinical Oncology, Leiden University,Niederlande)
Mel 93.04A12	Dr.P. Schierer (Dept. of Clinical Oncology, Leiden University,Niederlande)
A 375	ATCC

## 7. Literaturverzeichnis

1. **Quah BJ and O'Neill HC.** Maturation of function in dendritic cells for tolerance and immunity. *J Cell Mol Med* 9: 643-654, 2005.
2. **Steinman RM and Cohn ZA.** Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution. *J Exp Med* 137: 1142-1162, 1973.
3. **Shortman K and Liu YJ.** Mouse and human dendritic cell subtypes. *Nat Rev Immunol* 2: 151-161, 2002.
4. **Mohamadzadeh M, Berard F, Essert G, Chalouni C, Pulendran B, Davoust J, Bridges G, Palucka AK, and Banchereau J.** Interleukin 15 skews monocyte differentiation into dendritic cells with features of Langerhans cells. *J Exp Med* 194: 1013-1020, 2001.
5. **Caux C, Dezutter-Dambuyant C, Schmitt D, and Banchereau J.** GM-CSF and TNF-alpha cooperate in the generation of dendritic Langerhans cells. *Nature* 360: 258-261, 1992.
6. **Banchereau J, Briere F, Caux C, Davoust J, Lebecque S, Liu YJ, Pulendran B, and Palucka K.** Immunobiology of dendritic cells. *Annu Rev Immunol* 18: 767-811, 2000.
7. **Brockner T.** Survival of mature CD4 T lymphocytes is dependent on major histocompatibility complex class II-expressing dendritic cells. *J Exp Med* 186: 1223-1232, 1997.

8. **Ludewig B, Oehen S, Barchiesi F, Schwendener RA, Hengartner H, and Zinkernagel RM.** Protective antiviral cytotoxic T cell memory is most efficiently maintained by restimulation via dendritic cells. *J Immunol* 163: 1839-1844, 1999.
9. **Dubois B, Massacrier C, Vanbervliet B, Fayette J, Briere F, Banchereau J, and Caux C.** Critical role of IL-12 in dendritic cell-induced differentiation of naive B lymphocytes. *J Immunol* 161: 2223-2231, 1998.
10. **Dubois B, Vanbervliet B, Fayette J, Massacrier C, Van Kooten C, Briere F, Banchereau J, and Caux C.** Dendritic cells enhance growth and differentiation of CD40-activated B lymphocytes. *J Exp Med* 185: 941-951, 1997.
11. **Fayette J, Dubois B, Vandenaabeele S, Bridon JM, Vanbervliet B, Durand I, Banchereau J, Caux C, and Briere F.** Human dendritic cells skew isotype switching of CD40-activated naive B cells towards IgA1 and IgA2. *J Exp Med* 185: 1909-1918, 1997.
12. **Chambers BJ, Salcedo M, and Ljunggren HG.** Triggering of natural killer cells by the costimulatory molecule CD80 (B7-1). *Immunity* 5: 311-317, 1996.
13. **Shah PD.** Dendritic cells but not macrophages are targets for immune regulation by natural killer cells. *Cell Immunol* 104: 440-445, 1987.
14. **Takeda K and Akira S.** Toll-like receptors in innate immunity. *Int Immunol* 17: 1-14, 2005.

15. **Akira S, Takeda K, and Kaisho T.** Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity. *Nat Immunol* 2: 675-680, 2001.
16. **Figdor CG, van Kooyk Y, and Adema GJ.** C-type lectin receptors on dendritic cells and Langerhans cells. *Nat Rev Immunol* 2: 77-84, 2002.
17. **Sansom DM, Manzotti CN, and Zheng Y.** What's the difference between CD80 and CD86? *Trends Immunol* 24: 314-319, 2003.
18. **Bennett SR, Carbone FR, Karamalis F, Flavell RA, Miller JF, and Heath WR.** Help for cytotoxic-T-cell responses is mediated by CD40 signalling. *Nature* 393: 478-480, 1998.
19. **Randolph GJ, Sanchez-Schmitz G, and Angeli V.** Factors and signals that govern the migration of dendritic cells via lymphatics: recent advances. *Springer Semin Immunopathol* 26: 273-287, 2005.
20. **Reis e Sousa C.** Dendritic cells in a mature age. *Nat Rev Immunol* 6: 476-483, 2006.
21. **Keir ME and Sharpe AH.** The B7/CD28 costimulatory family in autoimmunity. *Immunol Rev* 204: 128-143, 2005.
22. **Curtsinger JM, Lins DC, and Mescher MF.** Signal 3 determines tolerance versus full activation of naive CD8 T cells: dissociating proliferation and development of effector function. *J Exp Med* 197: 1141-1151, 2003.
23. **Kalinski P, Hilkens CM, Wierenga EA, and Kapsenberg ML.** T-cell priming by type-1 and type-2 polarized dendritic cells: the concept of a third signal. *Immunol Today* 20: 561-567, 1999.



24. **Tu L, Fang TC, Artis D, Shestova O, Pross SE, Maillard I, and Pear WS.** Notch signaling is an important regulator of type 2 immunity. *J Exp Med* 202: 1037-1042, 2005.
25. **Amsen D, Blander JM, Lee GR, Tanigaki K, Honjo T, and Flavell RA.** Instruction of distinct CD4 T helper cell fates by different notch ligands on antigen-presenting cells. *Cell* 117: 515-526, 2004.
26. **Smits HH, de Jong EC, Wierenga EA, and Kapsenberg ML.** Different faces of regulatory DCs in homeostasis and immunity. *Trends Immunol* 26: 123-129, 2005.
27. **Geissmann F, Dieu-Nosjean MC, Dezutter C, Valladeau J, Kayal S, Leborgne M, Brousse N, Saeland S, and Davoust J.** Accumulation of immature Langerhans cells in human lymph nodes draining chronically inflamed skin. *J Exp Med* 196: 417-430, 2002.
28. **Dhodapkar MV and Steinman RM.** Antigen-bearing immature dendritic cells induce peptide-specific CD8(+) regulatory T cells in vivo in humans. *Blood* 100: 174-177, 2002.
29. **Dhodapkar MV, Steinman RM, Krasovsky J, Munz C, and Bhardwaj N.** Antigen-specific inhibition of effector T cell function in humans after injection of immature dendritic cells. *J Exp Med* 193: 233-238, 2001.
30. **Jonuleit H, Schmitt E, Schuler G, Knop J, and Enk AH.** Induction of interleukin 10-producing, nonproliferating CD4(+) T cells with regulatory properties by repetitive stimulation with allogeneic immature human dendritic cells. *J Exp Med* 192: 1213-1222, 2000.

31. **Lutz MB and Schuler G.** Immature, semi-mature and fully mature dendritic cells: which signals induce tolerance or immunity? *Trends Immunol* 23: 445-449, 2002.
32. **Menges M, Rossner S, Voigtlander C, Schindler H, Kukutsch NA, Bogdan C, Erb K, Schuler G, and Lutz MB.** Repetitive injections of dendritic cells matured with tumor necrosis factor alpha induce antigen-specific protection of mice from autoimmunity. *J Exp Med* 195: 15-21, 2002.
33. **Piemonti L, Monti P, Allavena P, Sironi M, Soldini L, Leone BE, Socci C, and Di Carlo V.** Glucocorticoids affect human dendritic cell differentiation and maturation. *J Immunol* 162: 6473-6481, 1999.
34. **Iwasaki A and Kelsall BL.** Freshly isolated Peyer's patch, but not spleen, dendritic cells produce interleukin 10 and induce the differentiation of T helper type 2 cells. *J Exp Med* 190: 229-239, 1999.
35. **Liu L, Rich BE, Inobe J, Chen W, and Weiner HL.** Induction of Th2 cell differentiation in the primary immune response: dendritic cells isolated from adherent cell culture treated with IL-10 prime naive CD4+ T cells to secrete IL-4. *Int Immunol* 10: 1017-1026, 1998.
36. **Caux C, Massacrier C, Vanbervliet B, Barthelemy C, Liu YJ, and Banchereau J.** Interleukin 10 inhibits T cell alloreaction induced by human dendritic cells. *Int Immunol* 6: 1177-1185, 1994.
37. **They C and Amigorena S.** The cell biology of antigen presentation in dendritic cells. *Curr Opin Immunol* 13: 45-51, 2001.

38. **Inaba K, Turley S, Yamaide F, Iyoda T, Mahnke K, Inaba M, Pack M, Subklewe M, Sauter B, Sheff D, Albert M, Bhardwaj N, Mellman I, and Steinman RM.** Efficient presentation of phagocytosed cellular fragments on the major histocompatibility complex class II products of dendritic cells. *J Exp Med* 188: 2163-2173, 1998.
39. **Inaba K, Pack M, Inaba M, Sakuta H, Isdell F, and Steinman RM.** High levels of a major histocompatibility complex II-self peptide complex on dendritic cells from the T cell areas of lymph nodes. *J Exp Med* 186: 665-672, 1997.
40. **Castellino F, Zhong G, and Germain RN.** Antigen presentation by MHC class II molecules: invariant chain function, protein trafficking, and the molecular basis of diverse determinant capture. *Hum Immunol* 54: 159-169, 1997.
41. **Cresswell P.** Invariant chain structure and MHC class II function. *Cell* 84: 505-507, 1996.
42. **Stern LJ, Potolicchio I, and Santambrogio L.** MHC class II compartment subtypes: structure and function. *Curr Opin Immunol* 18: 64-69, 2006.
43. **Nijman HW, Kleijmeer MJ, Ossevoort MA, Oorschot VM, Vierboom MP, van de Keur M, Kenemans P, Kast WM, Geuze HJ, and Melief CJ.** Antigen capture and major histocompatibility class II compartments of freshly isolated and cultured human blood dendritic cells. *J Exp Med* 182: 163-174, 1995.

44. **Lutz MB, Rovere P, Kleijmeer MJ, Rescigno M, Assmann CU, Oorschot VM, Geuze HJ, Trucy J, Demandolx D, Davoust J, and Ricciardi-Castagnoli P.** Intracellular routes and selective retention of antigens in mildly acidic cathepsin D/lysosome-associated membrane protein-1/MHC class II-positive vesicles in immature dendritic cells. *J Immunol* 159: 3707-3716, 1997.
45. **Cella M, Engering A, Pinet V, Pieters J, and Lanzavecchia A.** Inflammatory stimuli induce accumulation of MHC class II complexes on dendritic cells. *Nature* 388: 782-787, 1997.
46. **Pierre P and Mellman I.** Developmental regulation of invariant chain proteolysis controls MHC class II trafficking in mouse dendritic cells. *Cell* 93: 1135-1145, 1998.
47. **Riese RJ, Wolf PR, Bromme D, Natkin LR, Villadangos JA, Ploegh HL, and Chapman HA.** Essential role for cathepsin S in MHC class II-associated invariant chain processing and peptide loading. *Immunity* 4: 357-366, 1996.
48. **Trombetta ES, Ebersold M, Garrett W, Pypaert M, and Mellman I.** Activation of lysosomal function during dendritic cell maturation. *Science* 299: 1400-1403, 2003.
49. **Cresswell P, Ackerman AL, Giodini A, Peaper DR, and Wearsch PA.** Mechanisms of MHC class I-restricted antigen processing and cross-presentation. *Immunol Rev* 207: 145-157, 2005.
50. **Sigal LJ, Crotty S, Andino R, and Rock KL.** Cytotoxic T-cell immunity to virus-infected non-haematopoietic cells requires presentation of exogenous antigen. *Nature* 398: 77-80, 1999.

51. **Mueller SN, Jones CM, Smith CM, Heath WR, and Carbone FR.** Rapid cytotoxic T lymphocyte activation occurs in the draining lymph nodes after cutaneous herpes simplex virus infection as a result of early antigen presentation and not the presence of virus. *J Exp Med* 195: 651-656, 2002.
52. **Shen L and Rock KL.** Priming of T cells by exogenous antigen cross-presented on MHC class I molecules. *Curr Opin Immunol* 18: 85-91, 2006
53. **Guermonprez P and Amigorena S.** Pathways for antigen cross presentation. *Springer Semin Immunopathol* 26: 257-271, 2005.
54. **Kovacsovics-Bankowski M and Rock KL.** A phagosome-to-cytosol pathway for exogenous antigens presented on MHC class I molecules. *Science* 267: 243-246, 1995.
55. **Guermonprez P, Saveanu L, Kleijmeer M, Davoust J, Van Endert P, and Amigorena S.** ER-phagosome fusion defines an MHC class I cross-presentation compartment in dendritic cells. *Nature* 425: 397-402, 2003.
56. **Houde M, Bertholet S, Gagnon E, Brunet S, Goyette G, Laplante A, Princiotta MF, Thibault P, Sacks D, and Desjardins M.** Phagosomes are competent organelles for antigen cross-presentation. *Nature* 425: 402-406, 2003.
57. **Ackerman AL, Kyritsis C, Tampe R, and Cresswell P.** Early phagosomes in dendritic cells form a cellular compartment sufficient for cross presentation of exogenous antigens. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 12889-12894, 2003.

58. **Gagnon E, Duclos S, Rondeau C, Chevet E, Cameron PH, Steele-Mortimer O, Paiement J, Bergeron JJ, and Desjardins M.** Endoplasmic reticulum-mediated phagocytosis is a mechanism of entry into macrophages. *Cell* 110: 119-131, 2002.
59. **Touret N, Paroutis P, Terebiznik M, Harrison RE, Trombetta S, Pypaert M, Chow A, Jiang A, Shaw J, Yip C, Moore HP, van der Wel N, Houben D, Peters PJ, de Chastellier C, Mellman I, and Grinstein S.** Quantitative and dynamic assessment of the contribution of the ER to phagosome formation. *Cell* 123: 157-170, 2005.
60. **Shen L, Sigal LJ, Boes M, and Rock KL.** Important role of cathepsin S in generating peptides for TAP-independent MHC class I crosspresentation in vivo. *Immunity* 21: 155-165, 2004.
61. **Imai J, Hasegawa H, Maruya M, Koyasu S, and Yahara I.** Exogenous antigens are processed through the endoplasmic reticulum-associated degradation (ERAD) in cross-presentation by dendritic cells. *Int Immunol* 17: 45-53, 2005.
62. **Ackerman AL, Giodini A, and Cresswell P.** A role for the endoplasmic reticulum protein retrotranslocation machinery during crosspresentation by dendritic cells. *Immunity* 25: 607-617, 2006.
63. **Koopmann JO, Albring J, Huter E, Bulbuc N, Spee P, Neefjes J, Hammerling GJ, and Momburg F.** Export of antigenic peptides from the endoplasmic reticulum intersects with retrograde protein translocation through the Sec61p channel. *Immunity* 13: 117-127, 2000.

64. **Wilson NS, Behrens GM, Lundie RJ, Smith CM, Waithman J, Young L, Forehan SP, Mount A, Steptoe RJ, Shortman KD, de Koning-Ward TF, Belz GT, Carbone FR, Crabb BS, Heath WR, and Villadangos JA.** Systemic activation of dendritic cells by Toll-like receptor ligands or malaria infection impairs cross-presentation and antiviral immunity. *Nat Immunol* 7: 165-172, 2006.
65. **Hotta C, Fujimaki H, Yoshinari M, Nakazawa M, and Minami M.** The delivery of an antigen from the endocytic compartment into the cytosol for cross-presentation is restricted to early immature dendritic cells. *Immunology* 117: 97-107, 2006
66. **Rosenberg SA.** Progress in human tumour immunology and immunotherapy. *Nature* 411: 380-384, 2001.
67. **Wang RF and Rosenberg SA.** Human tumor antigens for cancer vaccine development. *Immunol Rev* 170: 85-100, 1999.
68. **Osada T, Clay TM, Woo CY, Morse MA, and Lyerly HK.** Dendritic cell-based immunotherapy. *Int Rev Immunol* 25: 377-413, 2006.
69. **Mende I and Engleman EG.** Breaking tolerance to tumors with dendritic cell-based immunotherapy. *Ann N Y Acad Sci* 1058: 96-104, 2005.
70. **Svane IM, Soot ML, Buus S, and Johnsen HE.** Clinical application of dendritic cells in cancer vaccination therapy. *Apmis* 111: 818-834, 2003.

71. **Toes RE, van der Voort EI, Schoenberger SP, Drijfhout JW, van Bloois L, Storm G, Kast WM, Offringa R, and Melief CJ.** Enhancement of tumor outgrowth through CTL tolerization after peptide vaccination is avoided by peptide presentation on dendritic cells. *J Immunol* 160: 4449-4456, 1998.
72. **Paglia P, Chiodoni C, Rodolfo M, and Colombo MP.** Murine dendritic cells loaded in vitro with soluble protein prime cytotoxic T lymphocytes against tumor antigen in vivo. *J Exp Med* 183: 317-322, 1996.
73. **Porgador A and Gilboa E.** Bone marrow-generated dendritic cells pulsed with a class I-restricted peptide are potent inducers of cytotoxic T lymphocytes. *J Exp Med* 182: 255-260, 1995.
74. **Mayordomo JI, Zorina T, Storkus WJ, Zitvogel L, Celluzzi C, Falo LD, Melief CJ, Ildstad ST, Kast WM, Deleo AB, and et al.** Bone marrow-derived dendritic cells pulsed with synthetic tumour peptides elicit protective and therapeutic antitumour immunity. *Nat Med* 1: 1297-1302, 1995.
75. **Flamand V, Sornasse T, Thielemans K, Demanet C, Bakkus M, Bazin H, Tielemans F, Leo O, Urbain J, and Moser M.** Murine dendritic cells pulsed in vitro with tumor antigen induce tumor resistance in vivo. *Eur J Immunol* 24: 605-610, 1994.
76. **Nestle FO, Farkas A, and Conrad C.** Dendritic-cell-based therapeutic vaccination against cancer. *Curr Opin Immunol* 17: 163-169, 2005.
77. **Dhodapkar MV, Steinman RM, Sapp M, Desai H, Fossella C, Krasovsky J, Donahoe SM, Dunbar PR, Cerundolo V, Nixon DF, and Bhardwaj N.** Rapid generation of broad T-cell immunity in humans after a single injection of mature dendritic cells. *J Clin Invest* 104: 173-180, 1999.



78. **Nestle FO, Alijagic S, Gilliet M, Sun Y, Grabbe S, Dummer R, Burg G, and Schadendorf D.** Vaccination of melanoma patients with peptide- or tumor lysate-pulsed dendritic cells. *Nat Med* 4: 328-332, 1998.
79. **Hsu FJ, Benike C, Fagnoni F, Liles TM, Czerwinski D, Taidi B, Engleman EG, and Levy R.** Vaccination of patients with B-cell lymphoma using autologous antigen-pulsed dendritic cells. *Nat Med* 2: 52-58, 1996.
80. **Wegele H, Muller L, and Buchner J.** Hsp70 and Hsp90--a relay team for protein folding. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 151: 1-44, 2004.
81. **Mayer MP and Bukau B.** Hsp70 chaperones: cellular functions and molecular mechanism. *Cell Mol Life Sci* 62: 670-684, 2005.
82. **Walter S and Buchner J.** Molecular chaperones--cellular machines for protein folding. *Angew Chem Int Ed Engl* 41: 1098-1113, 2002.
83. **Hartl FU and Hayer-Hartl M.** Molecular chaperones in the cytosol: from nascent chain to folded protein. *Science* 295: 1852-1858, 2002.
84. **Heymann JB, Iwasaki K, Yim YI, Cheng N, Belnap DM, Greene LE, Eisenberg E, and Steven AC.** Visualization of the binding of Hsc70 ATPase to clathrin baskets: implications for an uncoating mechanism. *J Biol Chem* 280: 7156-7161, 2005.
85. **Harrison CJ, Hayer-Hartl M, Di Liberto M, Hartl F, and Kuriyan J.** Crystal structure of the nucleotide exchange factor GrpE bound to the ATPase domain of the molecular chaperone DnaK. *Science* 276: 431-435, 1997.

86. **Zhu X, Zhao X, Burkholder WF, Gragerov A, Ogata CM, Gottesman ME, and Hendrickson WA.** Structural analysis of substrate binding by the molecular chaperone DnaK. *Science* 272: 1606-1614, 1996.
  
87. **Flaherty KM, DeLuca-Flaherty C, and McKay DB.** Three-dimensional structure of the ATPase fragment of a 70K heat-shock cognate protein. *Nature* 346: 623-628, 1990.
  
88. **Banecki B and Zylicz M.** Real time kinetics of the DnaK/DnaJ/GrpE molecular chaperone machine action. *J Biol Chem* 271: 6137-6143, 1996.
  
89. **McCarty JS, Buchberger A, Reinstein J, and Bukau B.** The role of ATP in the functional cycle of the DnaK chaperone system. *J Mol Biol* 249: 126-137, 1995.
  
90. **Schmid D, Baici A, Gehring H, and Christen P.** Kinetics of molecular chaperone action. *Science* 263: 971-973, 1994.
  
91. **Hernandez MP, Chadli A, and Toft DO.** HSP40 binding is the first step in the HSP90 chaperoning pathway for the progesterone receptor. *J Biol Chem* 277: 11873-11881, 2002.
  
92. **Bukau B and Horwich AL.** The Hsp70 and Hsp60 chaperone machines. *Cell* 92: 351-366, 1998.
  
93. **Cheetham ME and Caplan AJ.** Structure, function and evolution of DnaJ: conservation and adaptation of chaperone function. *Cell Stress Chaperones* 3: 28-36, 1998.

94. **Basu S, Binder RJ, Suto R, Anderson KM, and Srivastava PK.** Necrotic but not apoptotic cell death releases heat shock proteins, which deliver a partial maturation signal to dendritic cells and activate the NF-kappa B pathway. *Int Immunol* 12: 1539-1546, 2000.
95. **Manjili MH, Park J, Facciponte JG, and Subject JR.** HSP110 induces "danger signals" upon interaction with antigen presenting cells and mouse mammary carcinoma. *Immunobiology* 210: 295-303, 2005.
96. **Campisi J, Leem TH, and Fleshner M.** Stress-induced extracellular Hsp72 is a functionally significant danger signal to the immune system. *Cell Stress Chaperones* 8: 272-286, 2003.
97. **Flohe SB, Bruggemann J, Lendemans S, Nikulina M, Meierhoff G, Flohe S, and Kolb H.** Human heat shock protein 60 induces maturation of dendritic cells versus a Th1-promoting phenotype. *J Immunol* 170: 2340-2348, 2003.
98. **Bethke K, Staib F, Distler M, Schmitt U, Jonuleit H, Enk AH, Galle PR, and Heike M.** Different efficiency of heat shock proteins (HSP) to activate human monocytes and dendritic cells: superiority of HSP60. *J Immunol* 169: 6141-6148, 2002.
99. **Breloer M, Dorner B, More SH, Roderian T, Fleischer B, and von Bonin A.** Heat shock proteins as "danger signals": eukaryotic Hsp60 enhances and accelerates antigen-specific IFN-gamma production in T cells. *Eur J Immunol* 31: 2051-2059, 2001.

100. **Kuppner MC, Gastpar R, Gelwer S, Nossner E, Ochmann O, Scharner A, and Issels RD.** The role of heat shock protein (hsp70) in dendritic cell maturation: hsp70 induces the maturation of immature dendritic cells but reduces DC differentiation from monocyte precursors. *Eur J Immunol* 31: 1602-1609, 2001.
101. **Asea A, Kraeft SK, Kurt-Jones EA, Stevenson MA, Chen LB, Finberg RW, Koo GC, and Calderwood SK.** HSP70 stimulates cytokine production through a CD14-dependant pathway, demonstrating its dual role as a chaperone and cytokine. *Nat Med* 6: 435-442, 2000.
102. **Singh-Jasuja H, Scherer HU, Hilf N, Arnold-Schild D, Rammensee HG, Toes RE, and Schild H.** The heat shock protein gp96 induces maturation of dendritic cells and down-regulation of its receptor. *Eur J Immunol* 30: 2211-2215, 2000.
103. **Chen W, Syldath U, Bellmann K, Burkart V, and Kolb H.** Human 60-kDa heat-shock protein: a danger signal to the innate immune system. *J Immunol* 162: 3212-3219, 1999.
104. **Gallucci S and Matzinger P.** Danger signals: SOS to the immune system. *Curr Opin Immunol* 13: 114-119, 2001.
105. **Matzinger P.** The danger model: a renewed sense of self. *Science* 296: 301-305, 2002.
106. **Medzhitov R and Janeway CA, Jr.** Decoding the patterns of self and nonself by the innate immune system. *Science* 296: 298-300, 2002.

- 107. Somersan S, Larsson M, Fonteneau JF, Basu S, Srivastava P, and Bhardwaj N.** Primary tumor tissue lysates are enriched in heat shock proteins and induce the maturation of human dendritic cells. *J Immunol* 167: 4844-4852, 2001.
- 108. Feng H, Zeng Y, Whitesell L, and Katsanis E.** Stressed apoptotic tumor cells express heat shock proteins and elicit tumor-specific immunity. *Blood* 97: 3505-3512, 2001.
- 109. Todryk SM, Melcher AA, Dalgleish AG, and Vile RG.** Heat shock proteins refine the danger theory. *Immunology* 99: 334-337, 2000.
- 110. Asea A, Rehli M, Kabingu E, Boch JA, Bare O, Auron PE, Stevenson MA, and Calderwood SK.** Novel signal transduction pathway utilized by extracellular HSP70: role of toll-like receptor (TLR) 2 and TLR4. *J Biol Chem* 277: 15028-15034, 2002.
- 111. Vabulas RM, Ahmad-Nejad P, Ghose S, Kirschning CJ, Issels RD, and Wagner H.** HSP70 as endogenous stimulus of the Toll/interleukin-1 receptor signal pathway. *J Biol Chem* 277: 15107-15112, 2002.
- 112. Vabulas RM, Wagner H, and Schild H.** Heat shock proteins as ligands of toll-like receptors. *Curr Top Microbiol Immunol* 270: 169-184, 2002.
- 113. Becker T, Hartl FU, and Wieland F.** CD40, an extracellular receptor for binding and uptake of Hsp70-peptide complexes. *J Cell Biol* 158: 1277-1285, 2002.

- 114. Theriault JR, Adachi H, and Calderwood SK.** Role of scavenger receptors in the binding and internalization of heat shock protein 70. *J Immunol* 177: 8604-8611, 2006.
- 115. Theriault JR, Mambula SS, Sawamura T, Stevenson MA, and Calderwood SK.** Extracellular HSP70 binding to surface receptors present on antigen presenting cells and endothelial/epithelial cells. *FEBS Lett* 579: 1951-1960, 2005.
- 116. Basu S, Binder RJ, Ramalingam T, and Srivastava PK.** CD91 is a common receptor for heat shock proteins gp96, hsp90, hsp70, and calreticulin. *Immunity* 14: 303-313, 2001.
- 117. Wang R, Kovalchin JT, Muhlenkamp P, and Chandawarkar RY.** Exogenous heat shock protein 70 binds macrophage lipid raft microdomain and stimulates phagocytosis, processing, and MHC-II presentation of antigens. *Blood* 107: 1636-1642, 2006.
- 118. Srivastava P.** Roles of heat-shock proteins in innate and adaptive immunity. *Nat Rev Immunol* 2: 185-194, 2002.
- 119. Srivastava PK, Menoret A, Basu S, Binder RJ, and McQuade KL.** Heat shock proteins come of age: primitive functions acquire new roles in an adaptive world. *Immunity* 8: 657-665, 1998.
- 120. Wang XY, Kazim L, Repasky EA, and Subject JR.** Characterization of heat shock protein 110 and glucose-regulated protein 170 as cancer vaccines and the effect of fever-range hyperthermia on vaccine activity. *J Immunol* 166: 490-497, 2001.

121. **Basu S and Srivastava PK.** Calreticulin, a peptide-binding chaperone of the endoplasmic reticulum, elicits tumor- and peptide-specific immunity. *J Exp Med* 189: 797-802, 1999.
122. **Tamura Y, Peng P, Liu K, Daou M, and Srivastava PK.** Immunotherapy of tumors with autologous tumor-derived heat shock protein preparations. *Science* 278: 117-120, 1997.
123. **Udono H and Srivastava PK.** Heat shock protein 70-associated peptides elicit specific cancer immunity. *J Exp Med* 178: 1391-1396, 1993.
124. **Ullrich SJ, Robinson EA, Law LW, Willingham M, and Appella E.** A mouse tumor-specific transplantation antigen is a heat shock-related protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83: 3121-3125, 1986.
125. **Li Z, Menoret A, and Srivastava P.** Roles of heat-shock proteins in antigen presentation and cross-presentation. *Curr Opin Immunol* 14: 45-51, 2002.
126. **Noessner E, Gastpar R, Milani V, Brandl A, Hutzler PJ, Kuppner MC, Roos M, Kremmer E, Asea A, Calderwood SK, and Issels RD.** Tumor-derived heat shock protein 70 peptide complexes are cross-presented by human dendritic cells. *J Immunol* 169: 5424-5432, 2002.
127. **Suzue K, Zhou X, Eisen HN, and Young RA.** Heat shock fusion proteins as vehicles for antigen delivery into the major histocompatibility complex class I presentation pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94: 13146-13151, 1997.

- 128. Suto R and Srivastava PK.** A mechanism for the specific immunogenicity of heat shock protein-chaperoned peptides. *Science* 269: 1585-1588, 1995.
- 129. Binder RJ, Blachere NE, and Srivastava PK.** Heat shock protein-chaperoned peptides but not free peptides introduced into the cytosol are presented efficiently by major histocompatibility complex I molecules. *J Biol Chem* 276: 17163-17171, 2001.
- 130. Binder RJ and Srivastava PK.** Peptides chaperoned by heat-shock proteins are a necessary and sufficient source of antigen in the cross-priming of CD8+ T cells. *Nat Immunol* 6: 593-599, 2005.
- 131. Castellino F, Boucher PE, Eichelberg K, Mayhew M, Rothman JE, Houghton AN, and Germain RN.** Receptor-mediated uptake of antigen/heat shock protein complexes results in major histocompatibility complex class I antigen presentation via two distinct processing pathways. *J Exp Med* 191: 1957-1964, 2000.
- 132. Binder RJ and Srivastava PK.** Essential role of CD91 in re-presentation of gp96-chaperoned peptides. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 6128-6133, 2004.
- 133. Delneste Y.** Scavenger receptors and heat-shock protein-mediated antigen cross-presentation. *Biochem Soc Trans* 32: 633-635, 2004.
- 134. Flechtner JB, Cohane KP, Mehta S, Slusarewicz P, Leonard AK, Barber BH, Levey DL, and Andjelic S.** High-affinity interactions between peptides and heat shock protein 70 augment CD8+ T lymphocyte immune responses. *J Immunol* 177: 1017-1027, 2006.



- 135. Ueda G, Tamura Y, Hirai I, Kamiguchi K, Ichimiya S, Torigoe T, Hiratsuka H, Sunakawa H, and Sato N.** Tumor-derived heat shock protein 70-pulsed dendritic cells elicit tumor-specific cytotoxic T lymphocytes (CTLs) and tumor immunity. *Cancer Sci* 95: 248-253, 2004.
- 136. Ciupitu AM, Petersson M, Kono K, Charo J, and Kiessling R.** Immunization with heat shock protein 70 from methylcholanthrene-induced sarcomas induces tumor protection correlating with in vitro T cell responses. *Cancer Immunol Immunother* 51: 163-170, 2002.
- 137. Navaratnam M, Deshpande MS, Hariharan MJ, Zatechka DS, Jr., and Srikumaran S.** Heat shock protein-peptide complexes elicit cytotoxic T-lymphocyte and antibody responses specific for bovine herpesvirus 1. *Vaccine* 19: 1425-1434, 2001.
- 138. Blachere NE, Li Z, Chandawarkar RY, Suto R, Jaikaria NS, Basu S, Udono H, and Srivastava PK.** Heat shock protein-peptide complexes, reconstituted in vitro, elicit peptide-specific cytotoxic T lymphocyte response and tumor immunity. *J Exp Med* 186: 1315-1322, 1997.
- 139. Castelli C, Ciupitu AM, Rini F, Rivoltini L, Mazzocchi A, Kiessling R, and Parmiani G.** Human heat shock protein 70 peptide complexes specifically activate antimelanoma T cells. *Cancer Res* 61: 222-227, 2001.
- 140. Moroi Y, Mayhew M, Trcka J, Hoe MH, Takechi Y, Hartl FU, Rothman JE, and Houghton AN.** Induction of cellular immunity by immunization with novel hybrid peptides complexed to heat shock protein 70. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 3485-3490, 2000.
- 141. Flynn GC, Pohl J, Flocco MT, and Rothman JE.** Peptide-binding specificity of the molecular chaperone BiP. *Nature* 353: 726-730, 1991.

- 142. Castelli C, Rivoltini L, Rini F, Belli F, Testori A, Maio M, Mazzaferro V, Coppa J, Srivastava PK, and Parmiani G.** Heat shock proteins: biological functions and clinical application as personalized vaccines for human cancer. *Cancer Immunol Immunother* 53: 227-233, 2004.
- 143. Parmiani G, Testori A, Maio M, Castelli C, Rivoltini L, Pilla L, Belli F, Mazzaferro V, Coppa J, Patuzzo R, Sertoli MR, Hoos A, Srivastava PK, and Santinami M.** Heat shock proteins and their use as anticancer vaccines. *Clin Cancer Res* 10: 8142-8146, 2004.
- 144. Nicchitta CV.** Re-evaluating the role of heat-shock protein-peptide interactions in tumour immunity. *Nat Rev Immunol* 3: 427-432, 2003.
- 145. Janetzki S, Palla D, Rosenhauer V, Lochs H, Lewis JJ, and Srivastava PK.** Immunization of cancer patients with autologous cancer-derived heat shock protein gp96 preparations: a pilot study. *Int J Cancer* 88: 232-238, 2000.
- 146. Ye Z and Gan YH.** Flagellin contamination of recombinant heat shock protein 70 is responsible for its activity on T cells. *J Biol Chem* 282: 4479-4484, 2007.
- 147. Gao B and Tsan MF.** 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: 174-179, 2003.
- 148. Gao B and Tsan MF.** Recombinant human heat shock protein 60 does not induce the release of tumor necrosis factor alpha from murine macrophages. *J Biol Chem* 278: 22523-22529, 2003.

- 149. Bausinger H, Lipsker D, Ziylan U, Manie S, Briand JP, Cazenave JP, Muller S, Haeuw JF, Ravanat C, de la Salle H, and Hanau D.** Endotoxin-free heat-shock protein 70 fails to induce APC activation. *Eur J Immunol* 32: 3708-3713, 2002.
- 150. Tsan MF and Gao B.** Cytokine function of heat shock proteins. *Am J Physiol Cell Physiol* 286: C739-744, 2004.
- 151. Tsan MF and Gao B.** Endogenous ligands of Toll-like receptors. *J Leukoc Biol* 76: 514-519, 2004.
- 152. Tsan MF and Gao B.** Heat shock protein and innate immunity. *Cell Mol Immunol* 1: 274-279, 2004.
- 153. Wallin RP, Lundqvist A, More SH, von Bonin A, Kiessling R, and Ljunggren HG.** Heat-shock proteins as activators of the innate immune system. *Trends Immunol* 23: 130-135, 2002.
- 154. Buchberger A, Schroder H, Buttner M, Valencia A, and Bukau B.** A conserved loop in the ATPase domain of the DnaK chaperone is essential for stable binding of GrpE. *Nat Struct Biol* 1: 95-101, 1994.
- 155. Gassler CS, Wiederkehr T, Brehmer D, Bukau B, and Mayer MP.** Bag-1M accelerates nucleotide release for human Hsc70 and Hsp70 and can act concentration-dependent as positive and negative cofactor. *J Biol Chem* 276: 32538-32544, 2001.

156. Floto RA, MacAry PA, Boname JM, Mien TS, Kampmann B, Hair JR, Huey OS, Houben EN, Pieters J, Day C, Oehlmann W, Singh M, Smith KG, and Lehner PJ. Dendritic cell stimulation by mycobacterial Hsp70 is mediated through CCR5. *Science* 314: 454-458, 2006.
157. Whittall T, Wang Y, Younson J, Kelly C, Bergmeier L, Peters B, Singh M, and Lehner T. Interaction between the CCR5 chemokine receptors and microbial HSP70. *Eur J Immunol* 36: 2304-2314, 2006.
158. MacAry PA, Javid B, Floto RA, Smith KG, Oehlmann W, Singh M, and Lehner PJ. HSP70 peptide binding mutants separate antigen delivery from dendritic cell stimulation. *Immunity* 20: 95-106, 2004.
159. Marteau F, Communi D, Boeynaems JM, and Suarez Gonzalez N. Involvement of multiple P2Y receptors and signaling pathways in the action of adenine nucleotides diphosphates on human monocyte-derived dendritic cells. *J Leukoc Biol* 76: 796-803, 2004.
160. Idzko M, Dichmann S, Ferrari D, Di Virgilio F, Ia Sala A, Girolomoni G, Panther E, and Norgauer J. Nucleotides induce chemotaxis and actin polymerization in immature but not mature human dendritic cells via activation of pertussis toxin-sensitive P2y receptors. *Blood* 100: 925-932, 2002.
161. Di Virgilio F, Chiozzi P, Ferrari D, Falzoni S, Sanz JM, Morelli A, Torboli M, Bolognesi G, and Baricordi OR. Nucleotide receptors: an emerging family of regulatory molecules in blood cells. *Blood* 97: 587-600, 2001.

- 162. Berchtold S, Ogilvie AL, Bogdan C, Muhl-Zurbes P, Ogilvie A, Schuler G, and Steinkasserer A.** Human monocyte derived dendritic cells express functional P2X and P2Y receptors as well as ecto-nucleotidases. *FEBS Lett* 458: 424-428, 1999.
- 163. Jonuleit H, Kuhn U, Muller G, Steinbrink K, Paragnik L, Schmitt E, Knop J, and Enk AH.** Pro-inflammatory cytokines and prostaglandins induce maturation of potent immunostimulatory dendritic cells under fetal calf serum-free conditions. *Eur J Immunol* 27: 3135-3142, 1997.
- 164. Fanger NA, Wardwell K, Shen L, Tedder TF, Guyre PM.** Type I (CD64) and type II (CD32) Fcγ receptor mediated phagocytosis by human blood dendritic cells. *J. Immunol.* 157: 541, 1996
- 165. Kroczek RA, Mages HW, and Hutloff A.** Emerging paradigms of T-cell co-stimulation. *Curr Opin Immunol* 16: 321-327, 2004.
- 166. Sharpe AH and Freeman GJ.** The B7-CD28 superfamily. *Nat Rev Immunol* 2: 116-126, 2002.
- 167. Lechmann M, Berchtold S, Hauber J, and Steinkasserer A.** CD83 on dendritic cells: more than just a marker for maturation. *Trends Immunol* 23: 273-275, 2002.
- 168. Lechmann M, Zinser E, Golka A, and Steinkasserer A.** Role of CD83 in the immunomodulation of dendritic cells. *Int Arch Allergy Immunol* 129: 113-118, 2002.

- 169. Frasca L, Fedele G, Deaglio S, Capuano C, Palazzo R, Vaisitti T, Malavasi F, and Ausiello CM.** CD38 orchestrates migration, survival, and Th1 immune response of human mature dendritic cells. *Blood* 107: 2392-2399, 2006.
- 170. Norbury CC.** Drinking a lot is good for dendritic cells. *Immunology* 117: 443-451, 2006.
- 171. Sallusto F, Cella M, Danieli C, and Lanzavecchia A.** Dendritic cells use macropinocytosis and the mannose receptor to concentrate macromolecules in the major histocompatibility complex class II compartment: downregulation by cytokines and bacterial products. *J Exp Med* 182: 389-400, 1995.
- 172. Hirayama K, Akashi S, Furuya M, and Fukuhara K.** Rapid confirmation and revision of the primary structure of bovine serum albumin by ESIMS and Frit-FAB LC/MS. *Biochem Biophys Res Commun* 173: 639-646, 1990.
- 173. Brehmer D, Rudiger S, Gassler CS, Klostermeier D, Packschies L, Reinstein J, Mayer MP, and Bukau B.** Tuning of chaperone activity of Hsp70 proteins by modulation of nucleotide exchange. *Nat Struct Biol* 8: 427-432, 2001.
- 174. Palleros DR, Shi L, Reid KL, and Fink AL.** hsp70-protein complexes. Complex stability and conformation of bound substrate protein. *J Biol Chem* 269: 13107-13114, 1994.
- 175. Accapezzato D, Visco V, Francavilla V, Molette C, Donato T, Paroli M, Mondelli MU, Doria M, Torrisi MR, and Barnaba V.** Chloroquine enhances human CD8+ T cell responses against soluble antigens in vivo. *J Exp Med* 202: 817-828, 2005.

- 176. Watts C.** Capture and processing of exogenous antigens for presentation on MHC molecules. *Annu Rev Immunol* 15: 821-850, 1997.
- 177. De Feo P, Volpi E, Lucidi P, Cruciani G, Santeusano F, Bolli GB, and Brunetti P.** Chloroquine reduces whole body proteolysis in humans. *Am J Physiol* 267: E183-186, 1994.
- 178. Tobian AA, Canaday DH, Boom WH, and Harding CV.** Bacterial heat shock proteins promote CD91-dependent class I MHC cross-presentation of chaperoned peptide to CD8<sup>+</sup> T cells by cytosolic mechanisms in dendritic cells versus vacuolar mechanisms in macrophages. *J Immunol* 172: 5277-5286, 2004.
- 179. Tobian AA, Harding CV, and Canaday DH.** Mycobacterium tuberculosis heat shock fusion protein enhances class I MHC cross-processing and -presentation by B lymphocytes. *J Immunol* 174: 5209-5214, 2005.
- 180. Gullo CA and Teoh G.** Heat shock proteins: to present or not, that is the question. *Immunol Lett* 94: 1-10, 2004.
- 181. Li Z.** In vitro reconstitution of heat shock protein-peptide complexes for generating peptide-specific vaccines against cancers and infectious diseases. *Methods* 32: 25-28, 2004.
- 182. Kurotaki T, Tamura Y, Ueda G, Oura J, Kutomi G, Hirohashi Y, Sahara H, Torigoe T, Hiratsuka H, Sunakawa H, Hirata K, Sato N.** Efficient cross-presentation by heat shock protein 90-peptide complex-loaded dendritic cells via an endosomal pathway. *J Immunol* 179: 1803-1813, 2007

- 183. Banki Z, Kacani L, Mullauer B, Wilflingseder D, Obermoser G, Niederegger H, Schennach H, Sprinzl GM, Sepp N, Erdei A, Dierich MP, and Stoiber H.** Cross-linking of CD32 induces maturation of human monocyte-derived dendritic cells via NF-kappa B signaling pathway. *J Immunol* 170: 3963-3970, 2003.
- 184. Ia Sala A, Ferrari D, Corinti S, Cavani A, Di Virgilio F, and Girolomoni G.** Extracellular ATP induces a distorted maturation of dendritic cells and inhibits their capacity to initiate Th1 responses. *J Immunol* 166: 1611-1617, 2001.
- 185. Takeda S and McKay DB.** Kinetics of peptide binding to the bovine 70 kDa heat shock cognate protein, a molecular chaperone. *Biochemistry* 35: 4636-4644, 1996.
- 186. Palliser D, Guillen E, Ju M, and Eisen HN.** Multiple intracellular routes in the cross-presentation of a soluble protein by murine dendritic cells. *J Immunol* 174: 1879-1887, 2005.
- 187. Winau F, Sponaas AM, Weber S, Schwierzeck V, Winter R, Hurwitz R, and Kaufmann SH.** Scant activation of CD8 T cells by antigen loaded on heat shock protein. *Eur J Immunol* 35: 1046-1055, 2005.
- 188. Multhoff G.** Heat shock proteins in immunity. *Handb Exp Pharmacol*: 279-304, 2006.
- 189. Zeng Y, Chen X, Larmonier N, Larmonier C, Li G, Sepassi M, Marron M, Andreansky S, and Katsanis E.** Natural killer cells play a key role in the antitumor immunity generated by chaperone-rich cell lysate vaccination. *Int J Cancer* 119: 2624-2631, 2006.



- 190. Multhoff G.** Activation of natural killer cells by heat shock protein 70. *Int J Hyperthermia* 18: 576-585, 2002.
- 191. Cooper MA, Fehniger TA, and Caligiuri MA.** The biology of human natural killer-cell subsets. *Trends Immunol* 22: 633-640, 2001.
- 192. van Eden W, van der Zee R, and Prakken B.** Heat-shock proteins induce T-cell regulation of chronic inflammation. *Nat Rev Immunol* 5: 318-330, 2005.
- 193. Fischer HP, Sharrock CE, and Panayi GS.** High frequency of cord blood lymphocytes against mycobacterial 65-kDa heat-shock protein. *Eur J Immunol* 22: 1667-1669, 1992.
- 194. Cohen IR.** Autoimmunity to chaperonins in the pathogenesis of arthritis and diabetes. *Annu Rev Immunol* 9: 567-589, 1991.
- 195. Newcomb JR and Cresswell P.** Characterization of endogenous peptides bound to purified HLA-DR molecules and their absence from invariant chain-associated alpha beta dimers. *J Immunol* 150: 499-507, 1993.
- 196. Chicz RM, Urban RG, Gorga JC, Vignali DA, Lane WS, and Strominger JL.** Specificity and promiscuity among naturally processed peptides bound to HLA-DR alleles. *J Exp Med* 178: 27-47, 1993.
- 197. Anderton SM, van der Zee R, Prakken B, Noordzij A, and van Eden W.** Activation of T cells recognizing self 60-kD heat shock protein can protect against experimental arthritis. *J Exp Med* 181: 943-952, 1995.

- 198. Paul AG, van Kooten PJ, van Eden W, and van der Zee R.** Highly autoproliiferative T cells specific for 60-kDa heat shock protein produce IL-4/IL-10 and IFN-gamma and are protective in adjuvant arthritis. *J Immunol* 165: 7270-7277, 2000.
- 199. Campbell DJ and Ziegler SF.** FOXP3 modifies the phenotypic and functional properties of regulatory T cells. *Nat Rev Immunol* 7: 305-310, 2007.
- 200. Hori S, Nomura T, and Sakaguchi S.** Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science* 299: 1057-1061, 2003.
- 201. Fontenot JD, Gavin MA, and Rudensky AY.** Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. *Nat Immunol* 4: 330-336, 2003.
- 202. Khattri R, Cox T, Yasayko SA, and Ramsdell F.** An essential role for Scurfin in CD4+CD25+ T regulatory cells. *Nat Immunol* 4: 337-342, 2003.
- 203. Sakaguchi S, Sakaguchi N, Asano M, Itoh M, and Toda M.** Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J Immunol* 155: 1151-1164, 1995.
- 204. Wildin RS, Ramsdell F, Peake J, Faravelli F, Casanova JL, Buist N, Levy-Lahad E, Mazzella M, Goulet O, Perroni L, Bricarelli FD, Byrne G, McEuen M, Proll S, Appleby M, and Brunkow ME.** X-linked neonatal diabetes mellitus, enteropathy and endocrinopathy syndrome is the human equivalent of mouse scurfy. *Nat Genet* 27: 18-20, 2001.

- 205. Bennett CL, Christie J, Ramsdell F, Brunkow ME, Ferguson PJ, Whitesell L, Kelly TE, Saulsbury FT, Chance PF, and Ochs HD.** The immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome (IPEX) is caused by mutations of FOXP3. *Nat Genet* 27: 20-21, 2001.
- 206. Brunkow ME, Jeffery EW, Hjerrild KA, Paepfer B, Clark LB, Yasayko SA, Wilkinson JE, Galas D, Ziegler SF, and Ramsdell F.** Disruption of a new forkhead/winged-helix protein, scurf, results in the fatal lymphoproliferative disorder of the scurfy mouse. *Nat Genet* 27: 68-73, 2001.
- 207. Wang J, Ioan-Facsinay A, van der Voort EI, Huizinga TW, and Toes RE.** Transient expression of FOXP3 in human activated nonregulatory CD4+ T cells. *Eur J Immunol* 37: 129-138, 2007.
- 208. Moghimi SM, Hunter AC, and Murray JC.** Nanomedicine: current status and future prospects. *Faseb J* 19: 311-330, 2005.
- 209. Hunter AC and Moghimi SM.** Therapeutic synthetic polymers: a game of Russian roulette? *Drug Discov Today* 7: 998-1001, 2002.
- 210. Zou W.** Regulatory T cells, tumour immunity and immunotherapy. *Nat Rev Immunol* 6: 295-307, 2006.
- 211. Raz I, Avron A, Tamir M, Metzger M, Symer L, Eldor R, Cohen IR, and Elias D.** Treatment of new-onset type 1 diabetes with peptide DiaPep277 is safe and associated with preserved beta-cell function: extension of a randomized, double-blind, phase II trial. *Diabetes Metab Res Rev* 23: 292-298, 2007.

- 212. Prakken BJ, Samodal R, Le TD, Giannoni F, Yung GP, Scavulli J, Amox D, Roord S, de Kleer I, Bonnin D, Lanza P, Berry C, Massa M, Billetta R, and Albani S.** Epitope-specific immunotherapy induces immune deviation of proinflammatory T cells in rheumatoid arthritis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 4228-4233, 2004.
- 213. Raz I, Elias D, Avron A, Tamir M, Metzger M, and Cohen IR.** Beta-cell function in new-onset type 1 diabetes and immunomodulation with a heat-shock protein peptide (DiaPep277): a randomised, double-blind, phase II trial. *Lancet* 358: 1749-1753, 2001.
- 214. Albani S, Keystone EC, Nelson JL, Ollier WE, La Cava A, Montemayor AC, Weber DA, Montecucco C, Martini A, and Carson DA.** Positive selection in autoimmunity: abnormal immune responses to a bacterial dnaJ antigenic determinant in patients with early rheumatoid arthritis. *Nat Med* 1: 448-452, 1995.
- 215. Rosenthal M, Bahous I, and Ambrosini G.** Longterm treatment of rheumatoid arthritis with OM-8980. A retrospective study. *J Rheumatol* 18: 1790-1793, 1991.
- 216. Haring JS, Badovinac VP, and Harty JT.** Inflaming the CD8+ T cell response. *Immunity* 25: 19-29, 2006.
- 217. Zanetti M and Franchini G.** T cell memory and protective immunity by vaccination: is more better? *Trends Immunol* 27: 511-517, 2006.
- 218. Bloom H, Beier H, Gross HS,** *Elektrophoresis* 8, 93-99, 1987

- 219. Mayer MP.** A new set of useful cloning and expression vectors derived from pBlueScript. *Gene* 163: 41-46, 1995.
- 220. Visseren MJ, van Elsas A, van der Voort EI, Rensing ME, Kast WM, Schrier PI, and Melief CJ.** CTL specific for the tyrosinase autoantigen can be induced from healthy donor blood to lyse melanoma cells. *J Immunol* 154: 3991-3998, 1995.
- 221. Kawakami Y, Eliyahu S, Delgado CH, Robbins PF, Sakaguchi K, Appella E, Yannelli JR, Adema GJ, Miki T, and Rosenberg SA.** Identification of a human melanoma antigen recognized by tumor-infiltrating lymphocytes associated with in vivo tumor rejection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91: 6458-6462, 1994.
- 222. Kawakami Y, Eliyahu S, Sakaguchi K, Robbins PF, Rivoltini L, Yannelli JR, Appella E, and Rosenberg SA.** Identification of the immunodominant peptides of the MART-1 human melanoma antigen recognized by the majority of HLA-A2-restricted tumor infiltrating lymphocytes. *J Exp Med* 180: 347-352, 1994.
- 223. Salter RD, Howell DN, and Cresswell P.** Genes regulating HLA class I antigen expression in T-B lymphoblast hybrids. *Immunogenetics* 21: 235-246, 1985.
- 224. Grundler W, Dirscherl P, Beisker W, Marx K, Stampfl A, Maier K, Zimmermann I, and Nusse M.** Early functional apoptotic responses of thymocytes induced by Tri-n-butyltin. *Cytometry* 44: 45-56, 2001.

- 225. Panther E, Corinti S, Idzko M, Herouy Y, Napp M, Ia Sala A, Girolomoni G, and Norgauer J.** Adenosine affects expression of membrane molecules, cytokine and chemokine release, and the T-cell stimulatory capacity of human dendritic cells. *Blood* 101: 3985-3990, 2003.

## 8. Abkürzungen

Abb	Abbildung
ADP	Adenosindiphosphat
ALP	Alkaline Phosphatase
ATP	Adenosintriphosphat
APCs	Antigen-präsentierende Zellen ( <i>antigen presenting cells</i> )
APC	Allophycocyanin
BCIP	5-Brom-4-chlor-3-indoxylphosphat
BSA	Rinderserum-Albumin ( <i>bovine serum albumin</i> )
DCs	dendritische Zellen ( <i>Dendritic cells</i> )
DMSO	Dimethylsulfoxid
CD	Differenzierungscluster ( <i>cluster of differentiation</i> )
E.coli	Escherichia coli
Elisa	<i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i>
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ERAD	ER assoziierte Degradation
FACS	Fluoreszenz-aktivierter Zell-Scanner ( <i>fluorescence activated cell scanner</i> )
FCS	Fötales Kälberserum ( <i>fetal calf serum</i> )
FITC	Fluoreszenzisothiocyanat
Fl	Fluoreszenz
FPLC	<i>Fast performance liquid chromatography</i>
GM-CSF	Granulozyten Makrophagen koloniestimulierender Faktor
h	Stunde
HLA	Humanes Leukozyten-Antigen
HRP	Meerrettichperoxidase ( <i>Horseradish peroxidase</i> )
HS	Humanserum
rhuHsp	rekombinantes humanes Hitzeschockprotein ( <i>recombinant human heat shock protein</i> )
IL	Interleukin
kD	Kilodalton
LCL	Lymphozytenzelllinie ( <i>Lymphocyte Cell Line</i> )

## Abkürzungen

LPS	Lipopolysaccharid
MHC	Haupthistokompatibilitäts-Komplex ( <i>major histocompatibility complex</i> )
min	Minute
MWABW	Mittelwertabweichung
MWCO	Molekulargewichtsausschlussgrenze ( <i>Molecular weight cut off</i> )
NBT	Nitroblau-Tetrazoliumchlorid
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
OD	Optische Dichte
PAMP	<i>Pattern-associated molecular pattern</i>
PBL	Periphere Blutlymphozyten
PB	<i>Pacific Blue</i>
PE	Phycoerythrin
PerCP	Peridinin Chlorophyll Protein
PFA	Paraformaldehyd
PGE <sub>2</sub>	Prostaglandin E <sub>2</sub>
PMSF	Phenylmethansulfonylfluorid
PRR	<i>Pattern recognition receptor</i>
rhu	Rekombiant human
RT	Raumtemperatur
TAA	Tumor assoziiertes Antigen ( <i>tumor associated antigen</i> )
TAP	<i>Transporter associated with antigen presentation</i>
TMB	Tetramethylbenzidin
TNF	Tumornekrosefaktor



## 9. Danksagung

Ich danke allen, die zum Gelingen der Dissertation beigetragen haben.

Frau PD Dr. Elfriede Nößner danke ich für die Betreuung der Dissertation.

Herrn Prof. Issels danke ich für die Unterstützung mit finanziellen Mitteln, für sein Interesse und Engagement in der Forschung.

Bei Frau Prof. Dr. Johnson bedanke ich mich für die Betreuung der Dissertation.

Frau Prof. Dolores Schendel danke ich für Ihre Unterstützung.

Herrn Dr. Stephan Walter danke ich für die fachliche Beratung bezüglich aller biochemischer Fragen das Hsp70 betreffend.

Otmar Hainzel danke ich für die Unterstützung bei der Biacore-Messung und der Publikation.

Anna Brandl danke ich für die Hilfe bei der Zellkultur.

Bei Doreen Hammer bedanke ich mich für ihre Hilfe bei der Reinigung von rhuHsp70.

Daniel Neumann danke ich für seine Hilfe bei der Reinigung von rhuHsp70.

Maxie Endres danke ich für die Einweisung in die Aufreinigung von Proteinen.

Sibylle Ruhland danke ich für die Unterstützung bei der Publikation.

Herrn Dr. Ellwart und Frau Nispel danke ich für Ihre Unterstützung bei der Messung des Calciumioneneinstroms.

## 10. Lebenslauf

Henriette Bendz, geb. Husar

Geburtstag	12.08.1977
Geburtsort	Zittau
08/2007-11/2003	Promotion am Institut für Immunologie der LMU München/ Kooperation KKG Hyperthermie LMU München/GSF
03/2002-10/2003	Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Departments für Pharmazie der LMU München
05/01-11/01	Pharmaziepraktikum, Gisela-Apotheke, München
10/00-04/01	Pharmaziepraktikum, Liebig-Apotheke, Leipzig
09/1996-12/2001	Studium der Pharmazie, Universität Leipzig
12/01	3. Staatsexamen (Durchschnittsnote: 1,0)
09/00	2. Staatsexamen (Durchschnittsnote: 1,0)
08/98	1. Staatsexamen (Durchschnittsnote: 2,0)
07/1992-07/1996	Schliebengymnasium, Zittau Abschluss: Abitur (Durchschnittsnote: 1,0)
07/1988-06/1992	Polytechnische Oberschule, Zittau
08/1984-06/1988	Grundschule, Hartau

- Vorträge:                    „Herstellung rekombinanter Hitzeschock-Proteine zur adjuvanten Tumorthherapie „;GMB-Workshop:  
Translation: Von der Forschung zur klinischen Prüfung;  
13.Juni 2005, GBF Braunschweig,
- SFB Retreat 455; September 2005; Wildbad Kreuth
- Veröffentlichungen:       H. Bendz, S.C. Ruhland, M.P. Pandya, O. Hainzl, S.  
Riegelsberger, C. Bräuchle, M.P. Mayer, J. Buchner,  
R.D. Issels, E. Nößner
- Human heat shock protein enhances tumor antigen presentation through complex formation and intracellular antigen delivery without innate signaling;*  
JBC, 2007