

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung der Doktorwürde
der
Naturwissenschaftlich-Mathematischen Gesamtfakultät
der
Ruprecht-Karls-Universität
Heidelberg

vorgelegt von
Diplom-Biologin (t.o.)
Marie-Cristine Kühnle
aus Böblingen

Tag der mündlichen Prüfung:

Hitzeschockprotein-Tumorantigen-Fusionsproteine als Vakzinen gegen Brustkrebs

Erstgutachter: Prof. Dr. Günter J. Hämmerling
Zweitgutachter: PD Dr. Martin Müller

Danksagung

Die vorliegende Arbeit entstand in der Abteilung „Molekulare Immunologie“ des Deutschen Krebsforschungszentrums, Heidelberg in der Zeit von Dezember 2004 bis Mai 2008.

Ein herzlicher Dank an alle, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben:

- PD Dr. Frank Momburg für die Bereitstellung des interessanten Themas, die gute wissenschaftliche Betreuung und seine stete Diskussionsbereitschaft.
- Prof. Dr. Günter J. Hämmerling für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes und die gute Unterstützung.
- PD Dr. Martin Müller, der mich in das Insektenzellexpressionssystem einweihte und sich freundlicherweise dazu bereit erklärt hat, diese Arbeit vor der Fakultät zu vertreten.
- PD Dr. Philipp Beckhove für die Kooperation und die Bereitstellung des klinischen Materials sowie seiner Arbeitsgruppe, insbesondere Yingzi Ge, Simone Jünger, Mariana Bucur und Linda Horst für die Einweisung in das Arbeiten mit humanen Primärkulturen und die Unterstützung bei sämtlichen Fragestellungen.
- Prof. Dr. François Lemonnier, Prof. Dr. Hermann Bujard, Dr. Wolfram Osen, Angela Funk und Silke Trüffel-Augustin für die Bereitstellung der HHD-Mäuse und die Unterstützung in der Mausearbeit.
- Dr. Annette Paschen für ihre Hilfe bei der DC-Kultur.
- Dr. Simona Vertuani für die Bereitstellung der Tumorzelllinien.
- Dr. Boris Marincek und Dr. Sandra Lüttgau für ihre Anregungen und Unterstützung in wissenschaftlicher und moralischer Hinsicht.
- Jessica Zell und Petra Ludwig für ihre unermüdliche Hilfe bei der Proteinexpression.
- Jürgen Kretschmer für seine Unterstützung bei der Gelfiltration.
- Jessica Kienz, Antje Giersch, Lene Hansen, Meike Schwan und Kathrin Adolph für ihre tatkräftige Unterstützung im Labor und der schönen Arbeitsatmosphäre.
- Elke Deibel, Beatrix Imkeit, Gabriele Schulze, Simone Platzek, Walter Henrich, Alexander Voise und allen Mitarbeitern des Tierstalles für die unermüdliche Pflege der vielen Tiere.
- Der gesamten Arbeitsgruppe für das freundliche und offene Arbeitsklima, die große Hilfsbereitschaft und die gute Zusammenarbeit.
- Meinen Eltern, meinem Bruder und Darius für ihre Hilfe und Unterstützung und das mir entgegengebrachte Verständnis während der Dissertationsarbeit.

Inhaltsangabe

| | | |
|------------|--|----|
| 1 | Zusammenfassung | 1 |
| 2 | Summary | 3 |
| 3 | Einleitung | 5 |
| 3.1 | Das Immunsystem | 5 |
| | 3.1.1 Die angeborene Immunität..... | 5 |
| | 3.1.2 Die erworbene Immunität | 6 |
| 3.2 | Die MHC-Moleküle | 8 |
| 3.3 | Die klassische Antigenpräsentation | 10 |
| 3.4 | Die Kreuzpräsentation exogener Antigene auf MHC-Klasse-I-Moleküle | 11 |
| 3.5 | Die Rolle der dendritischen Zellen in der Antigenpräsentation | 14 |
| 3.6 | Die Hitzeschockproteine | 16 |
| 3.7 | Das Mammakarzinomantigen HER2/neu | 19 |
| 3.8 | Vakzinierungsstrategien | 21 |
| 3.9 | Ziele der Arbeit | 24 |
| 4 | Materialien | 27 |
| 4.1 | DNA | 27 |
| | 4.1.1 Vektoren | 27 |
| | 4.1.2 cDNA | 27 |
| | 4.1.3 Primer zur Genotypisierung der HHDII-Mäuse | 27 |
| | 4.1.4 Primer zur Klonierung der Hsp-HER2/neu-Fusionsproteine | 27 |
| | 4.1.5 DNA-Marker | 28 |
| 4.2 | Peptide | 28 |
| | 4.2.1 CD8 ⁺ T-Zellepitope..... | 28 |
| | 4.2.2 CD4 ⁺ T-Helferepitope | 29 |
| 4.3 | Enzyme und Antikörper | 29 |
| | 4.3.1 Enzyme | 29 |
| | 4.3.2 Antikörper | 29 |
| 4.4 | Bakterienkultur | 30 |
| | 4.4.1 Bakterienstämme | 30 |
| | 4.4.2 Medien für Bakterien | 31 |
| 4.5 | Eukaryontische Zellkultur | 32 |
| | 4.5.1 Eukaryontische Zelllinien..... | 32 |
| | 4.5.2 Medien für eukaryontische Zellkultur | 32 |
| 4.6 | Mausstämme | 33 |
| 4.7 | Kitsysteme | 33 |
| 4.8 | Materialien und Geräte | 33 |
| | 4.8.1 Verbrauchsmaterialien | 33 |

| | | |
|------------|--|-----------|
| 4.8.2 | Geräte..... | 34 |
| 4.9 | Chemikalienliste..... | 35 |
| 5 | Methoden | 39 |
| 5.1 | Molekularbiologische Methoden | 39 |
| 5.1.1 | Polymerase-Kettenreaktion (PCR) | 39 |
| 5.1.2 | Restriktionsverdau | 39 |
| 5.1.3 | Agarosegelelektrophorese | 40 |
| 5.1.4 | Isolierung und Reinigung von DNA-Fragmenten..... | 40 |
| 5.1.5 | DNA-Ligation | 40 |
| 5.1.6 | DNA-Fällung, Konzentrationsbestimmung und Sequenzierung | 41 |
| 5.1.7 | Herstellung von chemokompetenten Bakterien | 41 |
| 5.1.8 | Transformation von <i>E. coli</i> für die Klonierung..... | 42 |
| 5.1.9 | Plasmidisolation aus <i>E. coli</i> | 42 |
| 5.2 | Proteinbiochemische Methoden | 43 |
| 5.2.1 | Lagerung und Kultivierung von <i>E.coli</i> zur Proteinexpression | 43 |
| 5.2.2 | Transformation von <i>E.coli</i> | 43 |
| 5.2.3 | Expression der Hitzeschockfusionsproteine in <i>E.coli</i> | 43 |
| 5.2.4 | Lyse der Bakterien | 44 |
| 5.2.5 | Aufreinigung der Proteine über Affinitätschromatographie..... | 44 |
| 5.2.6 | SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) | 47 |
| 5.2.7 | Detektion der eluierten Proteine | 47 |
| 5.2.8 | Dialyse der eluierten Proteine..... | 49 |
| 5.2.9 | Konzentrations- bzw. Endotoxingehaltsbestimmung und Proteinlagerung | 49 |
| 5.3 | Zellbiologische Methoden | 50 |
| 5.3.1 | Kultivierung von eukaryontischen Zellen | 50 |
| 5.3.2 | Einfrieren und Auftauen von eukaryontischen Zellen..... | 50 |
| 5.3.3 | Transfektion von eukaryontischen Zellen | 51 |
| 5.3.4 | Proteinexpression in eukaryontischen Zellen | 53 |
| 5.3.5 | Durchflusszytometrische Untersuchungen von eukaryontischen Zellen | 53 |
| 5.3.6 | Peptidbindungsassay | 55 |
| 5.3.7 | Isolierung von mononukleären Zellen aus humanem Blut und Knochenmark | 55 |
| 5.3.8 | Kultivierung und Stimulation von murinen BMDC aus dem Knochenmark..... | 56 |
| 5.3.9 | <i>In vitro</i> Restimulation von T-Zellen | 56 |
| 5.3.10 | Nachweis der T-Zellaktivität im ELISPOT | 57 |
| 5.4 | Methoden zur Arbeit mit Mäusen | 58 |
| 5.4.1 | Zucht und Haltung der Tiere | 58 |
| 5.4.2 | DNA-Isolation aus Schwanzbiopsien transgener Mäusen | 58 |
| 5.4.3 | Injektionen bei Mäusen | 58 |
| 5.4.4 | Organentnahme bei Mäusen | 59 |

| | | |
|------------|---|------------|
| 5.4.5 | Herstellung von Einzelzellsuspensionen aus Milzen und Lymphknoten | 59 |
| 5.4.6 | Lyse der Erythrozyten..... | 59 |
| 5.4.7 | Entnahme von Knochenmark und Isolation von BMDC..... | 59 |
| 5.4.8 | <i>In vivo</i> Zytotoxizitätsanalysen..... | 60 |
| 5.4.9 | Überwachung von Tumorwachstum in BALB/c-Mäusen | 61 |
| 6 | Ergebnisse | 62 |
| 6.1 | Klonierung der Hsp-HER2/neu-Fusionsproteine | 62 |
| 6.1.1 | Klonierung der His-Hsp-HER2/neu-SBP-Fusionsproteine in pRSETB | 63 |
| 6.1.2 | Klonierung der Hsp-HER2/neu-SBP-His-Fusionsproteine in pET21d | 66 |
| 6.1.3 | Klonierung der Hsp-HER2/neu-SBP-His-Fusionsproteine mit K ^d -Epitopen | 68 |
| 6.1.4 | Klonierung der Fusionsproteine zur Expression in Eukaryonten..... | 70 |
| 6.1.5 | Klonierung der MHC:Peptid-Dimere..... | 70 |
| 6.2 | Expression der Hsp-HER2/neu-Fusionsproteine | 71 |
| 6.2.1 | Testexpression in BL21(DE3)pLysS | 71 |
| 6.2.2 | Aufreinigung der His-Hsp-HER2/neu-SBP-Fusionsproteine..... | 73 |
| 6.2.3 | Aufreinigung der Hsp-HER2/neu-SBP-His-Proteine über Nickel-Affinitätschromatographie | 76 |
| 6.2.4 | Abreicherung des bakteriellen Lipopolysaccharids in den eluierten Proteinen | 80 |
| 6.2.5 | Expression der Hsp-HER2/neu-Fusionsproteine in Eukaryonten | 81 |
| 6.2.6 | Expression der MHC:Peptid-Dimere in HEK293T-Zellen | 83 |
| 6.3 | Induktion einer HER2/neu-spezifischen Immunantwort durch die Hsp-HER2/neu-Fusionsproteine <i>in vivo</i> | 85 |
| 6.3.1 | Etablierung der HER2/neu-spezifischen Immunantwort in BALB/c..... | 85 |
| 6.3.2 | Etablierung der Proteinimmunisierung in BALB/c..... | 87 |
| 6.3.3 | Vergleich der Immunogenität der Hsp-HER2/neu-Fusionsproteine in BALB/c..... | 90 |
| 6.3.4 | Titration des Adjuvans CpG..... | 92 |
| 6.3.5 | Titration der Hitzeschockfusionsproteine | 94 |
| 6.3.6 | Vergleich der Immunogenität der Hsp-HER2/neu ₂₆₋₁₃₆ -Fusionsproteine..... | 96 |
| 6.3.7 | Etablierung der HER2/neu-spezifischen Immunantwort in HHD-Mäusen | 97 |
| 6.3.8 | Vergleich der Immunogenität der Hsp-HER2/neu ₂₉₉₋₅₇₉ -Fusionsproteine in HHD-Mäusen | 99 |
| 6.3.9 | Erhöhung der HER2/neu-spezifischen Immunität in HHD-Mäusen durch Peptidmodifikationen | 102 |
| 6.4 | Induktion einer Hsp-HER2/neu-Fusionsprotein vermittelten antitumoralen Immunantwort in BALB/c-Mäusen | 105 |
| 6.4.1 | Überprüfung der Tumorzelllinie D2F2/E2 auf HER2/neu-Expression | 105 |
| 6.4.2 | Inhibition des Tumorwachstums in BALB/c durch prophylaktische Immunisierung mit den Hsp-HER2/neu-Fusionsproteinen | 106 |

| | | |
|------------|---|-----|
| 6.4.3 | <i>Rechallenge</i> der tumorfreien BALB/c Mäuse nach prophylaktischer Immunisierung mit den Hsp-HER2/neu-Fusionsproteinen | 111 |
| 6.4.4 | Repression des Tumorwachstums durch therapeutische Immunisierung..... | 112 |
| 6.5 | Induktion einer HER2/neu-spezifischen Immunantwort durch die Hsp-HER2/neu-Fusionsproteine <i>in vitro</i> | 114 |
| 6.5.1 | Maturierung von murinen dendritischen Zellen aus dem Knochenmark | 114 |
| 6.5.2 | <i>In vitro</i> Restimulation der HER2/neu-spezifischen CD8 ⁺ T-Zellen durch Hsp-HER2/neu beladene BMDC..... | 116 |
| 6.6 | Darstellung der HER2/neu-spezifischen T-Zellen durch die MHC:Peptid-Dimere .. | 117 |
| 6.6.1 | Detektion TYLPTNASL-spezifischer T-Zellen in BALB/c-Mäusen | 118 |
| 6.6.2 | Detektion KIFGSLAFL-spezifischer T-Zellen aus humanen Spendern..... | 118 |
| 7 | Diskussion | 122 |
| 7.1 | Generierung der Hsp-HER2/neu-Fusionsproteine | 122 |
| 7.1.1 | Die Hsp-HER2/neu-Fusionsproteine mit C-terminalem Histidin-Tag können mit hoher Reinheit hergestellt werden | 123 |
| 7.1.2 | Die Hsp-HER2/neu-Fusionsproteine sind Endotoxin-abgereichert..... | 125 |
| 7.1.3 | Die Hsp-HER2/neu-Fusionsproteine können nicht in Eukaryonten hergestellt werden | 125 |
| 7.2 | Evaluierung des adjuvanten Hitzeschockproteinanteils in den Fusionsproteinen . | 126 |
| 7.2.1 | BALB/c-Mäuse entwickeln nach einer Peptidimmunisierung eine HER2/neu-..... spezifische Immunantwort..... | 126 |
| 7.2.2 | Zur Induktion einer HER2/neu-spezifischen Immunantwort durch die Hsp-Fusionsproteine wird zusätzliches Adjuvans benötigt..... | 125 |
| 7.2.3 | Der Immunogenitätsvorteil der Hsp-Fusionsproteine gegenüber dem Peptid ist ... CpG-abhängig..... | 130 |
| 7.2.4 | Die Proteine Hsp70-HER2/neu _{TE} , Hsc70-HER2/neu _{TE} und Hsp70L1-HER2/neu _{TE} ... induzieren eine CpG-unabhängige Tumorreprimierung nach prophylaktischer Immunisierung | 131 |
| 7.2.5 | Der Hsp-Anteil der Hsp-HER2/neu ₂₆₋₁₃₆ -Fusionsproteine zeigt keinen Adjuvans-effekt..... | 134 |
| 7.2.6 | Die Hsp-HER2/neu _{TE} -Fusionsproteine zeigen einen maturierenden Effekt auf dendritische Zellen | 136 |
| 7.3 | Hsp-HER2/neu-Fusionsprotein vermittelte Induktion einer HER2/neu-spezifischen Immunantwort gegen ein Selbstpeptid | 137 |
| 7.3.1 | Eine gegen das Selbstprotein HER2/neu gerichtete Immunantwort kann durch die Hsp-HER2/neu-Fusionsproteine nicht induziert werden..... | 138 |
| 7.3.2 | Peptidmodifikationen erhöhen die Immunantwort gegen das Selbstepitop KIFGSLAFL | 139 |

| | |
|--|------------|
| 7.4 Einsatz der MHC-Klasse-I:Peptid-Fc-Dimere zur Detektion antigenspezifischer .. T-Zellen | 141 |
| 7.5 Potential der Hitzeschockproteine in der Immuntherapie – ein Ausblick..... | 143 |
| 8 Literatur | 145 |
| 9 Anhang | 156 |
| 9.1 Unfusionierte Hitzeschockproteine | 156 |
| 9.2 Hsp-HER2/neu₂₉₉₋₅₇₉-Fusionsproteine mit HLA-A2-Epitopen für das HHD-System | 157 |
| 9.3 Hsp-HER2/neu-Fusionsproteine mit K^d-Epitopen für das BALB/c-System..... | 158 |
| 9.3.1 Hsp-HER2/neu(Tandemepitop) _{TE} -Fusionsproteine..... | 158 |
| 9.3.2 Hsp-HER2/neu _{1/26-136} -Fusionsproteine..... | 159 |
| 9.3.3 Hsp-HER2/neu ₂₆₋₁₃₆ -Fusionsproteine mit N-terminalem Zellpenetrierungspeptid tat | 160 |
| 9.4 MHC:Peptid-Dimere | 161 |
| 9.4.1 HLA-A2:KIFGSLAFL-IgG ₁ Fc-Dimer | 161 |
| 9.4.2 K ^d :TYLPTNASL-IgG ₁ Fc-Dimer..... | 162 |

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|------------------|---|
| ° C | Grad Celcius |
| µg | Mikrogramm |
| µl | Mikroliter |
| µM | Mikromolar |
| ABC | ATP-Bindungskassette |
| ADCC | Antikörperabhängige zellvermittelte Zytotoxizität |
| Amp | Ampicillin |
| APC | Allophycocyanin |
| APC | antigenpräsentierende Zelle |
| APS | Ammoniumperoxodisulfat |
| ATP | Adenosintriphosphat |
| BCR | B-Zellrezeptor |
| β ₂ m | β ₂ Mikroglobulin |
| BMDC | <i>bone marrow derived dendritic cells</i> |
| BMMC | <i>bone marrow derived mononuclear cells</i> |
| bp | Basenpaare |
| BSA | Rinderserumalbumin |
| bzw. | beziehungsweise |
| Cam | Chloramphenicol |
| CCR | Chemokinrezeptor |
| CD | Differenzierungscluster |
| CD95L | CD95 Ligand |
| cDNA | komplementäre Desoxyribonukleinsäure |
| CFA | komplettes Freund-Adjuvans |
| CFSE | 5,6-Carboxylfluorescein-diacetat-succinimidyl-ester |
| CIAP | <i>calf intestine alkaline phosphatase</i> |
| CLIP | <i>class II associated invariant chain peptide</i> |
| cm | Zentimeter |
| CMV | Cytomegalievirus |
| ConA | Concanavalin A |
| CpG | Cytosin-phosphatidyl-Guanosin-reiches Oligonukleotid |
| C-terminal | carboxyterminal |
| DC | dendritische Zellen |
| D-MEM | <i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i> |
| DMF | Dimethylformamid |
| DMSO | Dimethylsulfoxid |
| DNA | Desoxyribonukleinsäure |
| dNTP | Desoxyribonukleotidtriphosphat |
| dsDNA | doppelsträngige Desoxyribonukleinsäure |
| ECD | extrazelluläre Domäne |
| <i>E. coli</i> | <i>Escherichia coli</i> |
| EDTA | Ethylendiamintetraacetat |
| EGFR | epidermaler Wachstumsfaktorrezeptor |
| Elispot | <i>Enzyme Linked Immuno Spot Technique</i> |
| ER | Endoplasmatisches Retikulum |
| EU | Endotoxin-Einheiten |
| Fab | antigenbindendes Fragment |
| FACS | <i>Fluorescence Activated Cell Sorting</i> |
| FasL | Fas Ligand |
| Fc | kristallisierbares Fragment |
| FCS | fötales Kälberserum |
| FITC | Fluorescein-5-isothiocyanat |
| g | Normalfallbeschleunigung (9.81 m/s ²) |
| GALT | Darm-assoziiertes lymphatisches Gewebe |
| GM-CSF | Granulozyten-Makrophagen-koloniestimulierender Faktor |
| h | Stunde |

| | |
|----------------|---|
| HBV | Hepatitis-B-Virus |
| HCMV | humanes Cytomegalievirus |
| HLA | humanes Leukozytenantigen |
| His | Histidin |
| HIV-RT | reverse Transkriptase des humanen Immundefizienzvirus |
| HPLC | Hochleistungsflüssigkeitschromatographie |
| HPV | humanes Papillomavirus |
| HRP | <i>Horseradish peroxidase</i> |
| Hsc | <i>heat shock cognate protein</i> |
| Hsp | Hitzeschockproteine |
| hu | human |
| ICAM | interzelluläre Adhäsionsmoleküle |
| ICD | intrazelluläre Domäne |
| IFA | inkomplettes Freund-Adjuvans |
| IFN | Interferon |
| Ig | Immunglobulin |
| IL | Interleukin |
| IPTG | Isopropyl- β -thio-galactopyranosid |
| kb | Kilobasen |
| kDa | Kilodalton |
| l | Liter |
| LAL | Limolus-Amoebozyt-Lysat |
| LB | Luria Bertani |
| LFA | funktionelles Leukozytenantigen |
| LPS | Lipopolysaccharid |
| m | murin |
| M | molar |
| mA | Milliampere |
| MALT | Mucosa-assoziiertes lymphatisches Gewebe |
| MBL | mannanbindendes Lektin |
| MCS | <i>multiple cloning site</i> |
| MHC | Haupthistokompatibilitätskomplex |
| MFI | <i>mean fluorescence intensity</i> |
| min | Minute |
| ml | Milliliter |
| mm | Millimeter |
| mM | Millimolar |
| MMTV | Maus-Mammatumovirus |
| <i>m. tub.</i> | <i>Mycobacterium tuberculosis</i> |
| MWCO | <i>moleculare weight cut off</i> |
| ng | Nanogramm |
| NK | Natürliche Killerzellen |
| nm | Nanometer |
| nM | nanomolar |
| nmol | nanomol |
| NO | Stickstoffoxid |
| N-terminal | aminoterminal |
| OD | optische Dichte |
| OVA | Ovalbumin |
| PAGE | Polyacrylamidgelelektrophorese |
| PAMP | pathogenassoziiertes molekulares Muster |
| PBMC | <i>peripheral blood mononuclear cells</i> |
| PBS | <i>phosphate buffered saline</i> |
| PCR | Polymerase-Kettenreaktion |
| PE | Phycoerythrin |
| PerCp | Peridinin-Chlorophyll-Proteinkomplex |
| pM | picomolar |
| pmol | picomol |
| PRR | Mustererkennungsrezeptoren |

| | |
|-----------------------|---|
| RNA | Ribonukleinsäure |
| rpm | <i>rounds per minute</i> |
| RPMI | <i>Roswell Park Memorial Institute</i> |
| RT | Raumtemperatur |
| SBP | Streptavidin-bindendes Peptid |
| SDS | Sodiumdodecylsulfat |
| sec | Sekunden |
| SF | <i>Spodoptera frugiperda</i> |
| SR | Scavenger-Rezeptor |
| TAE | Tris-Acetat-EDTA Puffer |
| TAP | <i>transporter associated with antigen processing</i> |
| TCR | T-Zellrezeptor |
| TE | Tris-EDTA Puffer |
| TEMED | Tetramethylethylendiamid |
| TGF | transformierender Wachstumsfaktor |
| T _h -Zelle | T-Helferzelle |
| TLR | Toll-ähnliche Rezeptoren |
| TMD | Transmembrandomäne |
| TNF | Tumornekrosefaktor |
| Tris | Tris(hydroxymethyl)aminomethan |
| U | Units |
| V | Volt |
| v/v | Volumenprozent |
| VEGF | <i>vascular endothelial growth factor</i> |
| VF | Verdünnungsfaktor |
| Vol | Volumen |
| w/v | Gewichtsprozent |
| WT | Wildtyp |
| z. B. | zum Beispiel |

1 Zusammenfassung

Den Hitzeschockproteinen werden neben ihrer zellbiologisch wichtigen Rolle als Chaperone auch bedeutende immunologische Eigenschaften zugesprochen. Es wurde berichtet, dass sie einerseits komplexierte Antigene durch Mechanismen der Kreuzpräsentation effektiv in den MHC-Klasse-I-Präsentationsweg einschleusen können (Suto und Srivastava, 1995), andererseits auch Immunantworten der angeborenen Immunität auszulösen vermögen (Zengh *et al.*, 2001; Strbo *et al.*, 2002). Daher dienen sie gleichermaßen als Initiator der adaptiven Immunantwort und können durch ihren adjuvanten Effekt die antigenspezifische zelluläre Immunität verstärken (Srivastava, 2002). Das Ziel dieser Arbeit war es, den postulierten adjuvanten Effekt der Hitzeschockproteine in Vakzinierungsstudien auszunutzen, die gegen das in Mammakarzinomen überexprimierte Tumorantigen HER2/neu gerichtet waren. Durch die rekombinante Fusion vier verschiedener Hitzeschockproteine (mHsp70, mHsc70, mHsp70L1 und *m.tub.*Hsp70) mit zwei HER2/neu-spezifischen, in Tandem klonierten CD8⁺ T-Zellepitopen TYLPTNASL und PYVSRLGI (Hsp-HER2/neu_{TE}) bzw. mit einem längeren Fragment, das ebenfalls das CD8⁺ T-Zellepitop TYLPTNASL enthielt (Hsp-Her2/neu₂₆₋₁₃₆), konnte in BALB/c-Mäusen der adjuvante Hsp-Anteil der Fusionsproteine evaluiert werden. Zusätzlich wurden Fusionsproteine generiert, die eine Untersuchung des HLA-A2-restringierten HER2/neu-Epitops KIFGSLAFL im HLA-A2-transgenen HHD-Mausmodell ermöglichten (Hsp-HER2/neu₂₉₉₋₅₇₉). Parallel zur Evaluierung des Adjuvanzeffektes wurde sowohl im BALB/c- als auch im HHD-Mausmodell die Kapazität der Fusionsproteine untersucht, eine gegen das körpereigene Protoonkogen HER2/neu gerichtete Selbst-Toleranz zu brechen und eine Immunantwort zu induzieren. Die in *E. coli* exprimierten rekombinanten Proteine konnten nach Nickel-Affinitätschromatographie mit hoher Reinheit (70-90 %) gewonnen und das kontaminierende LPS durch eine Behandlung mit dem Detergenz Triton X-114 auf einen verbleibenden Gehalt von 0.004-0.07 EU/μg reduziert werden. Der Vergleich der Hsp-Fusionsproteine hinsichtlich ihrer Fähigkeit, eine Immunantwort gegen ein Fremdatigen zu induzieren, zeigte, dass drei der vier Proteine (Hsp70-HER2/neu_{TE}, Hsc70-HER2/neu_{TE} und *m.tub.*Hsp70-HER2/neu_{TE}) eine HER2/neu-spezifische T-Zellzytotoxizität *in vivo* induzierten, wenn sie in Kombination mit dem TLR-9 Liganden CpG verabreicht wurden. Ohne dieses Adjuvans jedoch konnte entgegen der Beobachtungen früherer Studien keine spezifische Immunantwort mehr detektiert werden, so dass vermutet wird, dass der immunstimulatorische Effekt der Hsp-Anteile in den Fusionsproteinen durch die sorgfältige LPS-Abreicherung verloren ging. In Kombination mit einer mittleren CpG-Dosis induzierten die Proteine Hsp70-HER2/neu_{TE}, Hsc70-HER2/neu_{TE} und *m.tub.*Hsp70-HER2/neu_{TE} eine stärkere HER2/neu-spezifische Immunität *in vivo* als das synthetische Peptid. Diese drei Fusionsproteine aktivierten auch murine BMDC *in vitro* hinsichtlich einer erhöhten Expression der kostimulatorischen Moleküle CD40, CD80 und CD86, wobei hohe Proteinkonzentrationen nötig waren. Alle vier untersuchten Hsp-HER2/neu_{TE}-Fusionsproteine konnten in einem prophylaktischen Ansatz ohne zusätzliches CpG das Wachstum des HER2/neu-überexprimierenden Tumors D2F2/E2 signifikant verlangsamen, während dies durch eine Peptidimmunisierung nicht erreicht wurde. Da in einem direkten Vergleich die Hsp-HER2/neu₂₆₋₁₃₆

Fusionsproteine und das rekombinante Protein HER2/neu₂₆₋₁₃₆ aber dieselbe Immunogenität besaßen, muss davon ausgegangen werden, dass in dem hier untersuchten System die Hitzeschockproteinanteile keinen verstärkenden Effekt auf die Immunantwort ausüben und der Vorteil der Fusionsproteine gegenüber dem Peptid eher auf der Proteinimmunisierung basierte. Die Immunogenität der Hsp-HER2/neu_{TE}-Fusionsproteine reichte nicht aus, um einen therapeutischen Effekt auf das Tumorwachstum auszuüben. Ebenso wenig gelang es, Gedächtnis-T-Zellantworten zu induzieren. Selbstreaktive Immunantworten gegen ein körpereigenes HLA-A2-restringiertes Epitop aus HER2/neu konnten durch Vakzinierungen mit modifizierten Peptiden induziert werden, während die Stimulation autoreaktiver T-Zellen durch die Fusionsproteine Hsp-HER2/neu₂₉₉₋₅₇₉ nicht gelang.

Die Daten der vorliegenden Arbeit lassen die Schlussfolgerung zu, dass Hsp-Fusionsproteine im HER2/neu-System mit der hier gewählten Immunisierungsstrategie offenbar keine effektive Immunstimulation bewirken. Vermutlich verlieren die Hsp-Anteile der rekombinanten Proteine ihren Adjuvanzeffekt durch die LPS-Abreicherung. Daher wird deutlich, dass für den Einsatz proteinbasierter Vakzinen in der Immuntherapie Hitzeschockproteine als Adjuvans nicht ausreichen. Stattdessen müssten andere Adjuvantien wie z. B. GMCSF eingesetzt werden. Parallel könnten Epitopmodifikationen oder veränderte Vakzinierungsstrategien, wie z. B. die *In vitro*-Proteinbeladung von DC eine verbesserte Immunogenität erzeugen.

2 Summary

Besides their important chaperone function, heat shock proteins (Hsp) have been claimed to possess impressive immunologic properties. Reports have shown that they are able to induce cross-presentation of associated exogenous antigens in the MHC class I presentation pathway and additionally have been suggested to induce innate immunity. Therefore Hsp are considered to be initiators of adaptive immune responses able to increase antigen specific immunity due to their adjuvant effects (Srivastava, 2002). The goal of this thesis was to exploit this Hsp-derived adjuvant effect in vaccination studies that were directed against the tumor antigen HER2/neu which is overexpressed in mammary carcinoma. Four different Hsp (mHsp70, mHsc70, mHsp70L1 and *m.tub.Hsp70*) were fused with either two HER2/neu-derived CD8⁺ T cell epitopes TYLPTNASL and PYVSRLGI (Hsp-HER2/neu_{TE}) or different fragments of the human HER2/neu protein (Hsp-HER2/neu₂₆₋₁₃₆, Hsp-HER2/neu₂₉₉₋₅₇₉) in order to evaluate the adjuvant Hsp part in the different recombinant fusion proteins. Additionally, their capacity to induce self reactive immune responses and to overcome tolerance against the self protein HER2/neu was analyzed in BALB/c and HHD HLA-A2 transgenic mice.

After expression in *E. coli*, the recombinant proteins were purified by Ni-affinity chromatography achieving purities of 70 to 90 %. Treatment with Triton X-114 reduced LPS contamination to 0.004-0.07 EU/μg protein. The comparison of the four different Hsp fusion proteins in terms of their capacity to induce immunity against a foreign antigen showed that three out of four fusion proteins (Hsp70-HER2/neu_{TE}, Hsc70-HER2/neu_{TE} and *m.tub.Hsp70*-HER2/neu_{TE}) induced HER2/neu specific cytotoxicity *in vivo* if they were applied together with the TLR-9 ligand CpG. Without CpG however, no specific immunity was detectable which implies that the immunostimulatory effect of the Hsp was mostly lost upon careful endotoxin removal. In combination with intermediate amounts of CpG the proteins Hsp70-HER2/neu_{TE}, Hsc70-HER2/neu_{TE} and *m.tub.Hsp70*-HER2/neu_{TE} showed stronger HER2/neu specific immunogenicity *in vivo* as compared with the peptide. These three fusion proteins were also able to mature murine BMDC in terms of upregulation of the costimulatory markers CD40, CD80 and CD86, but high protein concentrations were needed. All four Hsp-HER2/neu_{TE} fusion proteins significantly inhibited growth of the HER2/neu overexpressing tumor D2F2/E2 in a prophylactic setting without need of further adjuvant (CpG). This protective effect was not detectable after peptide immunization. Since a direct comparison of the Hsp-HER2/neu₂₆₋₁₃₆ fusion proteins with the recombinant HER2/neu₂₆₋₁₃₆ protein revealed no difference in antigen specific immunogenicity it is assumed that the Hsp did not possess a significant enhancing effect on the immune response in this system. Instead, it is believed that the observed immunogenic advantage of the fusion proteins over the peptide is due to protein immunization versus peptide immunization in general. The immunogenicity of the Hsp-HER2/neu_{TE} fusion proteins was not strong enough to exert a therapeutic effect on pre-implanted tumor or to induce HER2/neu-specific memory T cell responses. The induction of immunity against a HLA-A2-restricted self epitope in HER2/neu could, however, be achieved by

peptide immunization with modified peptide epitopes, but was not observed after vaccination with the Hsp-HER2/neu₂₉₉₋₅₇₉ fusion proteins.

Our results suggest that Hsp fusion proteins are in contrast to previous reports not efficient in the HER2/neu system in inducing immunity. Since the evaluated Hsp possessed only low adjuvant effect probably due to LPS removal, it becomes clear that additional adjuvants such as CpG are needed for the use of protein-based vaccines in immunotherapy. Besides the inclusion of adjuvants, epitope modifications including xenogeneic sequences or alternative vaccination strategies e. g. immunization with *in vitro* protein-loaded DC may be beneficial in the future.

3 Einleitung

Die Fähigkeit unseres Körpers, auf infektiöse Substanzen zu reagieren und diese zu beseitigen, beruht auf dem Immunsystem, welches das biologische Abwehrsystem höherer Lebewesen darstellt. Der Schutz durch das Immunsystem ist von großer Bedeutung, da jeder Organismus täglich den Einflüssen der belebten Umwelt ausgesetzt ist, von denen eine zum Teil schädliche Wirkung ausgeht. Typische Krankheitserreger sind Bakterien, Viren, Pilze sowie einzellige oder mehrzellige Parasiten. Neben der Entfernung eingedrungener Krankheitserreger ist das Immunsystem aber außerdem in der Lage, körpereigene Zellen, die fehlerhaft geworden sind, zu zerstören. Alle Lebewesen verfügen über diese essentiellen Schutzfunktionen. Schon einfache Organismen besitzen die so genannte angeborene Immunabwehr, deren Entwicklung sich bereits sehr früh in der Stammesgeschichte der Lebewesen abzeichnete. Wirbeltiere besitzen zusätzlich sich einen komplexeren Teil des Immunsystems, die so genannte erworbene oder adaptive Immunabwehr. Obwohl beide Bereiche unterschiedliche Gruppen von spezialisierten Zellen beinhalten, arbeiten diese nicht getrennt voneinander. Erst das Zusammenspiel der Akteure des angeborenen sowie des adaptiven Immunsystems ermöglicht es, eingedrungene Mikroorganismen sofort und vollständig zu zerstören und zusätzlich eine lebenslange Immunität gegen dasselbe Pathogen zu erwerben. Die lymphatischen Organe, die in einem großen Netzwerk organisiert sind, umfassen einerseits die primären oder zentralen lymphatischen Organe, das Knochenmark und den Thymus, in denen viele Immunzellen heranreifen. Andererseits gehören die sekundären oder peripheren lymphatischen Organe dazu, welche die Milz, Lymphknoten, die Darm-assoziierten lymphatischen Gewebe (*gut-associated lymphoid tissues*, GALT) sowie das Mucosa-assoziierte lymphatische Gewebe (MALT) umfassen. In diesen Organen wird die adaptive Immunantwort eingeleitet. Die Überwachung der peripheren Gewebe durch die Zellen des Immunsystems wird durch deren ständige Zirkulation im Blut und dem so genannten lymphatischen System ermöglicht.

3.1 Das Immunsystem

3.1.1 Die angeborene Immunität

Das angeborene unspezifische Immunsystem, das phylogenetisch älter als die adaptive Immunität ist, bildet die erste Barriere gegen infektiöse Organismen. Bestandteile dieses Teils der Immunabwehr sind unter anderem die Epithelien, die die inneren und äußeren Körperoberflächen bedecken und einen ersten mechanischen und chemischen, sowie mikrobiologischen Schutz gegen Infektionen bilden. Sollte ein Erreger diese Barriere dennoch durchbrechen und in das Körperinnere eindringen können, greifen zelluläre Bestandteile der angeborenen Immunabwehr ein. Dazu gehören Makrophagen, Granulozyten, Mastzellen, $\gamma\delta$ T-Zellen und Natürliche Killerzellen (NK-Zellen), wobei letztere eine Zwischenstellung zwischen angeborenem und adaptivem Immunsystem einnehmen. Makrophagen und neutrophile Granulozyten sind phagozytierende Zellen, die für das angeborene

Immunsystem von entscheidender Bedeutung sind, da durch sie eine Vielzahl von Erregern aufgenommen und zerstört werden, ohne dass es der Unterstützung durch die adaptive Immunabwehr bedarf. Die Erkennung der Krankheitserreger erfolgt über hoch konservierte pathogene Schlüsselmoleküle (*Pathogen associated molecular pattern*, PAMP), wie z. B. bakterielles Lipopolysaccharid (LPS), Peptidoglykane, Flagellin, virale RNA, unmethylierte DNA, sowie Mannane und Glykane. Diese pathogenen Mustererkennungsmoleküle binden an spezielle invariable Zelloberflächenrezeptoren auf den phagozytierenden Zellen des angeborenen Immunsystems (*Pattern recognition receptor*, PRR). Dazu gehört der Mannoserezeptor auf Makrophagen, an den konservierte bakterielle mannosehaltige Kohlenhydrate binden, was zur Phagozytose führt (Aderem und Ulevitch, 2000). Weitere phagozytierende Rezeptoren sind die Scavenger-Rezeptoren wie z. B. CD36 oder CD91, die bestimmte anionische Polymere und acetylierte Lipoproteine mit geringer Dichte erkennen (Febbraio *et al.*, 2001).

Neben diesen phagozytierenden Rezeptoren spielen bei der Erkennung pathogener Schlüsselmoleküle auch so genannte Toll-ähnliche Rezeptoren (*Toll like receptors*, TLR) eine Rolle, die eine Signalkaskade zur Freisetzung von Effektormolekülen, den Zytokinen, induzieren. Die Sekretion dieser proinflammatorischen Effektormoleküle ruft weitere neutrophile Granulozyten und Plasmaproteine an den Infektionsherd, so dass die Immunantwort verstärkt wird. Außerdem induziert die Aktivierung der TLR eine Expression kostimulierender Moleküle auf Makrophagen und dendritischen Zellen (DC), was für die erfolgreiche Induktion des adaptiven Immunsystems von entscheidender Bedeutung ist (Takeda und Akira, 2005). Säugetiere besitzen 13 verschiedene TLR, die in DC und Makrophagen exprimiert werden und auf die Erkennung unterschiedlicher Pathogene spezialisiert sind. Einige dieser Transmembranrezeptoren werden auf der Zelloberfläche exprimiert, wie z. B. TLR-4, über den bakterielles Lipopolysaccharid gramnegativer Bakterien erkannt wird. Andere, wie TLR-9, an den unmethylierte pathogene DNA wie CpG bindet, kommen ausschließlich in Endosomen vor (Huang *et al.*, 2008).

Eine dritte Gruppe von Rezeptoren, die bakterielle oder virale Erkennungsmoleküle binden, sind zirkulierende oder humorale Komponenten des angeborenen Immunsystems wie das Komplementsystem, Akut-Phase-Proteine oder das mannanbindenden Lektin (MBL). Die durch diese Moleküle induzierte Opsonisierung der Pathogene erleichtert und beschleunigt die Phagozytose und damit die Beseitigung der Erreger.

Das angeborene Immunsystem bildet sofort nach dem Kontakt mit dem Erreger eine erste Verteidigungslinie und kann durch das Zusammenspiel mehrerer Komponenten oftmals die Infektion vollständig bekämpfen. Erst wenn diese Abwehr nicht ausreicht, wird der adaptive Zweig des Immunsystems aktiviert.

3.1.2 Die erworbene Immunität

Die spezifische oder adaptive Immunabwehr zeichnet sich durch die Anpassungsfähigkeit gegenüber neuen oder veränderten Krankheitserregern aus. Das adaptive System gliedert sich in eine zelluläre

Komponente, welche die T-Lymphozyten bilden, sowie in eine humorale Komponente, die B-Lymphozyten und von ihnen sezernierte Antikörper umfasst. Während Zellen der angeborenen Immunität die Erreger über konservierte keimbahnkodierte Rezeptoren erkennen, besitzt die adaptive Immunabwehr eine Vielfalt antigenspezifischer Rezeptoren. Diese Rezeptoren werden durch zufällige somatische Rekombination verschiedener Gensegmente gebildet und erkennen daher potentiell alle molekularen Strukturen. Demnach besitzen B- und T-Zellen eine hohe Diversität an Zelloberflächenrezeptoren, wobei jede Zelle eine individuelle Spezifität besitzt. Nach dem Erkennen eines spezifischen Antigens durch Bindung an den B- oder T-Zellrezeptor kommt es zur klonalen Expansion des jeweiligen Lymphozyten und zur Differenzierung in Effektorzellen. Zusätzlich entstehen Gedächtniszellen, die für das immunologische Gedächtnis verantwortlich sind und nach einem erneuten Kontakt mit demselben Pathogen innerhalb kurzer Zeit eine neue Abwehrreaktion ermöglichen.

Die antigenerkennenden Moleküle der B-Zellen sind die Immunglobuline (Ig). Membrangebundenes Immunglobulin wird auch als B-Zellrezeptor (BCR) bezeichnet. Der B-Zellrezeptor enthält zwei Antigenerkennungsstellen und bindet das jeweilige Antigen als natives komplexes Epitop. Nach der Aktivierung wird der B-Zellrezeptor als Antikörper mit identischer Spezifität sezerniert. Der T-Zellrezeptor (TCR) ist ebenfalls ein Oberflächenmolekül, aber anders als bei den B-Zellen wird dieses nach dem Antigenkontakt nicht sezerniert. Als weiteren Unterschied enthält der T-Zellrezeptor nur eine Antigenbindungsstelle und erkennt kein komplexes natives Molekül, sondern kurze Peptide, die von MHC-Molekülen präsentiert werden. Diese Epitope liegen oftmals in der nativen Molekülstruktur des Antigens verborgen. Erst die Entfaltung der Proteine, ihre Prozessierung in kurze Peptide und deren Präsentation über körpereigene Moleküle des Haupthistokompatibilitätskomplexes (*major histocompatibility complex*, MHC) können dem TCR die Antigene zugänglich gemacht werden.

Mit 10^{11} unterschiedlichen BCR und 10^{16} verschiedenen TCR besitzt das adaptive Immunsystem eine sehr hohe Diversität, die die Erkennung verschiedenster Antigene ermöglicht (Davis und Bjorkman, 1988; Tonegawa 1983). Doch zusätzlich zu dieser Eigenschaft besitzen Zellen des erworbenen Immunsystems noch die Fähigkeit, zwischen körpereigenen (Selbst) und körperfremden (Fremd) Antigenen zu unterscheiden. Dies ist essentiell, um Angriffe des Immunsystems auf körpereigene Zellen zu vermeiden. Sowohl B- als auch T-Zellen erlernen das Unterscheiden zwischen Selbst und Fremd während ihrer Entwicklung im Knochenmark (B-Zellen) bzw. im Thymus (T-Zellen). Bei T-Zellen spielt hier die Komplexierung der Antigene an MHC-Moleküle eine große Rolle. Während der Genumordnung zur Bildung der verschiedenen TCR entstehen Moleküle, die aber nicht alle an körpereigene MHC-Moleküle binden können. Es überleben nur jene die positive Selektion, welche Selbst-MHC-Moleküle erkennen. Zusätzlich werden im Rahmen der negativen Selektion sich entwickelnde T-Zellen eliminiert, die Selbstpeptide im Kontext von körpereigenen MHC-Molekülen mit hoher Affinität erkennen. Somit überleben nur solche T-Zellen die Entwicklungsphase, die Fremdpeptide über körpereigene MHC-Moleküle erkennen, aber tolerant gegenüber Selbstpeptiden sind. Diesen Selektionsprozess während der Entwicklung überlebt nur ein Bruchteil aller gebildeter T-Zellen, so dass ungefähr 2 bis 4 % den Thymus als reife T-Zellen verlassen.

Die T-Zellen unterteilen sich in $CD4^+$ und $CD8^+$ T-Zellen. Die $CD4^+$ T-Zellen werden als T-Helferzellen bezeichnet und umfassen die T_H1 - und T_H2 -Zellen. Die Entwicklung der naiven $CD4^+$ T-Zellen zur T_H1 - bzw. T_H2 -Zelle hängt von dem Zytokinmilieu ab, das zum Zeitpunkt der Antigenerkennung vorherrscht. Während IFN_γ und IL-12 die Immunantwort bevorzugt in Richtung von T_H1 -Zellen lenken, wird durch IL-4 eher eine T_H2 -Antwort initiiert. T_H1 -Zellen induzieren durch die Ausschüttung von IFN_γ und IL-2 eine zelluläre Immunantwort und aktivieren hauptsächlich Makrophagen. Dieser Weg wird vorrangig bei der Bekämpfung intrazellulärer Bakterien sowie Virusinfektionen eingeschlagen. T_H2 -Zellen zeichnen sich dagegen durch eine Sekretion von $TNF\beta$, IL-4 und IL-10 aus. Diese Zytokine lenken die Immunantwort in Richtung der humoralen Immunität und fördern somit die Bildung von Antikörpern. Die von T_H1 -Zellen sekretierten Zytokine können die T_H2 -Helferzellentwicklung hemmen und umgekehrt. Durch diese Kreuzhemmung wird eine einmal eingeschlagene Richtung für die Immunantwort beibehalten.

$CD8^+$ T-Zellen sind zytotoxische T-Zellen, die für die Bekämpfung virusinfizierter Zellen verantwortlich sind. Sie können durch verschiedene Wege die Apoptose (den programmierten Zelltod) der befallenen Zelle hervorrufen, wobei das Fas/Fas-Ligand-System ($CD95/CD95L$) bzw. Perforine und Granzyme eingesetzt werden.

3.2 Die MHC-Moleküle

Der Haupthistokompatibilitätskomplex (*major histocompatibility complex*, MHC) ist in allen Wirbeltieren zu finden und umfasst eine Gruppe von Genen, die für Proteine kodieren, welche für die Immunerkennung, die Gewebeverträglichkeit (Histokompatibilität) bei Transplantationen und die immunologische Individualität von Bedeutung sind. Beim Menschen ist dieser Genkomplex auf dem kurzen Arm des Chromosoms 6 zu finden und beinhaltet zirka 200 Gene. In der Maus liegen die rund 120 Gene des MHC auf Chromosom 17 (Allcock *et al.*, 2000). Die MHC-Moleküle des Menschen (HLA, *Human Leukocyte Antigen*) wurden zum ersten Mal 1958 von Jean Dausset bzw. 1962 von Jon van Rood und Rose Payne beschrieben. Die Gene des Haupthistokompatibilitätskomplexes werden in drei unterschiedliche Klassen eingeteilt. Die Gewebeverträglichkeitsproteine, die MHC-Moleküle, werden dabei von den Genen der Klasse I und II kodiert. Gene der MHC-Klasse-III kodieren dagegen für andere immunrelevante Proteine wie die Komplementfaktoren oder $TNF\alpha$ und $TNF\beta$.

Die MHC-Klasse-I-Region kodiert für Gene der α -Ketten der klassischen und der nicht klassischen MHC-Klasse-I-Moleküle. Jedes Individuum besitzt drei Gene für die α -Ketten dieser klassischen MHC-Klasse-I-Moleküle, die beim Menschen mit HLA-A, HLA-B und HLA-C bezeichnet werden. Bei Mäusen spricht man von H-2K, H-2D und H-2L. Das MHC-Klasse-I-Molekül setzt sich als Heterodimer aus zwei Polypeptidketten zusammen. Die schwere Kette, die α -Kette, besteht aus drei Domänen (α_1 , α_2 und α_3) und bildet ein membrangebundenes Glykoprotein. An dieses Protein wird die leichte Kette, β_2m Mikroglobulin (β_2m), nicht-kovalent angelagert. β_2m ist im Gegensatz zu der α -Kette nicht polymorph und das Gen liegt nicht im MHC-Locus. Beim Menschen ist es auf Chromosom 15 und bei der Maus auf

Chromosom 2 zu finden. Die Domänen $\alpha 1$ und $\alpha 2$ bilden den Peptid-bindenden Spalt in den kurze Peptide von 8 bis 10 Aminosäuren binden. Die $\alpha 3$ -Untereinheit dient zur Interaktion mit dem CD8 Korezeptor auf CD8⁺ T-Zellen. MHC-Klasse-I-Moleküle werden auf fast allen kernhaltigen Zellen exprimiert und binden im klassischen Modell der Antigenpräsentation bevorzugt Peptide endogener Proteine und präsentieren diese CD8⁺ T-Zellen (Pamer und Cresswell, 1998).

Das MHC-Klasse-II-Molekül ist ein Heterodimer, das aus einem nicht-kovalenten Komplex zweier transmembraner Ketten (α und β) mit jeweils zwei Domänen besteht. Die Gene dieser Ketten werden in der MHC-II-Region kodiert. Die Peptidbindungsstelle des Moleküls wird durch die membrandistalen Domänen $\alpha 1$ und $\beta 1$ gestellt, die im Gegensatz zu MHC-Klasse-I-Molekülen weiter geöffnet sind und daher längere Peptide binden können. Die Interaktion mit dem CD4-Korezeptor auf CD4⁺ T-Zellen wird durch die $\beta 2$ -Untereinheit des MHC-Klasse-II-Moleküls gewährleistet. Beim Menschen gibt es drei Loci für verschiedene MHC-Klasse-II-Moleküle, die als HLA-DR, HLA-DP und HLA-DQ bezeichnet werden. Die Gene der verwandten Moleküle HLA-DM und HLA-DO (H-2M und H-2O in der Maus), die an der Beladung der MHC-Klasse-II-Moleküle beteiligt sind, werden ebenfalls in diesem Locus kodiert. Sie zählen zu den nicht-klassischen MHC-Klasse-II-Molekülen, sind nicht polymorph und kommen nur begrenzt an der Zelloberfläche vor (Arndt *et al.*, 2000). Bei den klassischen MHC-Klasse-II-Molekülen der Maus spricht man von I-A und I-E. Im Gegensatz zu den Molekülen der Klasse I werden die Klasse-II-Moleküle nur auf ausgewählten Zellen exprimiert, den antigenpräsentierenden Zellen (APC), aktivierten T-Zellen und Epithelzellen des Thymus. Die Expression des MHC-II-Moleküls kann aber auch bei einigen anderen Zellen durch IFN γ induziert werden (Klein und Sato, 2000; Benoist und Mathis, 1990). Im klassischen Modell der Antigenpräsentation haben MHC-Klasse-II-Moleküle die Aufgabe, Peptide, die aus exogenen Proteinen prozessiert werden, zu binden und diese CD4⁺ T-Zellen zu präsentieren (Watts, 1997).

Der MHC zeichnet sich neben seiner Polygenität durch einen hohen Polymorphismus aus. Es gibt mehrere MHC-Klasse-I- und II-Gene, so dass jedes Individuum über eine Gruppe von MHC-Molekülen mit unterschiedlichen Peptidbindungsspezifitäten verfügt. Zusätzlich trägt der polymorphe Charakter des MHC dazu bei, dass es mehrere Allele für jedes Gen gibt. Somit ist gewährleistet, dass potentiell jedes Pathogen vom Immunsystem erkannt werden kann und so die Gesamtpopulation geschützt wird. Es wurden im Menschen bzw. in der Maus teilweise über 200 Allele pro Locus gefunden. Trotz dieser Vielfalt hat jedes Individuum nur sechs verschiedene MHC-Klasse-I-Allele und zwölf unterschiedliche MHC-Klasse-II-Allele. Bei der Maus wurden die unterschiedlichen Allele nach dem Haplotyp der ersten Inzuchtlinie benannt, mit denen diese Allele serologisch definiert wurden. Daher nennt man die verschiedenen Allele der MHC-Klasse-I-Moleküle in der Maus H-2K^b, H-2K^d usw.

Zusätzlich zu den Genen der MHC-Moleküle befinden sich im Klasse-I und II-Locus auch Gene für andere immunologisch wichtige Proteine wie z. B. TAP (*Transporter associated with Antigen Processing*), welches bei der Beladung der Peptide auf MHC-Klasse-I-Moleküle eine Rolle spielt, oder die LMP2/7-Gene, welche bestimmte Untereinheiten des Proteasoms kodieren.

3.3 Die klassische Antigenpräsentation

Die Hauptaufgabe der MHC-Moleküle, die ursprünglich im Zusammenhang der Transplantationsabstoßung entdeckt wurden, ist die Präsentation körpereigener und körperfremder Antigene. Um die Antigene dem Immunsystem sichtbar zu machen, müssen die Proteine zunächst in kleinere Peptide zerlegt werden, so dass eine Bindung zum MHC-Molekül möglich wird. Die Herkunft des Antigens entscheidet über den Präsentationsweg und damit über die Aktivierung spezifischer T-Zellen. So werden intrazelluläre Antigene wie z. B. virale Proteine über MHC-Klasse-I-Moleküle den CD8⁺ T-Zellen präsentiert, während extrazelluläre Pathogene durch Bindung an MHC-Klasse-II-Moleküle zur Aktivierung von CD4⁺ T-Zellen führen. Die Antigenprozessierung findet in allen Zellen, die MHC-Moleküle besitzen, statt, eine Immunantwort kann aber normalerweise nur durch antigenpräsentierende Zellen wie B-Zellen, DC oder Makrophagen ausgelöst werden.

Körpereigene wie körperfremde zytosolische Proteine werden im Zytosol durch das Proteasom in kleine Fragmente zerlegt. Diese Peptide gelangen dann über einen ATP-abhängigen ER-membranständigen Transporter (TAP, *transporter associated with antigen processing*) in das Endoplasmatische Retikulum (ER). Der TAP-Transporter ist ein Heterodimer aus zwei Proteinen (TAP1 und TAP2), die jeweils eine zytosolische ATP-Bindungskassette (*ATP binding cassette, ABC*) besitzen und daher zu den ABC-Proteinen zählen (Momburg und Hämmerling, 1998). Im Inneren des ER erfolgt die Beladung der Peptide auf das neu synthetisierte MHC-Klasse-I-Molekül, wobei 8 bis 10 Aminosäure kurze Peptide mit hydrophoben oder basischen Aminosäureresten am Carboxylende von dem TAP-Transporter bevorzugt ins ER transportiert werden. Das Adapterprotein Tapasin vermittelt eine örtliche Nähe des MHC-Klasse-I-Moleküls zum TAP-Transporter und optimieren die Peptidbeladung (Tan *et al.*, 2002). Weitere Chaperone wie Calreticulin, Calnexin und ERp57 tragen zur Stabilität des Moleküls bei. ERp57 spielt eine Rolle bei der oxidativen Faltung der schweren Kette des MHC-Klasse-I-Moleküls (Garbi *et al.*, 2007). Zusätzlich zur Molekülstabilisierung helfen die Chaperone bei der Peptidbeladung des MHC-Moleküls und induzieren so stabile MHC:Peptid-Komplexe. Die ins ER transportierten Peptide binden über ihre Amino- bzw. Carboxylgruppe in die so genannten A- bzw. F-Tasche des MHC-I-Moleküls. Zusätzlich tragen Wasserstoffbrücken zwischen dem Peptidrückgrat und der Bindungsfurche des MHC-Moleküls zur Stabilisierung bei (Urban *et al.*, 1993). Erst nach der Bindung des Peptids an das MHC-Klasse-I-Molekül löst sich dieses vom TAP-Komplex, verlässt das ER und wird über den Golgi-Apparat an die Zelloberfläche transportiert.

Peptide, die an MHC-Klasse-II-Moleküle binden, stammen größtenteils von exogenen, extrazellulären, sekretierten oder membranständigen Proteinen. Diese Proteine werden von phagozytierenden Zellen aufgenommen und in Vesikel, den Endosomen, eingeschlossen, welche dann mit den Lysosomen fusionieren. Die Peptidbeladung erfolgt anders als bei den MHC-Klasse-I-Molekülen nicht im ER, sondern in den endosomalen oder lysosomalen Kompartimenten, in denen so genannte saure Proteasen die aufgenommenen Partikel in kleine Peptidfragmente zersetzen. Die exogenen Peptide, die MHC-II-Moleküle binden haben eine variable Länge von 13 bis 23 Aminosäuren (Urban *et al.*, 1993) und können am N- und C-Terminus jeweils aus der Peptidbindungsgrube herausragen. Damit die neu synthetisierten MHC-II-Moleküle nicht bereits während ihrer Entstehung im ER beladen

werden, wird die Peptidbindungstasche des Moleküls im ER durch ein MHC-Klasse-II-assoziiertes Protein, die so genannte invariante Kette (Ii) blockiert. Dieses Protein bildet ein Trimer und bindet mit einem Teil seiner Polypeptidkette, dem so genannten CLIP-Fragment (*class II associated invariant chain peptide*) an die Peptidbindungsfurche des MHC-II-Moleküls (Cresswell, 1996). Somit entsteht im ER ein nonamerer Komplex bestehend aus der trimerisierten invarianten Kette Ii, die insgesamt drei MHC-Klasse-II Heterodimere bindet. Neben der Blockierung der Peptidbindungsstelle hat die invariante Kette (Ii) die weitere Funktion, den Transport des neu synthetisierten MHC-Klasse-II-Moleküls aus dem ER in endosomale, lysosomale Kompartimente zu dirigieren, wo die Beladung mit dem Peptid stattfindet. Im Endosom bzw. im frühen Lysosom wird die invariante Kette durch Proteasen in mehreren Schritten abgeschnitten, so dass nur noch das CLIP-Fragment an MHC II gebunden bleibt. Ein MHC-Klasse-II-ähnliches Molekül, das beim Menschen mit HLA-DM und bei Mäusen mit H-2M bezeichnet wird, ermöglicht den Austausch des CLIP-Fragments gegen Peptide mit einer höheren Affinität zu MHC II (Vogt *et al.*, 1997). Die Peptid-beladenen MHC-Klasse-II-Moleküle werden anschließend an die Zelloberfläche transportiert und können nun CD4⁺ T-Zellen aktivieren. Eine wesentliche Voraussetzung für die Aktivierung der Immunzellen ist ein stabiler MHC:Peptid-Komplex an der Zelloberfläche. Würde der Komplex zu leicht dissoziieren, könnte das Pathogen dem Immunsystem entgehen. Umgekehrt könnten leere MHC-Moleküle an der Zelloberfläche körpereigene Peptide aufnehmen und präsentieren und so fälschlicherweise Immunreaktionen gegen eigene Zellen auslösen. Daher werden MHC-Moleküle von der Zelloberfläche entfernt, sobald sie kein Peptid mehr gebunden haben. Im Falle von MHC-Klasse-I-Molekülen dissoziiert β_2m ab und die α -Kette wird aufgenommen und abgebaut. Leere MHC-Klasse-II-Moleküle tendieren zur Aggregation und diese Komplexe werden durch Internalisierung von der Zelloberfläche entfernt.

3.4 Die Kreuzpräsentation exogener Antigene auf MHC-Klasse-I-Moleküle

Die klassischen Antigenpräsentationswege beschreiben die Beladung endogener, zytosolischer Antigene auf MHC-Klasse-I bzw. exogener, sekretorischer Antigene auf die MHC-Klasse-II-Moleküle. Wenn nun aber eine erfolgreiche CD8⁺ T-Zellantwort gegen virale, endogene Erreger eingeleitet werden soll, müsste laut diesem Modell die antigenpräsentierende Zelle, die die nötigen kostimulatorischen Moleküle exprimiert, stets selbst befallen sein. Das Immunsystem kann aber alle Virus-befallenen Zellen beseitigen, wie es am Beispiel des humanen Papillomavirus (HPV), das ausschließlich epitheliale Zellen infiziert, deutlich wird (McMurray *et al.*, 2001). Zytotoxische HPV-spezifische T-Zellen existieren und auch gegen Tumorzellen konnten zytotoxische T-Zellantworten detektiert werden. Daher muss es zusätzlich zu den beiden klassischen Antigenpräsentationswegen eine Präsentation extrazellulärer Peptide, die von zerstörten Virus-befallenen Zellen bzw. Tumorzellen stammen, auf MHC-Klasse-I-Moleküle geben. Diese so genannte Kreuzpräsentation bezeichnet im Allgemeinen die Präsentation von Peptiden extrazellulären Ursprungs durch MHC-Klasse-I-Moleküle, aber auch die Beladung von MHC-Klasse-II-Molekülen mit zytosolischen Peptiden (Heath und Carbone,

1999). Die Fähigkeit zur Kreuzpräsentation besitzen antigenpräsentierende Zellen, wobei Makrophagen die ersten Zellen waren, bei denen die Beladung der MHC-Klasse-I-Moleküle mit exogenen Antigenen beobachtet wurde (Kovacsovics-Bankowski *et al.*, 1993). Weitere *in vitro* Studien zeigten, dass außerdem auch DC und B-Zellen exogene Antigene kreuzpräsentieren können (Albert *et al.*, 1998). Heute glaubt man, dass *in vivo* hauptsächlich DC für die Kreuzpräsentation verantwortlich sind (Guermontprez und Amigorena, 2005). Der genaue Mechanismus, wie exogene Antigene in die MHC-Klasse-I-Beladungsmaschinerie eingeschleust werden, ist noch nicht vollständig aufgeklärt. Grundsätzlich stellt sich die Frage, ob dieser Antigenpräsentationsweg analog zur klassischen Beladung der MHC-I-Moleküle TAP-abhängig ist oder nicht. Zunächst wurde gezeigt, dass die Kreuzpräsentation *in vivo* von dem TAP-Transporter abhängt (Huang *et al.*, 1996), mittlerweile ist aber auch ein TAP-unabhängiger Weg gezeigt worden (Norbury *et al.*, 2001; Ruedl *et al.*, 2002). Peter Cresswell (2005) beschreibt drei potenzielle Präsentationswege, die eine Beladung auf MHC-Klasse-I-Moleküle zulassen würden (Abb. 1). In einem TAP-unabhängigen vesikulären Weg würde die Antigenbeladung in Endosomen stattfinden. Die Idee dabei ist, dass MHC-Klasse-I-Moleküle im Komplex mit ihrem gebundenen Peptid von der Zelloberfläche recycelt werden. In diesen endosomalen Kompartimenten befinden sich neben den MHC-Klasse-I:Peptid-Komplexen auch extrazelluläre Proteine, die durch das saure Milieu mittels Hydrolasen bzw. Proteasen in kurze Peptide degradiert werden. Der normale Weg der MHC-Moleküle wäre eigentlich eine Degradation im Lysosom, aber die neu entstandenen Peptide könnten nun gegen das alte Peptid ausgetauscht werden, um so neue MHC-Klasse-I:Peptid-Komplexe zu bilden, die an die Zelloberfläche zurücktransportiert werden. Neben diesem endozytotischen Präsentationsweg wären auch zwei weitere TAP-abhängige Wege denkbar, die eine zytosolische Komponente beinhalten. Im Phagosom-Zytosol-ER Präsentationsweg würde das extrazelluläre Antigen durch Phagozytose in so genannte Phagosomen aufgenommen werden, wo durch Proteasen eine erste Degradation der Proteine stattfindet. Diese Proteinfragmente könnten durch noch ungeklärte Mechanismen vom Phagosom ins Zytosol übertreten und hier durch das Proteasom in kleine Peptide degradiert werden. Wie im klassischen MHC-Klasse-I-Präsentationsweg würden diese Peptide dann über den TAP-Transporter Zugang zum ER erhalten und könnten mittels Peptidbeladungskomplex auf MHC-Klasse-I-Moleküle geladen werden, welche dann über den Golgi-Apparat an die Zelloberfläche gelangen. Der zweite TAP-abhängige Weg ist der Phagosom-Zytosol-Phagosom Präsentationsweg. Analog zum vorigen Weg nimmt man an, dass die exogenen Partikel durch Phagozytose aufgenommen werden. Allerdings wird hier die Idee zugrunde gelegt, dass das Phagosom nicht vollständig ausgebildet wird, sondern während seiner Entstehung mit dem ER fusioniert und so ein ER-Phagosom Fusionsvesikel bildet. Dieser Fusionsvesikel enthält neben den exogenen Antigenen zusätzlich ER-Membranproteine. Es wäre denkbar, dass analog zum Rücktransport falsch gefalteter Proteine aus dem ER ins Zytosol zu deren Degradation durch das Proteasom auch die phagozytierten exogenen Proteine über solche Mechanismen aus dem Fusionsvesikel ins Zytosol gelangen. Es wird postuliert, dass der Sec61-Kanal an dieser Translokation beteiligt sein könnte (Guermontprez *et al.*, 2003; Houde *et al.*, 2003). Nach der proteasomalen Degradation der exogenen Proteine im Zytosol könnten die entstehenden Peptide

wiederum über den TAP-Transporter ins ER transportiert werden, wo die Beladung auf MHC-Klasse-I-Moleküle stattfindet.

Diese vorgeschlagenen Präsentationswege schließen sich nicht unbedingt gegenseitig aus, sondern könnten auch parallel stattfinden. Es konnte gezeigt werden, dass eine Blockade des TAP-Transporters durch ein internalisiertes lösliches exogenes Protein, das humane Cytomegalievirus (HCMV) Protein US6, zu einer verminderten Expression von MHC-Klasse-I-Molekülen an der Zelloberfläche führt. Humane DC, die aus Monozyten generiert wurden, zeigten eine um 60 bis 90 % verminderte

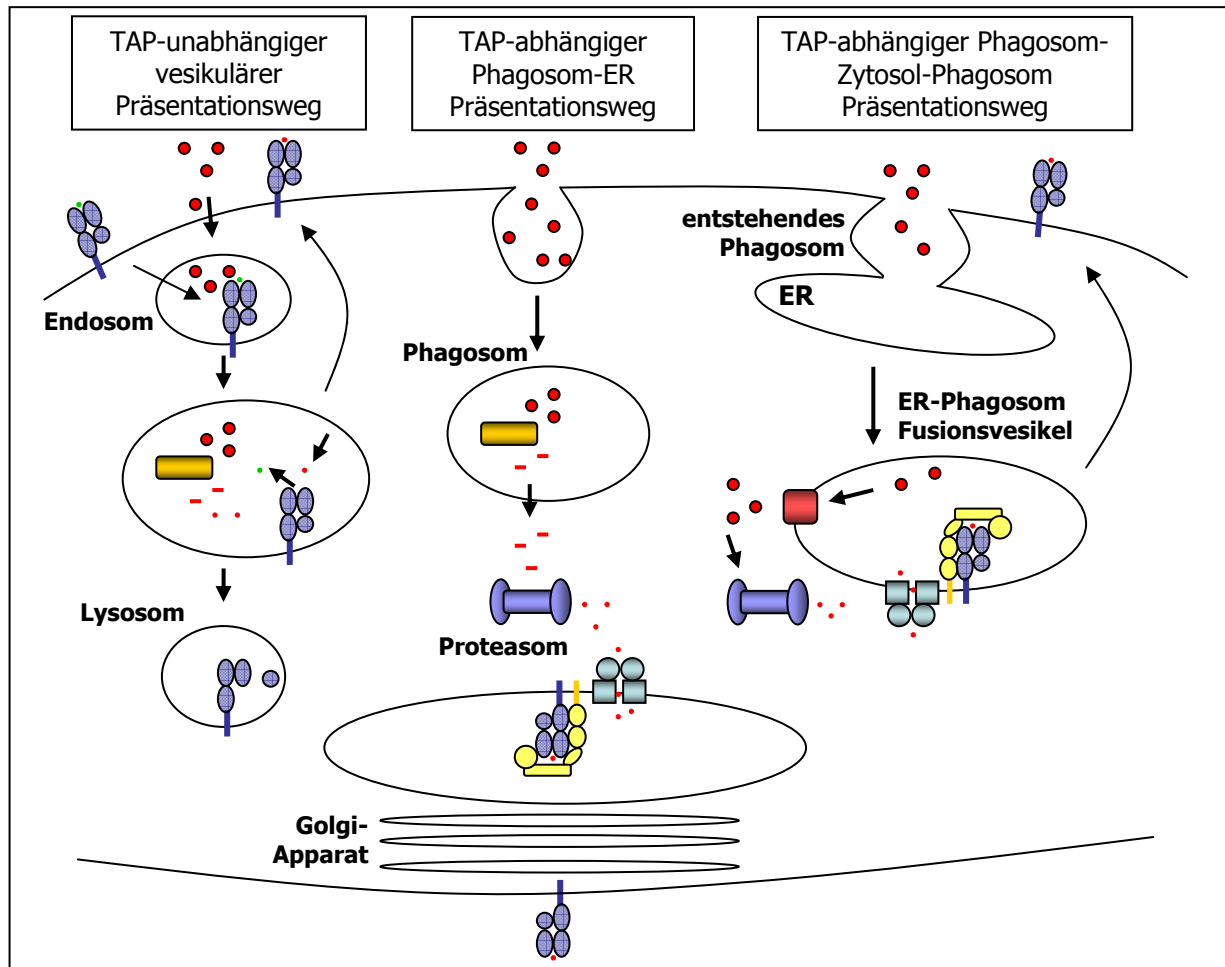


Abbildung 1: Potenzielle Präsentationswege zur Kreuzpräsentation exogener Antigene auf MHC-Klasse-I-Moleküle. Im TAP-unabhängigen vesikulären Präsentationsweg wird angenommen, dass das extrazelluläre Antigen zusammen mit den zu recycelnden MHC-Klasse-I:Peptid-Komplexen endozytiert wird. In Endosomen wird das Antigen durch Proteasen und Hydrolasen degradiert, entstehende Peptide können gegen das zuvor gebundene Peptid auf MHC-Klasse-I ausgetauscht werden. Dieser Komplex mit dem neuen vormals extrazellulären Antigen gelangt wieder an die Zelloberfläche. In den TAP-abhängigen Präsentationswegen geht man davon aus, dass Proteine aus dem extrazellulären Raum mittels Phagozytose aufgenommen werden können. Während im Phagosom-ER Präsentationsweg die zunächst im Phagosom, dann im Zytosol degradierten Antigene über den TAP-Transporter Zugang zum ER erhalten und dort analog zum klassischen Präsentationsweg auf MHC-Klasse-I-Moleküle geladen werden, wird im zweiten TAP-abhängigen Weg postuliert, dass das Phagosom bereits während seiner Entstehung mit dem ER verschmilzt. In diesem Fusionsvesikel befinden sich ER-membranständige Komponenten wie der Sec61-Kanal, über den die aufgenommenen Proteine ins Zytosol entlassen werden. Die Degradation und der Rücktransport ins ER bzw. den Fusionsvesikel erfolgt wiederum über das Proteasom bzw. TAP, so dass auch hier MHC-Klasse-I-Moleküle mit vormals extrazellulären Antigenen die Zelloberfläche erreichen.

Zelloberflächenexpression der MHC-I-Moleküle. In KG-1 Zellen (eine humane myeloide leukämische Zelllinie mit DC ähnlichen Eigenschaften) war die MHC-I-Expression um ungefähr 50 % geringer als in nicht blockierten Kontrollzellen (Ackerman und Cresswell, 2003). Diese Studien demonstrieren, dass lösliche exogene Antigene von dendritischen Zellen aufgenommen werden und das ER-Lumen erreichen können.

3.5 Die Rolle der dendritischen Zellen in der Antigenpräsentation

Antigene, die in den Körper eindringen, werden normalerweise von phagozytierenden Zellen wie den Makrophagen, dendritischen Zellen oder B-Zellen aufgenommen. Diese Pathogenaufnahme initialisiert den ersten Schritt der Immunantwort, aber um antigenspezifische T-Zellantworten zu induzieren, ist die Antigenpräsentation durch professionelle antigenpräsentierende Zellen erforderlich. Zur Einleitung der adaptiven Immunantwort muss eine reife, zirkulierende T-Zelle auf ihr spezifisches Antigen treffen. Sobald der Kontakt stattgefunden hat, wird die T-Zelle proliferieren und in Effektorzellen ausdifferenzieren, die letztlich die Aufgabe haben, pathogene Zellen mit der entsprechenden Spezifität zu zerstören. Die Erkennung des Antigens durch die T-Zelle wird durch MHC:Peptid-Komplexe gewährleistet, die an der Oberfläche von aktivierten antigenpräsentierenden Zellen exprimiert werden. Der alleinige Kontakt zwischen T-Zellrezeptor und MHC:Peptid-Komplex reicht jedoch nicht aus, um die T-Zellantwort einzuleiten. Zusätzlich werden kostimulatorische Signale benötigt. DC, B-Zellen und Makrophagen exprimieren neben großen Mengen der MHC-Moleküle auch diese kostimulatorischen Zelloberflächenmoleküle. Folglich sind B-Zellen sowie Makrophagen in der Lage, eine adaptive Immunantwort einzuleiten, aber DC sind die wohl wichtigsten professionellen antigenpräsentierenden Zellen. Durch *in vitro* Restimulationsexperimente konnte gezeigt werden, dass DC im Vergleich zu B-Zellen bzw. Makrophagen 100 bis 1000fach effektiver eine T-Zellproliferation induzieren können (Bauer *et al.*, 1999).

Wie alle Zellen des Immunsystems stammen auch DC von den hämatopoetischen Stammzellen des Knochenmarks ab. Myeloide Vorläuferzellen entwickeln sich aus diesen Stammzellen und bilden die Vorläufer der Granulozyten, Makrophagen und dendritischen Zellen. Unreife DC sind überall im Körper verbreitet und finden sich in vielen Geweben. Vorrangig treten sie in den lymphatischen Organen auf oder in jenen Körperregionen, die den direkten Kontakt zur äußeren Umgebung darstellen, wie der Haut. Nach dem Auftreten einer Injektion werden unreife DC durch Signale des angeborenen Immunsystems an den Entzündungsherd gerufen. Hier nehmen sie die Antigene mittels Phagozytose, Makropinozytose oder Rezeptor-vermittelter Endozytose auf. Entsprechende Rezeptoren auf den DC, die zur Endozytose der Pathogene führen, sind unter anderem der Mannoserezeptor oder die Fc-Rezeptoren, die Immunglobuline binden. Die Aufnahme der Antigene induziert anschließend die Reifung und Migration der DC über die Blut- bzw. Lymphbahnen vom peripheren Gewebe zu den lymphatischen Geweben, in denen sie auf T-Zellen treffen. Der Prozess der DC-Maturierung beinhaltet signifikante Veränderungen des Expressionsmusters von Zelloberflächenmolekülen. Unreife DC

exprimieren charakteristischerweise weder CD14 noch CD83, während geringe Mengen der Zellmarker CD40, CD80 und CD86, sowie der MHC-Moleküle der Klassen I und II gebildet werden. In reifen DC jedoch wird die Expression der Zelloberflächenmoleküle CD40, CD80, CD86, CD83 und MHC-Klasse-II stark erhöht. Zusätzlich zu diesem veränderten Expressionsmuster kennzeichnet reife DC auch eine modifizierte Zytokin- und Chemokinsekretion. Die Expression von Chemokinrezeptoren sowie die Sensitivität gegenüber Chemokinen sind ausschlaggebend für die Rekrutierung der DC an den Infektionsherd und die darauf folgende Migration in lymphatisches Gewebe. Unreife DC exprimieren verschiedene Chemokinrezeptoren wie unter anderem CCR5 und können über Chemokine wie z. B. RANTES durch Chemoattraktion angelockt werden (Dieu *et al.*, 1998). Die Expression mehrerer Chemokinrezeptoren wie CCR1, CCR5 und CCR6, sowie der Fc- und Mannoserezeptoren werden während der DC-Maturierung herunterreguliert, sodass reife DC die Fähigkeit verlieren, Antigene aufzunehmen. Stattdessen entwickeln DC nach ihrer Reifung Eigenschaften, die zur Aktivierung spezifischer T-Zellen benötigt werden (Cella *et al.*, 1997). Der erste Kontakt zwischen reifer DC und spezifischer T-Zelle wird über die Bindung des MHC:Peptid-Komplexes an den T-Zellrezeptor gewährleistet. Zur vollständigen Aktivierung der naiven T-Zelle werden jedoch zusätzliche kostimulatorische Signale benötigt. Die Moleküle B7-1/CD80 und B7-2/CD86, die beide auf reifen DC vermehrt exprimiert werden, verstärken durch die Bindung an CD28 auf den T-Zellen das TCR-Signal und induzieren eine T-Zellaktivierung (Banchereau und Steinman, 1998). Bis eine spezifische T-Zelle das zu ihr passende Antigen auf der dendritischen Zelle findet, müssen DC mit einigen T-Zellen aufeinander treffen und sich gegenseitig abtasten. Dazu ist ein enger physiologischer Kontakt, die so genannte immunologische Synapse, nötig. Reife DC exprimieren eine Vielzahl verschiedener Adhäsionsrezeptoren wie z. B. LFA-1 oder ICAM-1, die eine Bindung an T-Zellen ermöglichen (Scheeren *et al.*, 1991).

Nicht nur das Expressionsmuster der Chemokine und Chemokinrezeptoren, sondern auch die Sekretion verschiedener Zytokine wird in den DC den unterschiedlichen Entwicklungsstadien und Reifungszuständen angepasst. DC sekretieren eine weite Bandbreite an Zytokinen wie u. a. IL-12, IL-1 β , IL-4, IL-6, IFN α , IFN γ und TNF α . Die Art des Antigens und die Zytokinumgebung am Infektionsherd entscheidet darüber, welche Zytokine von der reifen dendritischen Zelle sekretiert werden. Das freigesetzte Zytokinrepertoire wiederum nimmt Einfluss auf die Entwicklung der T-Zellantwort in eine zelluläre oder humorale Richtung (T_h1 bzw. T_h2). Während Antigene, die DC zur Freisetzung von IL-12 veranlassen, eine Differenzierung der CD4⁺ T-Zellen zu T_h1 polarisieren, induzieren Antigene, die eine IL-12-Sekretion in DC blockieren, eher eine Immunantwort in Richtung T_h2 (Moser und Murphy, 2000).

In den sekundären lymphatischen Organen der Maus finden sich mindestens drei verschiedene Subtypen der klassischen CD11c^{hi} DC. Dazu zählen die CD8 α ⁺, CD4⁺ und CD8⁻/CD4⁻ DC. Im murinen System existiert auch eine DC-Population, die eine geringe Menge an CD11c exprimiert (CD11c^{low}). Diese Zellen gehören der plasmazytoiden Linie an (Vremec *et al.* 2000). Im menschlichen Immunsystem kann diese Unterscheidung zwischen CD11c^{hi} und CD11c^{low}-exprimierenden DC auch getroffen werden. DC myeloiden Ursprungs sind CD11c⁺, CD33⁺ und CD13⁺ und differenzieren aus

CD34⁺ Vorläuferzellen bzw. CD14⁺ Monozyten. Diese Zellen können aus peripherem Blut in großer Zahl relativ einfach gewonnen werden und differenzieren unter Einfluss der Zytokine GM-CSF und IL-4 zu unreifen DC aus. Plasmazytoide oder lymphoide DC sind negativ für die Oberflächenmoleküle CD11c, CD33 und CD34, exprimieren aber den Marker CD123. Diese DC induzieren nach der Detektion einer viralen Infektion Typ-I-Interferone wie IFN α und IFN β , die möglicherweise die Reifung myeloider DC induzieren (Cerundolo *et al.*, 2004).

Bezüglich ihrer Funktion, Antigene zu präsentieren, spielen DC auch eine entscheidende Rolle bei der Kreuzpräsentation. Man glaubt, dass im Vergleich zu B-Zellen oder Makrophagen vorrangig DC diese Fähigkeit besitzen. Allerdings bestehen Unterschiede zwischen den einzelnen Subtypen der DC und so geht man davon aus, dass in der Maus nur CD8⁺ DC extrazelluläre Antigene kreuzpräsentieren können (den Haan *et al.*, 2000), während die CD8⁻ DC effektiver bei der Aktivierung der CD4⁺ T-Zellen im Rahmen der klassischen Antigenprozessierung sein sollen (Pooley *et al.*, 2001).

Die Antigenpräsentation durch DC ist ein initialer Schritt bei der Induktion der adaptiven Immunität, jedoch besitzen DC auch eine wichtige Rolle in der Autoimmunität. Normalerweise reagieren reife T-Zellen nicht auf Selbstpeptide. Autoreaktive T-Zellen werden bereits während ihrer Entwicklung im Thymus durch Mechanismen beseitigt, die der negativen Selektion zugeschrieben werden. Diese zentrale Toleranz ist allerdings nicht absolut, da nicht alle Selbstantigene im Thymus präsentiert werden bzw. nicht während der T-Zellentwicklung auftreten, sondern erst in späteren Lebensphasen. Um diese autoreaktiven T-Zellen zu eliminieren, werden DC benötigt. Unreife DC können gewebespezifische Autoantigene in den peripheren Lymphorganen präsentieren, ohne dabei weitere kostimulatorische Faktoren zu exprimieren. Die Erkennung des Antigens ohne zusätzliche Kostimulation führt bei einer naiven T-Zelle zur Anergie. Diese durch DC vermittelte periphere Toleranz induziert die Deletion autoreaktiver T-Zellen (Banchereau und Steinman, 1998; Banchereau und Palucka, 2005).

3.6 Die Hitzeschockproteine

Einige der am weitesten verbreiteten Proteine in einer Zelle gehören zur hochkonservierten Proteinfamilie der Hitzeschockproteine (Hsp). Diese Proteine werden in allen Zellen von Prokaryonten bis Eukaryonten exprimiert und treten in unterschiedlichen Zellorganellen wie ER, Zellkern, Mitochondrien oder Zytosol auf. Anhand ihrer molekularen Größe können sechs Untergruppen unterschieden werden: die Familie der kleinen Hsp (z. B. Hsp27), Hsp40, Hsp60, Hsp70, Hsp90 und Hsp100. Zusätzlich können Hsp weiter unterteilt werden hinsichtlich ihres Vorkommens in der Zelle (Gething und Sambrook, 1992). In physiologisch normalen Situationen spielen ubiquitär vorkommende Hitzeschockproteine eine wichtige Rolle als Chaperone, die an der korrekten Faltung und Reifung von Proteinen beteiligt sind. Diese nicht-stressinduzierten Hitzeschockproteine werden auch Hsc genannt (*heat shock cognates*). Unter Extrembedingungen wird die Expression der Hitzeschockproteine erhöht, um neue Proteine während des Syntheseprozesses zu stabilisieren und so vor Fehlfaltung zu schützen.

Zu zellulärem Stress, der die Hsp-Expression induziert, zählen Umwelteinflüsse wie Hitze, Ultraviolettstrahlung, Schwermetalle oder Ethanol, aber auch biologische Faktoren wie z. B. eine virale Infektion, die eine erhöhte Proteinsynthese in der Zelle fordert. In diesen Situationen stabilisieren die Hitzeschockproteine zelluläre Proteine, um sie vor Fehlfaltungen und damit verbundener Denaturierung bzw. vor fehlerhafter Aggregation mit anderen Proteinen zu schützen. Außerdem helfen sie beim Transport der Proteine innerhalb der Zelle, bei Konformationsänderungen und der Formierung multimerer Proteinkomplexe und sie verändern die Substrataktivität gebundener Proteine. Zusätzlich erleichtern Hsp den Abbau nicht mehr funktionsfähiger Proteine über das Proteasom (Gamer *et al.*, 1996).

Neben dieser zellbiologisch wichtigen Eigenschaft wird den Hsp auch eine bedeutende immunologische Rolle beigemessen. Bereits in den 60er Jahren beobachteten Foley (1953) bzw. Prehn und Main (1957), dass Inzuchtmäuse, die ein Methylcholanthren-induziertes Sarcom entwickelt hatten, nach der Entfernung des Tumors vor einer erneuten Transplantation desselben geschützt waren. Es wurde deutlich, dass jeder einzelne Tumor eine individuelle Immunogenität besaß. Die Mäuse konnten nur den jeweiligen Tumor abwehren, dem sie zuvor ausgesetzt waren, nicht aber andere Methylcholanthren-induzierte Tumore (Foley, 1953; Prehn und Main, 1957). Über genauere Analysen der einzelnen Tumorzellbestandteile konnten Hitzeschockproteine als Faktoren ausgemacht werden, die für den immunologischen Schutz gegen den jeweiligen Tumor verantwortlich waren. Das im ER befindliche Protein gp96 war das erste Hitzeschockprotein, bei dem man diese antitumorale Wirkung feststellte (Srivastava und Das, 1984). Nach und nach wurde dieser Effekt auch bei Hsp70, Hsp90, Hsp110, Hsp170 und Calreticulin beobachtet. Auch eine Beladung von Hsp70 und gp96 mit Peptiden *in vitro* konnte eine spezifische zytotoxische T-Zellantwort induzieren (Blachere *et al.*, 1997). Wurden die Hsp-assoziierten Peptide entfernt, konnte keine Immunantwort mehr ausgelöst werden (Udono und Srivastava, 1993). Der Schutz ließ sich also nicht auf das Hitzeschockprotein selbst zurückführen, was auch Versuche mit gp96 zeigten, das aus anderem Tumorgewebe isoliert worden war und keine antitumorale Wirkung zeigte (Tamura *et al.*, 1997, Udono *et al.*, 1994). Daher lag der Schluss nahe, dass die antitumorale Wirkung nicht vom Hitzeschockprotein selbst ausgeht, sondern von den komplexierten Peptiden des Tumorzelllysates stammt. Gleichzeitig konnte der Nachweis erbracht werden, dass weder die Hitzeschockproteine alleine, noch die einzelnen Peptide fähig waren, eine Immunreaktion auszulösen. Auch führten Peptidkomplexe mit anderen nicht zur Hitzeschockfamilie gehörenden Proteine (wie z. B. mit dem peptidbindenden Serumprotein Albumin) nicht zu einer Immunogenität.

Diese Peptidbindung der Hsp-Moleküle ist als Nebeneffekt ihrer eigentlich physiologischen Rolle als Chaperone anzusehen. Hsp binden an kurze lineare, d. h. entfaltete Proteinsequenzen und besitzen demnach ebenso die Fähigkeit, an freie Peptide wie z. B. die durch einen Tumor freigesetzten Antigene zu komplexieren. Man nimmt an, dass die Hsp:Peptid-Komplexe an spezifische Zelloberflächenrezeptoren auf antigenpräsentierenden Zellen binden und internalisiert werden. Die gebundenen Peptide werden in der Zelle prozessiert und in den MHC-Klasse-I-Präsentationsweg eingeschleust, so dass Hitzeschockproteine eine Schlüsselrolle in der Kreuzpräsentation einnehmen

(Suto und Srivastava, 1995). Ein Vergleich von freien und an Hitzeschockproteine gebundenen Proteinen im Zytosol zeigte, dass eine effektivere Präsentation auf MHC-Klasse-I-Molekülen im Falle der Assoziation mit Hsp erfolgt (Binder *et al.*, 2001). Dies könnte dafür sprechen, dass im Zytosol lokalisierte Chaperone wie die Hsp eine wichtige Funktion in der Antigenprozessierung besitzen (Srivastava *et al.*, 1994). Wie genau die über Hsp komplexierten Peptide ihren Zugang zum MHC-Klasse-I-Prozessierungsweg erhalten ist noch nicht aufgeklärt. Aber es gibt Hinweise, dass Hitzeschockproteine exogene Antigene effizient kreuzpräsentieren und diese den CD8⁺ T-Zellen zugänglich machen.

Aus *in vitro* Studien geht hervor, dass Hitzeschockproteine Proteine verschiedener Komposition, Hydrophobizität und Größe binden können und auch Peptide effizient komplexiert werden. Nur geringe Mengen wie 1-2 ng Peptid sind nötig, um Hsp-Komplexe zu bilden und eine zelluläre Immunantwort zu induzieren. Auch wenn der größte Teil der zytosolischen Peptide degradiert wird und nur eine kleine Fraktion der Gesamtpeptide an zytosolische oder im ER vorkommende Hsp binden, können diese Hsp:Peptid-Komplexe dennoch die Antigenpräsentation und Induktion einer Immunantwort erhöhen (Gullo und Teoh, 2004).

Die von den Hitzeschockproteinen ausgehende Immunogenität wird auf vier Eigenschaften dieser Proteine zurückgeführt: die Bindung von Peptiden bzw. Proteinen, ihre rezeptorvermittelte Endozytose durch antigenpräsentierende Zellen und die Fähigkeit zur Induktion von Zytokinen durch DC, sowie die Reifung der DC durch Hsp (Singh-Jasuja *et al.*, 2001; Basu und Srivastava, 2000). Es ist also einerseits die Stimulation der adaptiven Immunität, die die Hitzeschockproteine auszeichnet, aber ebenso wichtig ist auch die Induktion einer angeborenen Immunantwort. Es konnte gezeigt werden, dass gp96 die Reifung von DC induziert und zur verstärkten Expression der Oberflächenmoleküle MHC-Klasse-I und II, CD40, CD80 und CD86, sowie zur Sekretion der proinflammatorischen Zytokine IL-12, TNF α und IL-1 β führt (Zengh *et al.*, 2001; Schild und Rammensee, 2000). Einen weiteren Hinweis auf die Einleitung der angeborenen Immunität durch Hsp bietet die Beobachtung, dass Makrophagen, die mit Hsp70 stimuliert wurden, Stickstoffoxid (NO) freisetzen und die Aktivierung von NK-Zellen induzieren (Strbo *et al.*, 2002).

Da bereits geringe Mengen der Hsp:Peptid-Komplexe ausreichend sind, um eine T-Zellantwort effizient zu induzieren, wurden schon bald spezifische Rezeptoren für die Hitzeschockproteine auf der Oberfläche von der antigenpräsentierenden Zellen postuliert (Srivastava *et al.*, 1994). Folgendes Modell wurde vorgeschlagen: Die Lyse virusinfizierter Zellen bzw. von Tumorzellen führt zur Freisetzung der Hitzeschockproteine. Nach der Bindung der tumoralen und viralen Peptide und anschließender Aufnahme der Hsp:Peptid-Komplexe in antigenpräsentierende Zellen, kann das an Hsp assoziierte Peptid in den endogenen MHC-Klasse-I-Weg eingeschleust und folglich über MHC-Klasse-I-Moleküle den CD8⁺ T-Zellen präsentiert werden. Es wurden viele Untersuchungen angestellt, um die Frage zu klären, über welche Rezeptoren die Hsp:Peptid-Komplexe in die Zelle aufgenommen werden. CD91 wurde als Hauptrezeptor für Hsp70 und Hsc90 identifiziert. Doch auch andere Rezeptoren spielen bei der Endozytose eine wichtige Rolle. Zum Beispiel konnte für TLR2 und TLR4 eine Beteiligung an der Hsp-Bindung nachgewiesen werden (Vabulas *et al.*, 2002). Becker und Mitarbeiter

(2002) zeigten, dass Hsp70:Peptid-Komplexe spezifisch an den Rezeptor CD40 binden und über diesen auch internalisiert werden. In einer weiteren Studie wurden zusätzliche Kandidaten als Hsp-Rezeptoren vorgestellt: CD36, LOX-1, CD14 und SR-A (Binder *et al.*, 2004). Noch immer sind viele Fragen offen, unter anderem welche Rezeptoren auf welchen antigenpräsentierenden Zellen exprimiert werden, oder ob einige Rezeptoren dieselben Hsp binden können. Um mehr über die nach der Hsp-Aufnahme induzierten Signalwege zu erfahren, muss auch der genaue Mechanismus der endozytotischen Aufnahme der Hsp:Peptid-Komplexe noch aufgeklärt werden. Generell wird vermutet, dass zur effektiven Kreuzpräsentation der über die Hsp eingeschleusten Antigene eine rezeptorvermittelte Endozytose nötig ist, während eine unspezifische Aufnahme mittels Makropinozytose keine antigenspezifischen T-Zellantworten induziert.

Es bestehen Bestrebungen, die immunologischen Eigenschaften der Hitzeschockproteine für eine Immuntherapie zu nutzen und Hsp als antitumorale Vakzine einzusetzen. Es konnte gezeigt werden, dass humane Hsp mit Antigenen Komplexe bilden und diese mit Rezeptoren auf humanen antigenpräsentierenden Zellen reagieren. Für das Hitzeschockprotein gp96 weiß man, dass Hsp:Peptid-Komplexe aus humanen Tumorzelllysaten tumorspezifische CD8⁺ T-Zellantworten induzieren können (Parmiani *et al.*, 2004). Aus diesen Beobachtungen resultiert die Idee, dass aus Tumorzellen Lysate gewonnen und Hsp:Peptid-Komplexe isoliert werden könnten, um diese dann zur Immunisierung zurück in den Patienten zu geben. *In vitro* Studien zeigten, dass gp96:Peptid-Komplexe isoliert aus Melanomen bzw. Kolonkarzinomen starke antigenspezifische Immunantworten auslösten (Rivoltini *et al.*, 2003). In klinischen Studien, die bereits die Phase II und III erreicht haben, werden Melanompatienten mit autologen tumorgenerierten gp96:Peptid-Komplexen immunisiert (Antigenics, Oncophage; Parmiani *et al.*, 2004). Patienten, die 10 Dosen des Impfstoffes verabreicht bekamen, zeigten eine um 29 % verbesserte Überlebensdauer (Richards *et al.*, 2006). Die geringe Toxizität der Präparate und längere Überlebensraten der Patienten lassen die Hoffnung zu, Hitzeschockproteine künftig als Therapeutikum bei verschiedenen Tumorerkrankungen einzusetzen.

3.7 Das Mammakarzinomantigen HER2/neu

Das Protoonkogen HER2/neu (HER2, EGFR2, ErbB-2) kodiert für ein 185 kDa großes Transmembranmolekül, das starke Homologie zu dem epidermalen Wachstumsfaktorrezeptor EGFR (*epidermal growth factor receptor*) aufweist und daher dieser Proteinfamilie zugeordnet wird (Coussens *et al.*, 1985). Die EGF-Rezeptorfamilie beinhaltet mehrere Liganden und vier verschiedene Rezeptoren: HER1/ErbB-1, HER2/ErbB-2, HER3/ErbB-3 und HER4/ErbB-4. Die Aminosäuresequenz von HER2/neu ist zwischen den Spezies hochkonserviert, so dass das Protein der Ratte zu 89 % homolog zu der humanen Sequenz ist. HER2/neu wird normalerweise während der fötalen Entwicklung exprimiert. Es besitzt die Aufgabe, die Zellproliferation zu stimulieren, den programmierten Zelltod (Apoptose) zu hemmen und spielt außerdem eine Rolle bei der Kontrolle der Zellteilung und Zellreparatur. Als Membranprotein lässt sich HER2/neu in drei Abschnitte gliedern: eine große

extrazelluläre Domäne (*extracellular domain*, ECD), eine kurze Transmembrandomäne (TMD) und einen intrazellulären Abschnitt (*intracellular domain*, ICD). Der zytoplasmatische Teil des Proteins beinhaltet sowohl die Kinasedomäne als auch eine carboxyterminale Domäne, die nach der Rezeptoraktivierung autophosphoryliert wird. Obwohl die Expression von HER2/neu während der Embryonalentwicklung relativ stark ist, können in gesunden adulten Epithelzellen nur geringe Mengen des Proteins detektiert werden. Im Tumorgewebe jedoch wird das Genprodukt stark amplifiziert, so dass in vielen humanen Tumoren, wie Brust-, Eierstock- und Magen-Darm-Krebs, die Expression des Proteins um 20 bis 30 % erhöht ist. Diese Überexprimierung macht HER2/neu als potentielles Targetmolekül für die Immuntherapie interessant.

Mehrere Studien konnten zeigen, dass HER2/neu-spezifische Antikörper in Brustkrebspatientinnen detektierbar sind und durch *in vitro* Experimente konnten außerdem HER2/neu-spezifische T-Zellantworten nachgewiesen werden (Disis *et al.*, 1994). Demnach existiert in den Patientinnen also eine Immunität gegen HER2/neu, jedoch scheint diese nicht auszureichen, um das Tumorstadium aufzuhalten bzw. den Tumor zu zerstören. Die einzig momentan greifbare Therapie, die der Markt bietet, ist die passive Immunisierung mit dem humanisierten monoklonalen Antikörper Trastuzumab (Herceptin, Genentech). Dieser Antikörper bindet an die extrazelluläre Domäne von HER2/neu und bewirkt damit die Rezeptorinternalisierung. Dadurch werden Rezeptor induzierte Signalkaskaden unterbunden, was letztlich die Einstellung des Tumorstadiums und die Apoptose zur Folge hat (Baselga, 2001). Zusätzlich induziert die Antikörperbindung an HER2/neu eine durch NK-Zellen veranlasste Antikörper-abhängige Zellzytotoxizität (*antibody dependent cell cytotoxicity*, ADCC) bzw. zerstört die Tumorzellen durch die Aktivierung des Komplementsystems (Spiridon *et al.*, 2002). Die bisherige Therapie mit Trastuzumab zeigte in 11 bis 26 % der Patienten mit metastasierendem Krankheitsverlauf einen deutlichen Rückgang des Tumors. Die Kombination der passiven Immunisierung mit einer zusätzlichen Chemotherapie verbesserte die antitumorale Wirkung des Antikörpers, so dass die Patientinnen eine verlängerte Überlebensrate von 6 Monaten aufwiesen (Hortobagyi, 2005). Der große Nachteil der Antikörpertherapie ist allerdings, dass nur ungefähr ein Drittel aller Patientinnen mit HER2/neu überexprimierendem Tumor überhaupt auf die passive Immunisierung anspricht, bei der großen Mehrheit der Tumorerkrankten jedoch kein Rückgang festgestellt werden kann. Ehemals erfolgreich therapierte Patientinnen entwickeln oftmals eine Resistenz und reagieren nicht mehr auf Trastuzumab. Ein weiterer negativer Nebeneffekt dieser Therapie ist, dass in 2 bis 10 % aller Patienten starke Nebenwirkungen auftreten (Dubská *et al.*, 2005). Die Tatsache, dass einige der behandelten Patientinnen Resistenzen entwickeln, kann dadurch erklärt werden, dass HER2/neu-negative Tumorvarianten entstehen bzw. die extrazelluläre Domäne proteolytisch abgespalten wird. In diesem Fall würde Trastuzumab lediglich zirkulierendes ECD, aber nicht mehr an die Tumorzelle binden. Ein weiterer Grund für das Versagen der Antikörpertherapie könnte die Entstehung alternativer RNA-Transkripte sein, welche keine ICD mehr besitzen. Dieses HER2/neu-Protein würde nicht mehr an der Zelloberfläche exprimiert werden, sondern verbleibt im Zellinneren und bietet daher auch keinen Zugang für den Antikörper.

Eine optimale Immuntherapie zur Bekämpfung HER2/neu-positiver Mammakarzinome sollte einerseits analog zu Trastuzumab humorale Immunantworten induzieren, andererseits aber auch eine zelluläre Immunität auslösen, die sowohl zytotoxische T-Zellen als auch T-Helferzellen umfasst. Ein Impfstoff gegen HER2/neu, der gleichermaßen T- und B-Zellantworten induziert, bietet deutlichen Vorteil gegenüber einem passiven Transfer des Antikörpers Trastuzumab alleine. Zusätzlich kann eine Vakzine ein immunologisches Gedächtnis hervorrufen, das lang anhaltenden Schutz bietet, während der Antikörper zwar eine schnelle und direkte, aber auch kurzlebige Immunantwort induziert (Foy *et al.*, 2002).

Beim Vakzindesign gegen HER2/neu müssen mehrere Punkte beachtet werden. Einerseits ist HER2/neu ein Selbstantigen, das in einer Vielzahl verschiedener gesunder Zellen in unterschiedlichen Geweben exprimiert wird. Dies führt zu dem Problem der Toleranz und der Inhibition der therapeutischen Effekte der Vakzine. Studien, in denen Ratten mit Selbst-HER2/neu immunisiert wurden, zeigten keine Induktion einer spezifischen Immunantwort. Wurden stattdessen Mäuse mit Ratten-HER2/neu immunisiert, konnte eine hohe Immunogenität des Proteins festgestellt werden. Die Toleranz gegenüber dem Selbstprotein in Ratten konnte dadurch umgangen werden, dass nicht das gesamte Protein als Vakzine eingesetzt wurde, sondern nur einzelne Peptidfragmente (Disis *et al.*, 1996a). Weitere Studien zeigten, dass Mäuse nach einer Immunisierung mit dem Selbst-HER2/neu Protein, in welchem zuvor einige Regionen deletiert worden waren, sowohl zelluläre als auch humorale Immunantworten gegen HER2/neu entwickelten (Foy *et al.*, 2002). In Mäusen, die mit einem ähnlich modifizierten humanem HER2/neu-Protein immunisiert worden waren, konnte die Immunantwort sogar verstärkt werden. Diese Vakzinierungsstudien zeigen, dass generell eine Immunität gegen das Selbst-HER2/neu-Protein existiert, die autoreaktiven Immunzellen aber durch Mechanismen der Toleranz inaktiviert werden. Auch in einem murinen Mammakarzinommodell konnte dies beobachtet werden. BalbneuT-Mäuse sind transgen für das HER2/neu-Protein der Ratte und exprimieren dies unter der Kontrolle des Maus-Mammatumorvirus (MMTV). Die Überexpression des Onkogens führt in diesen Tieren zur Bildung von schnell wachsenden Tumoren in den Brustdrüsenepithelien, welche in ungefähr 15 bis 20 Wochen alten Tieren etabliert sind (Boggio *et al.*, 1998). Analog zu den Beobachtungen in Brustkrebspatientinnen zeigen diese HER2/neu-transgenen Mäuse schwache zelluläre und humorale Immunantworten gegen das Onkogen. Diese können zwar das Tumorstadium nicht verhindern, aber dennoch unterstreicht diese Beobachtung die These, dass keine absolute Toleranz gegen das Brustkrebsantigen und Selbstprotein-HER2/neu besteht (Ercolini *et al.*, 2005). Folglich könnten Vakzinen die bereits existierende Immunität gegen HER2/neu verstärken, so dass eine Tumoralabwehr möglich wird.

3.8 Vakzinierungsstrategien

Das generelle Ziel einer Vakzinierung bei Tumorerkrankungen ist die Induktion einer starken antitumoralen zellulären Immunantwort und zusätzlich die Aktivierung spezifischer Antikörper. Durch

die Verabreichung des Tumorantigens in einem immunstimulatorischen Kontext soll die bestehende Toleranz gegen die Selbst-Tumorantigene gebrochen und eine lang anhaltende Immunabwehr geschaffen werden, so dass der Tumor zerstört und eine Neubildung effektiv verhindert wird.

Auch wenn im Immunsystem von Tumorpatienten spezifische Abwehrzellen detektierbar sind, gelingt es dem Tumor durch spezielle Mechanismen, der immunologischen Abwehr zu entkommen. Dazu gehört zum einen die Etablierung eines immunsuppressiven Milieus, das der Tumor in seiner unmittelbaren Umgebung schafft. Durch regulatorische T-Zellen, myeloide Suppressorzellen oder Faktoren wie VEGF, IL-10 oder TGF β werden aktivierte tumorspezifische T-Zellen gehemmt. Diese Faktoren tragen auch dazu bei, dass DC in einem unreifen Zustand bleiben, so dass diese trotz Antigenaufnahme keine adaptive Immunantwort auslösen können. Von der Tumorumgebung beeinflusste DC tendieren statt dessen dazu, antiinflammatorisch zu wirken, in dem sie regulatorische T-Zellen aktivieren (Cerundolo *et al.* 2004). Zusätzlich wird in Tumorzellen das MHC-Klasse-I-Molekül vermindert exprimiert oder es entstehen antigenegative Varianten bzw. mutierte Antigene, so dass die Tumorzelle der Erkennung durch das Immunsystem entgeht. Oftmals fehlen auch kostimulatorische Moleküle auf den Tumorzellen, so dass die T-Zelle über den T-Zellrezeptor zwar das Tumorantigen erkennt, aber keine sekundäre Stimulation über den CD28-Rezeptor erfährt, was zur vollständigen Aktivierung der T-Zellen nötig ist.

Es gibt verschiedene Ansätze der Tumorstimmung, unter anderem die Immunisierung mit autologen Tumorzellen. Dazu werden Tumorzellen entweder direkt aus dem Patienten oder autologen Gewebekulturen gewonnen. Die Zellen werden bestrahlt, um sie teilungsunfähig zu machen, und anschließend zusammen mit Chemotherapeutika oder proinflammatorischen Adjuvantien zurück in den Patienten gegeben. Die injizierten Tumorzellen werden im Patienten von DC aufgenommen, die Antigene prozessiert und präsentiert, so dass tumorspezifische Immunantworten eingeleitet werden (Berd *et al.*, 2004). Vorteil dieser Therapie ist, dass sämtliche Tumorantigene enthalten sind, die nicht extra determiniert werden müssen. Allerdings kann das autologe Tumormaterial nur immer auf den jeweiligen Spender angewendet werden, es lässt sich also nicht als allgemeine Vakzine auf mehrere Patienten übertragen. Daher stellt die Behandlungsmethode mit allogenen Tumorzellen einen entscheidenden Vorteil dar. Hier werden zur Vakzinierung Tumorzelllinien von mehreren Patienten gewählt, so dass dem Immunsystem eine große Bandbreite von Tumorantigenen zur Verfügung gestellt wird. Im Fall von Melanomkrankungen wurde das Medikament Canvaxin eingesetzt, das aus drei verschiedenen Melanomzelllinien besteht (Morton *et al.*, 2002). Analog wie bei der Immunisierung mit autologen Tumorzellen wird auch diese Vakzine bestrahlt, um ein Wachstum der injizierten Tumorzellen im Patienten zu verhindern.

Die wahrscheinlich etablierteste Vakzinierungsmethode ist die Immunisierung mit einzelnen Peptiden. Sie bieten den Vorteil der einfachen Synthese, ist jedoch durch die MHC-Restriktion der Peptide limitiert. Die Peptidimmunisierung setzt voraus, dass das zu untersuchende Tumorantigen bekannt ist. Zusätzlich deckt das Peptid lediglich ein einzelnes Epitop ab, so dass mehrere miteinander kombiniert werden müssen, um eine breite Immunantwort auszulösen (Nouri-Shizari *et al.*, 2000). Eine optimale Vakzine beinhaltet also multiple Peptide, damit eine ausreichende zelluläre Immunität induziert wird.

In klinischen Studien, in denen Brustkrebspatientinnen mit Peptiden der extrazellulären bzw. intrazellulären Domäne von HER2/neu immunisiert wurden, konnte durch die Detektion von CD4⁺ T-Helferzellantworten gezeigt werden, dass das Immunsystem auf diese immunogenen Peptide reagiert (Disis *et al.*, 1999).

Die Immunisierung mit DNA bietet aufgrund der relativ einfachen Herstellung einige Vorteile. Plasmid-DNA wird normalerweise intramuskulär oder intradermal verabreicht, um *in vivo* Zellen zu transfizieren und die Produktion des gewünschten Antigens zu induzieren. Über diese Vakzine können viele verschiedene Antigenepitope eingeschleust werden, so dass ein möglichst breites Spektrum der Immunantwort ausgelöst wird. Um die Immunogenität zu erhöhen, wird die DNA oftmals in virale Vektoren verpackt, die eine höhere Gentransduktionseffizienz besitzen, als nackte Plasmid-DNA. Zusätzlich enthält der Vektor bzw. die rekombinante DNA noch adjuvante Sequenzen (CpG) bzw. Adjuvantien werden parallel zur DNA-Vakzinierung verabreicht (z. B. IL-12), so dass das Immunsystem optimal stimuliert wird. In verschiedenen murinen Brustkrebsmodellen konnte gezeigt werden, dass diese DNA-Vakzinen starke Immunantworten auslösen, die zu einem längeren tumorfreien Überleben der Mäuse führten (Spadaro *et al.*, 2005). Leider ist die DNA-Immunisierung in Menschen bislang nicht sehr viel versprechend, da in klinischen Studien deutlich wurde, dass die Immunogenität der meisten Tumorantigene nur gering ist. Durch die Fusionierung der DNA des Antigens mit Immunstimulatoren wie Chemokinen, Zytokinen oder auch Fc-Rezeptoren konnten deutlich bessere adaptive Immunantworten induziert werden, als mit der Tumor-DNA alleine (Stevenson *et al.*, 2004).

Die Proteinimmunisierung bietet gegenüber der Peptidimmunisierung den Vorteil, dass die Epitope im Einzelnen nicht bekannt sein müssen. Da in einer Proteinsequenz meist auch CD4⁺-Epitope enthalten sind, wird neben zellulären Immunantworten auch die Bildung von Antikörpern induziert. Zusätzlich integrieren Proteine mehrere Antigenepitope, so dass zytotoxische T-Zellen und T-Helferzellen unterschiedlicher Spezifität aktiviert werden. In Bezug auf das Onkogen HER2/neu wurde deutlich, dass die Immunisierung mit der kompletten Proteinsequenz aufgrund von auftretenden Toleranzeffekten wenig effektiv ist. Wurden dagegen Fragmente der intrazellulären Domäne verwendet, konnten zelluläre und humorale Immunantworten gegen HER2/neu detektiert werden (Foy *et al.*, 2002). Es wird angenommen, dass die zytoplasmatische Domäne von HER2/neu immunogener ist als der extrazelluläre Teil des Proteins, was sich dadurch erklären ließe, dass der intrazelluläre Teil den zirkulierenden Immunzellen nicht so gut zugänglich ist und daher auch weniger Toleranz induziert. Um das Problem der Toleranz zu umgehen, sollten also möglichst Proteinuntereinheiten, Proteinabschnitte oder modifizierte Proteine in die Vakzinierungsstrategie integriert werden.

Dendritische Zellen spielen bei der Induktion der zellulären bzw. humoralen Immunität eine entscheidende Rolle, da durch sie Antigene den spezifischen T-Zellen präsentiert und zusätzlich kostimulatorische Signale geliefert werden. Daher basieren viele Vakzinierungsstudien auf der Idee, die Kapazität der DC für therapeutische Zwecke zu nutzen und diese extern mit Tumorantigenen zu beladen. Die erste Immunisierung mit DC in Krebspatienten wurde 1996 veröffentlicht (Hsu *et al.*, 1996). Patienten, die an einem follikulären B-Zelllymphom litten, wurden mit autologen DC behandelt, die über Leukaphoresis direkt aus dem Blut gewonnen und *ex vivo* mit rekombinantem Protein beladen

wurden. In drei von vier Patienten konnten tumorspezifische Immunantworten detektiert werden. Diese ermutigenden Ergebnisse und die reproduzierbaren Protokolle, die zur Herstellung großer Mengen an DC aus entweder CD34⁺ Vorläuferzellen oder CD14⁺ Monozyten entwickelt werden konnten, sprechen für einen Einsatz der DC in der Immuntherapie. Die Beladung der *in vitro* generierten unreifen DC kann mit Peptiden, Proteinen, autologen oder allogenen Tumorzelllysaten erfolgen. Zusätzlich berichtet die Literatur von genmodifizierten DC, die mit tumoraler cDNA oder mRNA transfiziert werden bzw. von dem Einsatz von so genannten Hybriden aus DC und Tumorzelle (Avigan, 2004; Homma *et al.*, 2005).

Um antigenspezifische Immunantworten, die durch die beschriebenen Vakzinierungsmethoden induziert werden, weiter zu verstärken, werden zusätzliche Faktoren wie Zytokine eingesetzt. Die Kombination der DNA-Immunisierung mit IL-12 und auch die Integration dieses Zytokins bei der Immunisierung mit DC können den therapeutischen Effekt gegen einen etablierten Tumor deutlich verbessern (Boggio *et al.*, 1998; Homma *et al.*, 2005). Analog bewirkt auch Kombination von Peptiden bzw. Proteinen mit z. B. GM-CSF einen Vorteil gegenüber der Immunisierung ohne das zusätzliche Zytokin (Murray *et al.*, 2002; Foy *et al.*, 2001). Eine weitere Möglichkeit, die Immunogenität zu erhöhen und Toleranz zu brechen, ist die Modifikation der applizierten Peptide oder Proteine. Durch xenogene Immunisierung mit einem immunogenen Fremdanigen beispielsweise können kreuzreaktive Immunantworten gegen das Selbstantigen ausgelöst werden, wenn sich die Epitope in Fremd- und Selbstproteinen überschneiden. Diese Strategie zeigte sich erfolgreich bei der Induktion von Immunantworten gegen vormals tolerogene Tumorantigene (Wei, 2002; Gallo *et al.*, 2005).

Alternativ bietet der Einsatz von Hsp:Peptid-Komplexen aus Tumorgewebe die Möglichkeit, antitumorale Immunantworten zu induzieren. Wie in **3.6** beschrieben können Hitzeschockproteine als Chaperone tumorassoziierte Antigene einfangen, von antigenpräsentierenden Zellen aufgenommen und prozessiert werden, so dass tumorspezifische T-Zellen aktiviert werden können. Die erste klinische Studie mit autologen Hsp:Peptid-Komplexen wurde mit dem Hitzeschockprotein gp96 durchgeführt (Janetzki *et al.*, 2000). In Studien der Phase II und III wurden Melanompatienten mit autologen gp96:Peptid-Komplexen, die aus Tumorgewebe isoliert worden waren, immunisiert. Nach mehrmaliger Behandlung zeigten die Patienten eine erhöhte Zahl Melanom-spezifischer zytotoxischer T-Zellen und im Vergleich zu nicht behandelten Patienten eine erhöhte Lebenserwartung (Belli *et al.*, 2002). Diese Erfolg versprechenden Ergebnisse lassen vermuten, dass der Einsatz von Hitzeschockproteinen als zusätzliches Adjuvans des Immunsystems die antitumorale Immunantwort verstärken kann. Somit wird ihnen große Bedeutung in der Immuntherapie beigemessen.

3.9 Ziele der Arbeit

Trotz der Tatsache, dass entartete Zellen vom körpereigenen Immunsystem erkannt und zerstört werden, gelingt es vielen Tumorarten, der Immunabwehr auf lange Sicht zu entgehen und Metastasen

zu bilden, so dass der klinische Erfolg bisheriger Immuntherapien eher gering ist. Die Herausforderung künftiger Ansätze ist, die Stärke und Spezifität der induzierten Immunantworten zu erhöhen.

Ziel dieser Arbeit ist es, den immunologisch bedeutsamen Effekt der Hitzeschockproteine für Vakzinierungsstrategien gegen Tumoren auszunutzen. Hitzeschockproteine besitzen neben ihrer Funktion als Chaperone die Fähigkeit, Immunantworten der angeborenen Immunität zu induzieren und sie können gebundene Antigene über Mechanismen der Kreuzpräsentation in den MHC-Klasse-I-Präsentationsweg einschleusen, so dass eine adaptive Immunantwort ausgelöst wird. Durch die rekombinante Fusion eines Hitzeschockproteins mit einem Tumorantigen soll hier dieser Effekt genutzt und eine antitumorale Immunität hervorgerufen werden. Das Modell sieht vor, dass die rekombinanten Proteine über DC aufgenommen und prozessiert werden, so dass sie über die Präsentation durch MHC-Klasse-I-Moleküle den spezifischen CD8⁺ T-Zellen zugänglich werden (Abb. 2). Als Modellantigen bzw. Tumorantigen wird das humane Protein HER2/neu gewählt, das in 20 bis 30 % der Mammakarzinome überexprimiert wird und sich daher als Zielmolekül für eine Immuntherapie eignet.

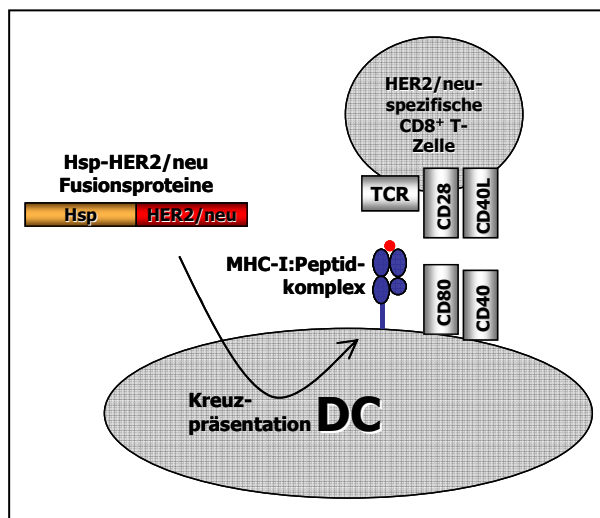


Abbildung 2: Modell der Proteinladung dendritischer Zellen und Aktivierung spezifischer T-Zellen. DC werden mit den rekombinanten Hsp-HER2/neu-Fusionsproteinen beladen. Die Proteine werden von den DC aufgenommen und prozessiert, so dass sie über die Mechanismen der Kreuzpräsentation in den MHC-Klasse-I-Präsentationsweg eingeschleust werden. Antigen-spezifische CD8⁺ T-Zellen können so aktiviert werden.

Im Wesentlichen sollen in dieser Arbeit zwei Aspekte behandelt werden, die bei der Entwicklung von Tumorstoffen auf der Basis von Hitzeschockproteinen bedeutsam sind. Zum einen soll der Adjuvanzeffekt von vier verschiedenen Hitzeschockproteinen der Hsp70-Familie eingehend beleuchtet werden. Dabei werden drei murine Hitzeschockproteine, mHsp70, mHsc70 und mHsp70L1 sowie das mycobakterielle *m.tub.*Hsp70 gewählt. Während über Hsp70, Hsc70 und *m.tub.*Hsp70 bekannt ist, dass diese Proteine Peptide kreuzpräsentieren und DC aktivieren können (Noessner *et al.*, 2002), ist Hsp70L1 weitaus weniger charakterisiert. Es wird vermutet, dass dieses Hitzeschockprotein ebenfalls gute DC-Maturierungseigenschaften besitzt und eine Polarisierung der Immunantwort in eine zelluläre Richtung (T_H1 Antwort) bewirkt (Wan *et al.*, 2004). Zur Untersuchung des Adjuvanzeffektes wird das BALB/c-Mausmodell gewählt, in denen Antigene über die MHC-Klasse-I-Moleküle K^d oder D^d präsentiert werden. Die in den Fusionsproteinen enthaltene HER2/neu-Sequenz umfasst die in der Literatur beschriebenen K^d-restringierten CD8⁺ T-Zellepitope (Nagata *et al.*, 1997). Nach der Immunisierung dieser Tiere mit den verschiedenen Hsp-HER2/neu-Fusionsproteinen durch *in vivo* Zytotoxizitätsstudien soll überprüft werden, ob eine spezifische Immunantwort gegen das humane K^d-

restringierte HER2/neu-assoziierte Epitop TYLPTNASL induziert wird. Da im murinen System eine gegen ein humanes Peptid gerichtete Immunantwort untersucht wird, welches also in der Maus als fremd gilt, kann der adjuvante Hsp-Anteil der vier verschiedenen rekombinanten Fusionsproteine gut verglichen werden. Zusätzlich zur Analyse der zytotoxischen Kapazität induzierter CD8⁺ T-Zellen, soll der antitumorale Effekt der Fusionsproteine nach einer prophylaktischen bzw. therapeutischen Immunisierung untersucht werden. Parallel sollen murine DC aus dem Knochenmark *in vitro* mit den Hsp-HER2/neu-Fusionsproteinen beladen werden, um so den Maturierungseffekt der Hitzeschockproteine untereinander zu vergleichen. Dabei soll eine veränderte Expression der Oberflächenmoleküle CD40, CD80 und CD86 analysiert werden. Zusätzlich zur DC-Reifung wird die Kapazität von HER2/neu-Fusionsprotein beladenen DC, HER2/neu-spezifische T-Zellen *in vitro* zu restimulieren, untersucht werden.

Neben der Evaluierung des Adjuvanzeffektes soll untersucht werden, ob die Hitzeschockproteine in Form rekombinanter Fusionsproteine als Vakzine zur Induktion einer HER2/neu-spezifischen Immunantwort einsetzbar sind. Die Prüfung dieser Fragestellung erfolgt in dem transgenen Mausmodell HHD, in welchem statt der murinen D^b- und β_2m -Moleküle ein humanisiertes HLA-A2-Molekül mit humaner $\alpha 1$ - und $\alpha 2$ -Domäne sowie einem humanen β_2m in Kombination mit der murinen $\alpha 3$ -Domäne und der zytoplasmatischen Domäne exprimiert wird (HLA-A2.1/D^b-h β_2m ; Pascolo *et al.*, 1997). In diesen Tieren können HLA-A2-restringierte Antigene wie das HER2/neu-assoziierte CD8⁺ T-Zellepitop KIFGSLAFL präsentiert werden. Da die murine und humane Sequenz dieses Epitops homolog ist, kann untersucht werden, ob die Immunisierung der HHD-Mäuse mit den Hsp-Fusionsproteinen eine Selbsttoleranz überwindende Immunität auslöst. KIFGSLAFL-spezifische Immunantworten sollen wiederum anhand von *in vivo* Zytotoxizitätsstudien bzw. IFN γ -Sekretion analysiert werden. Parallel zu diesem Mausmodell kann die Immunogenität der rekombinanten Proteine gegen ein Selbstantigen auch im BALB/c-Modell untersucht werden, indem die Immunantwort gegen das körpereigene, ebenfalls K^d-restringierte TYLPANASL-Epitop überprüft wird. Nach Abschluss der Untersuchungen dieser Fragestellungen wird eine Beurteilung der Qualität der Hitzeschockprotein vermittelten Immunantwort möglich sein. Es soll eine Aussage darüber getroffen werden können, in wieweit durch die Hitzeschockproteine die Immunogenität eines Fremdproteins verbessert bzw. eine Immunität gegen ein Selbstprotein hervorgerufen wird.

4 Materialien

4.1 DNA

4.1.1 Vektoren

| | |
|----------------------|---|
| pBluescript II SK(+) | 2961 bp, Amp ^R , T3/T7-Primer; Stratagene, USA |
| pRSETB | 2887 bp, Amp ^R , T7-Promotor, Hexa-Histidin-Tag; Invitrogen, Karlsruhe |
| pET21d(+) | 5443 bp, Amp ^R , T7-Promotor, Hexa-Histidin-Tag; Novagen, USA |
| pVL1393 | 9639 bp, Amp ^R , Polyhedrin-Promotor, Hexa-Histidin-Tag; Invitrogen, Karlsruhe |
| pMT2mcs | 5025 bp, Amp ^R , SV40-Promotor, Dr. J. Neefjes, Amsterdam |

4.1.2 cDNA

| | |
|---|---|
| pCMV SPORT6- huHER2/neu | Amp ^R , CMV-Promotor; zur Verfügung gestellt von RZDP, Berlin/Heidelberg (BC080193) |
| pBSKS(+)-B4402- SPB | Amp ^R , T3/T7-Promotor; zur Verfügung gestellt von Alexandra Kienast, DKFZ, Heidelberg |
| pcDNA3.1 <i>m.tub.Hsp70</i> _[359-625] | zur Verfügung gestellt von Dr. Paul Lehner, Cambridge, England |
| pYX-Asc- mHsp70 | Amp ^R , zur Verfügung gestellt von RZDP, Berlin/Heidelberg (BC054782) |
| pCMV SPORT6- mHsc70 | Amp ^R , zur Verfügung gestellt von RZDP, Berlin/Heidelberg (BC006722) |
| pCMV SPORT6- mHsp70-L1 | Amp ^R , zur Verfügung gestellt von RZDP, Berlin/Heidelberg (BC002056) |
| pIE-βGal (clone 226) | zur Verfügung gestellt von Dr. Martin Müller, DKFZ, Heidelberg |

4.1.3 Primer zur Genotypisierung der HHDII-Mäuse

| | |
|---|---|
| HLA-A0201 sense 134 (30mer) | 5' cta cag agc cta gca ggg tgt cct tgg cag 3' [10 μM] |
| HLA-A0201 antisense 385 (33mer) | 5' ctc tga gtt tct gtg tga gtc cag gac atc 3' [10 μM] |
| huβ ₂ m sense 964 (31mer) | 5' cat tga gac aga gcg ctt ggc aca gaa gca g 3' [10 μM] |
| huβ ₂ m antisense 1332 (36mer) | 5' gga tga cgt gag taa acc tga atc ttt gga gta cgc 3' [10 μM] |

4.1.4 Primer zur Klonierung der Hsp-HER2/neu-Fusionsproteine

| | |
|------------------------------------|--|
| <i>m.tub.Hsp70</i> -ct fwd (36mer) | 5' ccg agc tcg agg gag gtg aaa gac gtt ctg ctg ctt 3' |
|------------------------------------|--|

| | |
|------------------------------------|--|
| <i>m.tub.</i> Hsp70-ct rev (36mer) | 5' cgc ttc cat gga atc agc cga gcc ggg gtg ggc 3' |
| mHsp70 fwd (36mer) | 5' ccg agc tcg agg atg gcc aag aac acg gcg atc ggc 3' |
| mHsp70 rev (36mer) | 5' cgc tcc ggt acc atc cac ctc ctc gat ggt ggg tcc 3' |
| mHsc70 fwd (36mer) | 5' ccg agc tcg agg atg tct aag gga cct gca gtt ggc 3' |
| mHsc70 rev (36mer) | 5' cgc ttc ggt acc atc cac ctc ttc aat ggt ggg gcc 3' |
| mHsp70-L1 fwd (36mer) | 5' ccg agc tcg agg atg gcg gcg atc ggc gtg cac ctg 3' |
| mHsp70-L1 rev (33mer) | 5' cgc ttc cat gga tgc aac ctc aac agt aat ggc 3' |
| SBP-adap fwd (81mer) | 5' cgc tta agc ttg atc agc tcg aga ggt acc atg gaa ttc gga tcc gac gat aag acc acc ggc tgg agg ggc ggc 3' |
| SBP-adap rev (33mer) | 5' ggg ccc gtc gac ggg ctc cct ctg gcc ctg ggg 3' |

Diese Primer wurde von Herrn Weinig (DKFZ, Heidelberg) synthetisiert. Die Sequenzen der eingebrachten Restriktionsschnittstellen in die Oligonukleotide der Hitzeschockproteine sind rot gekennzeichnet. Die Konzentration der Oligonukleotide berechnete sich nach folgender Formel:

$$\frac{\text{OD}_{260} \times \text{VF} \times 100}{\text{Nukleotidzahl}} = \text{Konzentration in } \mu\text{M}$$

4.1.5 DNA-Marker

| | |
|---------------------------|-----------------------------|
| Lambda/DNAEcoRI + HindIII | MBI Fermentas, St. Leon-Rot |
| GeneRuler DNA Ladder Mix | MBI Fermentas, St. Leon-Rot |

4.2 Peptide

4.2.1 CD8⁺ T-Zellepitope

| | |
|----------------------------|--|
| KIFGSLAFL | huHER2/neu ₍₃₆₉₋₃₇₇₎ , HLA-A2-restringiert |
| KVFGSLAFV | HER2/neu ₍₃₆₉₋₃₇₇₎ modifiziert, HLA-A2-restringiert |
| TYLPTNASL | huHER2/neu ₍₆₃₋₇₁₎ , H-2K ^d -restringiert |
| TYLPANASL | mHER2/neu ₍₆₃₋₇₁₎ , H-2K ^d -restringiert |
| PYVSRLGI | mHER2/neu ₍₇₈₀₋₇₈₈₎ , H-2K ^d -restringiert |
| ILHNGAYSL | huHER2/neu ₍₄₃₅₋₄₁₃₎ , HLA-A2-restringiert |
| ILHDGAYSL | mHER2/neu ₍₄₃₅₋₄₁₃₎ , HLA-A2-restringiert |
| ALCRWGLLL | huHER2/neu ₍₅₋₁₃₎ , HLA-A2-restringiert |
| AWCRWGFL | mHER2/neu ₍₅₋₁₃₎ , HLA-A2-restringiert |
| ILKEPVHGV | RT(HIV) ₍₄₇₆₋₄₈₄₎ , HLA-A2-restringiert |
| RKKRRQRRLLKIFGSLAFL | tat(HIV) ₍₄₉₋₅₇₎ -huHER2/neu ₍₃₆₉₋₃₇₇₎ |
| RKKRRQRRLLTYLPTNASL | tat(HIV) ₍₄₉₋₅₇₎ -huHER2/neu ₍₆₃₋₇₁₎ |

4.2.2 CD4⁺ T-Helferepitope

| | |
|--------------------------|--|
| LPPGAASTQVCTGTD | huHER2/neu ₍₁₆₋₃₀₎ , I-A ^d -restringiert |
| TPPAYRPPNAPIL | HBVcore ₍₁₂₈₋₁₄₀₎ , I-A ^b -restringiert |
| ISQAVHAAHAEINEAGR | OVA ₍₃₂₃₋₃₃₉₎ , I-A ^d -restringiert |

Alle Peptide wurden mittels Festphasensynthese nach der Fmoc/tBU-Strategie von Dr. R. Pipkorn (DKFZ, Heidelberg) synthetisiert. Die Peptide wurden über HPLC aufgereinigt, massenspektrometrisch überprüft und in 100 % DMSO bei -20 °C aufbewahrt.

4.3 Enzyme und Antikörper

4.3.1 Enzyme

A) Restriktionsenzyme

Die verwendeten Restriktionsenzyme wurden ebenso wie die zugehörigen Puffer von MBI Fermentas (St. Leon-Rot) oder New England Biolabs (Frankfurt) bezogen.

B) Ligase/Phosphatase/Polymerase

| | |
|--|----------------------------------|
| T4-Ligase [10 U/μl] | MBI Fermentas GmbH, St. Leon-Rot |
| T4-DNA Polymerase [5 U/μl] | New England Biolabs (Frankfurt) |
| <i>Calf Intestine Alkaline</i> Phosphatase CIAP [1 U/μl] | MBI Fermentas GmbH, St. Leon-Rot |
| <i>Expand High Fidelity</i> Polymerase [>3.5 U/μl] | Roche Diagnostics, Mannheim |

C) zugehörige Puffer

| | |
|--|----------------------------------|
| 10x T4-DNA Ligase Puffer | MBI Fermentas GmbH, St. Leon-Rot |
| 5x T4-DNA Polymerase Puffer | MBI Fermentas GmbH, St. Leon-Rot |
| 10x CIAP Puffer | MBI Fermentas GmbH, St. Leon-Rot |
| 10x <i>Expand High Fidelity</i> Puffer mit MgCl ₂ | Roche Diagnostics, Mannheim |

4.3.2 Antikörper

A) Antikörper für die Zelloberflächenanalyse

Primärantikörper

| Marker | Klon | Verd. | Spezies | Isotyp, Hersteller |
|-----------------|----------|-------|---------------------|------------------------------------|
| Maus IA/IE FITC | 2G9 | 1:100 | Ratte, monoklonal | IgG _{2a} , BD Biosciences |
| Maus CD3 APC | 145-2C11 | 1:100 | Hamster, monoklonal | IgG ₁ , BD Biosciences |
| Human CD3 PE | HIT3a | 1:100 | Maus, monoklonal | IgG _{2a} , BD Biosciences |
| Maus CD8α FITC | 53-6.7 | 1:100 | Ratte, monoklonal | IgG _{2a} , BD Biosciences |
| Maus CD8α PE | 53-6.7 | 1:100 | Ratte, monoklonal | IgG _{2a} , BD Biosciences |

Primärantikörper

| Marker | Klon | Verd. | Spezies | Isotyp, Hersteller |
|-------------------------|-------------------------|---------|-----------------------|---|
| Maus CD8 α PerCp | 53-6.7 | 1:100 | Ratte, monoklonal | IgG _{2a} , BD Biosciences |
| Maus CD8 α APC | 53-6.7 | 1:100 | Ratte, monoklonal | IgG _{2a} , BD Biosciences |
| Human CD8 FITC | HIT8a | 1:100 | Maus, monoklonal | IgG ₁ , BD Biosciences |
| Maus CD11c PE | HL3 | 1:100 | Hamster, monoklonal | IgG ₁ , BD Biosciences |
| Maus CD11c Biotin | HL3 | 1:100 | Hamster, monoklonal | IgG ₁ , BD Biosciences |
| Maus CD40 PE | 3/23 | 1:100 | Ratte, monoklonal | IgG _{2a} , BD Biosciences |
| Human CD45RA APC | HI100 | 1:100 | Maus, monoklonal | IgG _{2b} , BD Biosciences |
| Maus CD80 PE | 16-10A1 | 1:100 | Ratte, monoklonal | IgG _{2a} , BD Biosciences |
| Maus CD86 PE | GL1 | 1:100 | Ratte, monoklonal | IgG _{2a} , BD Biosciences |
| Maus IFN γ APC | XMG1.2 | 1:50 | Ratte, monoklonal | IgG ₁ , BD Biosciences |
| Maus K ^d | K9-18 | unverd. | C3H-Hybridomüberstand | IgG _{2a} , Dr. F. Momburg (DKFZ) |
| Human HLA-A2 | BB7.2 | unverd. | Hybridomüberstand | IgG _{2b} , Dr. F. Momburg (DKFZ) |
| Human HER2/neu | Trastuzumab / Herceptin | 1:50 | humanisiert | IgG ₁ , Roche |

Sekundärantikörper

| Marker | Klon | Verdünnung | Spezies | Isotyp, Hersteller |
|-----------------------------------|------|------------|-------------------|------------------------------------|
| Maus IgG PE | - | 1:200 | Ziege, polyklonal | BD Biosciences |
| Human IgG PE | - | 1:100 | Ziege, polyklonal | Southern Biotech. Assicoates, Inc. |
| Human IgG Fc PE | - | 1:500 | Ziege, polyklonal | Southern Biotech. Assicoates, Inc. |
| Maus IgG (Fab') ₂ FITC | - | 1:100 | Ziege, polyklonal | Dianova |

B) Antikörper für den Western Blot**Primärantikörper**

| Marker | Klon | Verdünnung | Spezies | Isotyp, Hersteller |
|-------------------------------|-----------|------------|-------------------|--|
| His ₆ | 13/45/31a | 1:1000 | Maus, monoklonal | IgG ₁ , Gerd Moldenhauer (DKFZ) |
| T7 (MASMTGGQMG) | 69522-3 | 1:20000 | Maus, monoklonal | IgG _{2b} , Novagen |
| Human IgG ₁ Fc HRP | - | 1:100000 | Ziege, polyklonal | Southern Biotech. Assicoates, Inc. |

Sekundärantikörper

| Marker | Klon | Verdünnung | Spezies | Isotyp, Hersteller |
|------------------|------|------------|-------------------|--------------------|
| Maus IgG-HRP | - | 1:5000 | Ziege, polyklonal | Pierce |
| Streptavidin-HRP | - | 1:20000 | - | Vector |

4.4 Bakterienkultur**4.4.1 Bakterienstämme****XL1 Blue**

E. coli, K12 *recA1*, *endA1*, *gyrA96*, *thi1*, *hsdR17*, *supE44*, *relA1*, *lac*⁻ F [*proAB*⁺ *lacI*^q *lacI* Δ M15, *Tn10* (*tet*^r)]; Stratagene, Heidelberg

BL21(DE3)pLysS

E. coli, B F *omp T*, *hsd SB* (*r*_B⁻ *m*_B⁻), *gal dcm*(DE3) pLysS (Cam^R); Invitrogen, Eggenstein

| | |
|---------------------------|---|
| BL21Star(DE3)pLysS | <i>E. coli</i> , B ⁻ F ⁻ <i>omp T</i> , <i>hsd SB</i> ($r_B^- m_B^-$), <i>gal dcm rne 131</i> (DE3) pLysS Cam ^R ; Invitrogen, Eggenstein |
| Rosetta2(DE3) | <i>E. coli</i> , B ⁻ F ⁻ <i>omp T</i> , <i>hsd SB</i> ($r_B^- m_B^-$), <i>gal dcm</i> (DE3) pRARE2 (Cam ^R); Novagen, Schwalbach |

4.4.2 Medien für Bakterien

| | | | |
|--|--|------------------------|---|
| LB-Medium (pH 7.0) | 171 mM NaCl 0.5% Hefeextrakt (w/v) 1% Trypton (w/v) 50 µg/ml Ampicillin | LB-Agarplatten | 171 mM NaCl 0.5% Hefeextrakt (w/v) 1% Trypton (w/v) 1.5% Select Agar (w/v) 50 µg/ml Ampicillin |
| SOB-Medium (pH 7.0) | 8.6 mM NaCl 2.5 mM KCl 0.5% Hefeextrakt (w/v) 2% Trypton (w/v) 50 µg/ml Ampicillin 35 µg/ml Chloramphenicol | SOB-Agarplatten | 8.6 mM NaCl 2.5 mM KCl 0.5% Hefeextrakt (w/v) 2% Trypton (w/v) 1.5% Select Agar (w/v) 10 mM MgCl ₂ + MgSO ₄ 50 µg/ml Ampicillin 35 µg/ml Chloramphenicol |
| SOC⁺⁺-Medium (pH 7.0) | 8.6 mM NaCl 2.5 mM KCl 0.5% Hefeextrakt (w/v) 2% Trypton (w/v) 0.5% Glukose (w/v) | | |

Alle Medien wurden mit deionisiertem Wasser angesetzt und nach der pH-Einstellung bei 121 °C für 30 min autoklaviert. Die Magnesiumsalze (siehe SOB-Medium), sowie die Glukose (siehe SOC-Medium) als auch die Antibiotika wurden als sterile Lösungen nach dem Autoklavieren hinzugefügt.

4.5 Eukaryontische Zellkultur

4.5.1 Eukaryontische Zelllinien

| | |
|-------------------------|---|
| D2F2 | Murine Mammakarzinomzelllinie aus BALB/c; Dr. R. Kiessling, Karolinska Institut, Stockholm (Mahoney <i>et al.</i> , 1985) |
| D2F2/E2 | Murine Mammakarzinomzelllinie aus BALB/c, transfiziert mit humanem HER2/neu unter G418 Selektion; Dr. R. Kiessling, Karolinska Institut, Stockholm (Wei <i>et al.</i> , 1999) |
| HEK293T | Humane embryonale Nierenzelllinie; ATCC |
| T2-K^d | Humanes B/T-Zellhybridom, TAP-defizient, stabil transfiziert mit H-2K ^d unter G418 Selektion; Dr. F. Momburg, DKFZ, Heidelberg |
| SF9 | Immortalisierte Insektenzelllinie aus Ovarzellen von <i>Spodoptera frugiperda</i> ; Dr. M. Müller, DKFZ, Heidelberg |

4.5.2 Medien für eukaryontische Zellkultur

A) Grundmedien

| | |
|--------------------|---|
| RPMI 1640 (pH 7.1) | Pulver (Gibco) à 10 l ddH ₂ O 2.83 M NaHCO ₃ |
| D-MEM (pH 7.1) | Pulver (Gibco) à 10 l ddH ₂ O 4.4 M NaHCO ₃ |
| D-PBS (pH 7.2) | Pulver (Gibco) à 10 l ddH ₂ O 0.00025% Phenolrot (w/v) |

B) Zellmedien

| | |
|-------------------|--|
| HEK293T | D-MEM + 10 % FCS, 2 mM Glutamin, 1 % Pyruvat, 50 µM β-Mercaptoethanol |
| D2F2 | D-MEM + 10 % FCS, 2 mM Glutamin, 1 % Pyruvat, 100 U/ml Penicillin/Streptavidin, 50 µM β-Mercaptoethanol |
| D2F2/E2 | D-MEM + 10 % FCS, 2 mM Glutamin, 1 % Pyruvat, 100 U/ml Penicillin/Streptavidin, 50 µM β-Mercaptoethanol, 0.8 mg/ml G418 |
| T2-K ^d | RPMI + 10 % FCS, 2 mM Glutamin, 1 % Pyruvat, 50 µM β-Mercaptoethanol, 0.5 mg/ml G418 |
| SF9 | <u>TMN-FH</u> (Sigma) + 10 % FCS, 2 mM Glutamin, 100 U/ml Penicillin/Streptavidin <u>Grace</u> with L-Glu (Sigma) + 10 % FCS, 100 U/ml Penicillin/Streptavidin, 0.035 % Natriumbicarbonat (w/v) [pH 6.15] |
| BMDC-Medium | RPMI + 10 % FCS, 2 mM Glutamin, 100 U/ml Penicillin/Streptavidin, 50 µM β-Mercaptoethanol, 10 % F1/16-Überstand (zur Verfügung gestellt von Martin Wühl, DKFZ) |

| | |
|----------------------|--|
| Restimulationsmedium | RPMI + 10 % FCS, 2 mM Glutamin, 100 U/ml Penicillin/Streptavidin, 50 µM β-Mercaptoethanol |
| T-Zellmedium | RPMI + 10 % FCS, 2 mM Glutamin, 100 U/ml Penicillin/Streptavidin, 50 µM β-Mercaptoethanol, 10 mM Hepes |

Wie bei den Medien für die Kultivierung von Bakterien, wurden auch hier die Medien mit deionisiertem Wasser angesetzt und nach der pH-Einstellung sterilfiltriert. Geneticin (G418) wurde als Stammlösung in sterilem D-PBS angesetzt, aliquotiert und bei – 20 °C aufbewahrt.

4.6 Mausstämme

| | |
|---------------|--|
| BALB/c | Inzuchtlinie, H-2 ^d , eigene Zucht, DKFZ, Heidelberg |
| HHD II | Transgene Linie, H-2D ^b /β ₂ m Doppelknockout, transgen für HLA-A2.1/D ^b -hβ ₂ m (zur Verfügung gestellt von Dr. F. Lemonier, Institut Pasteur, Paris) |

4.7 Kitsysteme

| | |
|---|--------------------------------------|
| AEC Chromogen Kit | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim |
| BCA TM Protein Assay Reagent Kit | Pierce Perbio Science, USA |
| BD Cytofix/Cytoperm TM Plus (incl. GolgiStop TM) Kit | BD Bioscience, Heidelberg |
| <i>Detoxi-Gel AffinityPak Pre-packed Columns</i> | Pierce Perbio Science, USA |
| Maus IFN _γ ELISPOT <i>Ready Set Go</i> Kit | eBioscience Inc., USA |
| QIAquick <i>Gel Extraction</i> Kit | Qiagen GmbH, Hilden |
| QIAprep ^R Spin Miniprep Kit | Qiagen GmbH, Hilden |
| QIAprep ^R Spin Midiprep Kit | Qiagen GmbH, Hilden |
| QIAprep ^R Spin Maxiprep Kit | Qiagen GmbH, Hilden |
| Super Signal ^R West Dura <i>Extended Duration Substrate</i> | Pierce Perbio Science, USA |

4.8 Materialien und Geräte

4.8.1 Verbrauchsmaterialien

| | |
|--|------------------------------------|
| <i>AffinityPakTM Detoxi-GelTM Endotoxin Removing Gel</i> | Pierce Perbio Science, USA |
| Autoradiographie Stift | Scienceware, Bel-Art Products, USA |
| Bakterienkulturschalen (96 mm) | Greiner, Frickenhausen |
| Chromatographiesäule Econo | Bio-Rad, München |
| Deckgläschen | Eschenbach, Nürnberg |
| Dialysekammern (MWCO: 10000 Da) | Pierce Perbio Science, USA |

| | |
|---|---|
| Einmalspritzen (5, 10, 20, 50 ml) | BD Biosciences, Heidelberg |
| Einmalspritzen mit Spardorn (1 ml) | Braun, Melsungen |
| Elispot 96 Lochplatte (MAHAS4510) | Millipore Corporation, USA |
| FACS Röhrchen (1.3 ml) | Greiner bio-one, Frickenhausen |
| Filtrerröhrchen (5 ml) | BD Biosciences, Heidelberg |
| Glaskapillaren | Marienfeld GmbH & Co. KG, Lauda-Königshofen |
| Kulturröhrchen (5 ml) | BD Falcon, Heidelberg |
| Hamilton Mikroliterspritze | Sigma-Aldrich, München |
| Kanülen (20G, 0.9x40 mm) | BD Biosciences, Heidelberg |
| Kanülen (27G, 0.4x20 mm) | Braun, Melsungen |
| Küvetten | Greiner bio-one, Frickenhausen |
| Kulturplatte, unbeschichtet (6 Loch) | BD Falcon, Heidelberg |
| Leucosep Filtrerröhrchen (50 ml) | Greiner, Frickenhausen |
| <i>Limolus Amebocyte Lysate</i> (LAL) Test Kartuschen | Charles River Laboratories, Frankreich |
| MACS Separationssäulen LS | Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach |
| Neubauer Zählkammer | Marienfeld GmbH & Co. KG, Lauda-Königshofen |
| Nitrozellulose Blotting Membran (Immobilon-P) | Millipore Corporation, USA |
| Objektträger | Langenbrinck, Emmendingen |
| PP-Teströhrchen (50/15 ml) | TPP, Trasadingen, Schweiz |
| Schraubdeckelröhrchen Cryo (2 ml) | Nalgene, USA |
| Spritzenvorsätze MILLEX-HA (0.22, 0.45 µm) | Millipore Corporation, USA |
| Steritop Flaschenfilter (0.22 µm) | Millipore Corporation, USA |
| Wägebapier MN 226 | Machery-Nagel, Düren |
| Whatman Papier | Schleicher & Schuell, Dassel |
| Zellfilter (40 µm) | BD Biosciences, Heidelberg |
| Zellschaber | TPP, Trasadingen, Schweiz |
| Zellkulturschalen (10 cm, 14 cm) | TPP, Trasadingen, Schweiz |
| Zellkulturplatten (6-/24-/48-/96-Loch) | TPP, Trasadingen, Schweiz |
| Zellkulturflaschen (25, 75, 150 cm ²) | TPP, Trasadingen, Schweiz |

4.8.2 Geräte

| | |
|-------------------------------------|--------------------------------------|
| AutoMACS | Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach |
| Biofuge fresco | Kendro, Langenselbold |
| Brutschrank Hera Cell 240 | Kendro, Langenselbold |
| Brutschrank zur Insektenkultur | Heraeus Instruments, Osterode |
| Cytospin 2 | Shandon, |
| Dampfsterilisator Varioclav Typ 25T | H+P Labortechnik AG, Oberschleißheim |
| Eismaschine Wessamat | Zugck, Leimen |

| | |
|--|--|
| Elektrophorese-Kammer Miniprotean 3 Cell | Bio-Rad, München |
| Elektrophorese-Kammer Protean II xi Cell | Bio-Rad, München |
| Elektrophorese-Kammer B1A, B2 | OWI Separation Systems, Niederlande |
| Endosafe-PTS | Charles River Laboratories, Frankreich |
| FACScan / FACSCalibur | BD Biosciences, Heidelberg |
| Feinwaage AE163 | Mettler, Gießen |
| Kühlzentrifuge Biofuge fresco | Kendro, Langenselbold |
| Kühl- und Gefrierschränke | Liebherr (Ochsenhausen) |
| Lumi-Imager | Roche Boehringer Diagnostics, Mannheim |
| Magnetrührer MR 3002, MR 2000 | Heidolph, Schwabach |
| Mikroskop Axiovert 40 C | Carl Zeiss, Jena |
| Mikroskop Axioplan 2 imaging | Carl Zeiss, Jena |
| PCR-Block Peltier Thermal Cycler PTC-200 | MJ Research Inc., USA |
| pH Meter 766 Calimatic | Knick, Berlin |
| Photometer GENESYS 10uv | Thermo Fisher Scientific, Dreieich |
| Schüttelinkubator Certomat HK | Satorius BBI Systems, Göttingen |
| Schüttler GFL 3015 | Omnilab, Schweiz |
| Semi-dry Blotter SD 1 | cti (Idstein) |
| Spannunggeräte Consort E835 | OWI Separation Systems, Niederlande |
| Sterilbank HeraSafe | Kendro, Langenselbold |
| Rollenmischgerät RM 5-40 | CAT Ingenieurbüro, Staufen |
| Thermomixer comfort | Eppendorf, Hamburg |
| Tischzentrifuge Centrifuge 5415 D | Eppendorf, Hamburg |
| Ultraschallgerät Sonofier 250 | Branson, USA |
| UV Flächenstrahler | Konrad Benda, Wiesloch |
| Victor 1420 Multilabel Counter | PerkinElmer Optoelectronics, USA |
| Vortexer Vortex-Genie 2 | Scientific Industries Inc., USA |
| Waage HF-3000G | A&D Company, Japan |
| Wasserbad HAAKE SWB25 | Thermo Fisher Scientific, Dreieich |
| Zentrifuge Avanti J-25, Rotor JLA-10.500 | Beckman Coulter, Krefeld |
| Zentrifuge Minifuge 2, Rotor 2705, 3470 | Kendro, Langenselbold |
| Zentrifuge Omnifuge 2.0 RS, Rotor 2250 | Kendro, Langenselbold |

4.9 Chemikalienliste

| | |
|---------------------------------|---------------------------------|
| Aceton | Fluka, Buchs (Schweiz) |
| Acrylamid (RotiphoreseR Gel 30) | Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe |
| Agar-Agar/Kobe I pulv. | Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe |

| | |
|---|--|
| Agarose Ultra Pure | BRL Bethesda Research Laboratories, USA |
| 6-Amino-capronsäure | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim |
| Aminoethylcarbazol (AEC) | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim |
| Ammoniumchlorid (NH ₄ Cl) | Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe |
| Ammoniumperoxodisulfat (APS) | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim |
| Ampicillin Natriumsalz (Amp) | Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe |
| β-Mercaptoethanol | Merck, Darmstadt |
| Biocoll | Biochrom, Berlin |
| Biotin | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim |
| 5-Brom-4-chlor-3-indoxyl-β-D-galactopyranosid (X-Gal) | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim |
| Bromphenolblau | Serva, Heidelberg |
| Calciumchlorid (CaCl ₂ ·2H ₂ O) | Merck, Darmstadt |
| Carboxyfluorescein-diacetat-succinimidyl-ester (CFSE) | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim |
| Chloramphenicol | Serva, Heidelberg |
| Concanavalin A (ConA) | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim |
| Coomassie Brilliant Blue R | Gerbu, Gaiberg |
| Desoxyribonukleotidtriphosphat (dNTP) | Bioron, Ludwigshafen |
| DiamondBac Baculovirus DNA | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim |
| Dimethylsulfoxid (DMSO) | Merck, Darmstadt |
| Dimethylformamid (DMF) | Merck, Darmstadt |
| Dinatriumhydrogenphosphat (Na ₂ HPO ₄) | Neolab, Heidelberg |
| D-MEM | Gibco BRLR Life Technol. GmbH, Karlsruhe |
| D-PBS | Gibco BRLR Life Technol. GmbH, Karlsruhe |
| Endotoxin-freies H ₂ O | Charles River Laboratories, Frankreich |
| Ethanol | Fluka, Buchs (Schweiz) |
| Ethidiumbromid | Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe |
| Ethylendiamintetraacetat (EDTA) | Gerbu, Gaiberg |
| Fötales Kälberserum (FCS) | Biochrom, Berlin |
| Geneticin (G418) | Invitrogen, Karlsruhe |
| Gelatine | Merck, Darmstadt |
| Glukose | Merck, Darmstadt |
| Glutamin (100x) | Gibco BRLR Life Technol. GmbH, Karlsruhe |
| Glyzerin | Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe |
| Glycin | Gerbu, Gaiberg |
| Grace-Medium [mit L-Glu, ohne Bicarbonat] | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim |
| Harnstoff | Fluka, Buchs (Schweiz) |
| Hefeextrakt | Gerbu, Gaiberg |
| Hepes | Gerbu, Gaiberg |
| Imidazol | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim |

| | |
|--|--|
| Isopropanol | Fluka, Buchs (Schweiz) |
| Isopropyl- β -D-thiogalactosid (IPTG) | Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe |
| Kaliumchlorid (KCl) | Merck, Darmstadt |
| Kaliumdihydrogenphosphat (KH_2PO_4) | Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe |
| Kaliumhydrogencarbonat (KHCO_3) | Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe |
| Lysozym | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim |
| Magnesiumchlorid-Hexahydrat ($\text{MgCl}_2 + 2\text{xH}_2\text{O}$) | e.a.thomas chemikalien, Heidelberg |
| Magnesiumsulfat-Heptahydrat ($\text{MgCl}_2 + 7\text{xH}_2\text{O}$) | Merck, Darmstadt |
| Methanol | Fluka, Buchs (Schweiz) |
| Milchpulver, fettfrei | Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe |
| Natriumazid (NaN_3) | AppliChem, Darmstadt |
| Natriumacetat (NaAc) | Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe |
| Natriumcarbonat (Na_2CO_3) | Merck, Darmstadt |
| Natrium-Deoxycholat | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim |
| Natriumdihydrogenphosphat (NaH_2PO_4) | Neolab, Heidelberg |
| Natriumchlorid (NaCl) | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim |
| Natriumhydroxid (NaOH) | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim |
| Natronlauge | VWR, Darmstadt |
| Ni-NTA-Agarose | Qiagen GmbH, Hilden |
| PBS, LPS frei (pH 7.2) | Gibco BRLR Life Technol. GmbH, Karlsruhe |
| Penicillin/Streptavidin (100x) | Gibco BRLR Life Technol. GmbH, Karlsruhe |
| Phenolrot | Biochrom AG, Berlin |
| Ponceau-S-Rot | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim |
| <i>Precision Plus Protein Standard</i> | Bio-Rad, München |
| Propidiumiodid | Fluka, Buchs (Schweiz) |
| Proteaseinhibitor Cocktail | Roche Diagnostics, Mannheim |
| Proteinase K | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim |
| Protein-A-Sepharose | Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg |
| Pyruvat | Invitrogen, Karlsruhe |
| Rinderserumalbumin (BSA) | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim |
| RPMI 1640 | Gibco BRLR Life Technol. GmbH, Karlsruhe |
| Salzsäure (HCl) | VWR, Darmstadt |
| Sodiumdodecylsulfat (SDS) | Gerbu, Gaiberg |
| Streptavidin-Agarose | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim |
| TEMED | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim |
| TMN-FH Medium | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim |
| Tris/Trizma Base | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim |
| Trypanblau-Lösung | Fluka, Buchs, Schweiz |
| Trypsin | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim |

| | |
|---|--------------------------------------|
| Trypton | AppliChem, Darmstadt |
| Triton X-114 | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim |
| Tween20 | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim |
| Venimmun | Sanofi-Aventis, Frankfurt |
| Wasserstoffperoxid (H ₂ O ₂) | AppliChem, Darmstadt |
| X-Vivo20 | Cambrex, Belgien |
| Xylencyanol | Serva, Heidelberg |
| Zitronensäure | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim |

5 Methoden

5.1 Molekularbiologische Methoden

5.1.1 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion zählt zu den wichtigsten Methoden der Molekularbiologie. Durch dieses Verfahren können kleinste Mengen spezifischer DNA-Sequenzen nachgewiesen bzw. amplifiziert werden. Das Prinzip der PCR ist die enzymatische Vermehrung eines DNA-Abschnittes zwischen zwei Oligonukleotidprimern, die gegenläufig an komplementäre DNA-Stränge gebunden sind (Knippers, 1997). Mittels PCR konnte die cDNA der Hitzeschockproteine oder des SBP-Tags amplifiziert sowie zusätzliche Restriktionsschnittstellen eingefügt werden, die in der Klonierungsstrategie vorgesehen waren. Die PCR wurde jeweils in einem Gesamtvolumen von 50 µl in 1/10 Vol. *Expand High Fidelity* Puffer (mit 15 mM MgCl₂), 2.6 U *Expand High Fidelity* Polymerase und 0.1 mM dNTP (Bioron) durchgeführt. Von den *forward* und *reverse* Primern wurden je 300 nM eingesetzt. Die Menge an DNA *template* variierte zwischen 0.2 und 0.5 µg. Die PCR Reaktion startete mit der Denaturierung der DNA bei 94 °C zunächst für 3 min, dann für 30 sec. Das *Annealing* wurde bei 55 °C für 35 sec und die Amplifikation bei 72 °C für 45 sec durchgeführt. Dieser Zyklus wiederholte sich 10 Male, wobei die *Annealing* Temperatur sich pro Zyklus jeweils um 1 °C reduzierte. Anschließend folgten 20 Zyklen mit einer Denaturierung bei 94 °C für 30 sec, einem *Annealing* bei 45 °C für 35 sec und einer Amplifikation bei 72 °C für 45 sec. Die Endelongation erfolgte bei 72 °C für 6 min.

Für die Genotypisierung der HHD Mäuse wurde folgende PCR durchgeführt: 5 µl der 1:10 in ddH₂O verdünnten DNA aus Schwanzbiopsien wurden mit 5 U Taq-Polymerase (NEB), 1/10 Vol. Taq-Polymerase Puffer (NEB), 0.7 mM dNTP (Bioron) und jeweils 1.3 pM der *sense* und *antisense* Primer angesetzt. Die Denaturierung der DNA wurde bei 94 °C zunächst für 5 min, dann für 1 min durchgeführt. Das *Annealing* fand bei 59 °C für 30 sec und die Amplifikation bei 72 °C für 1 min statt. Nach 35 dieser Zyklen folgte die Endelongation für 5 min bei 72 °C.

5.1.2 Restriktionsverdau

A) Präparativer Verdau der Plasmid- bzw. PCR-DNA

Für den präparativen Verdau wurde 250-2000 ng DNA eingesetzt, welche mit je 7.5-30 U Enzym für 90-180 min bei 37 °C verdaut wurden. Jeder Ansatz beinhaltete wie auch im Folgenden jeweils 1/10 Vol. der zugehörigen Enzympuffer. Die Restriktionsenzyme, sowie die Puffer wurden von MBI Fermentas bezogen.

B) Analytischer Verdau nach einer Ligation

Für den analytischen Verdau wurde 50-100 ng DNA eingesetzt, welche mit 2.5-10 U Enzym verdaut wurde. Die Inkubation erfolgte bei 37 °C für 60-90 min.

C) Sequentieller Verdau der DNA

Einige Restriktionsenzyme, deren optimale Temperatur- und Pufferbedingungen nicht identisch waren, konnten nicht parallel eingesetzt werden. Hier wurde stattdessen ein sequentieller Verdau durchgeführt. Wiederum erfolgte die Inkubation bei 37 °C für 90 min.

D) fill in Reaktion

Für eine Ligation zwischen zwei unterschiedlich verdauten DNA Schnittstellen mussten jeweils die DNA-Enden aufgefüllt werden. Um DNA-Doppelstränge mit glatten Enden (*blunt end*) zu erzeugen, wurde die verdaute DNA mit 5 U T4-DNA Polymerase (NEB), 100 µM dNTP (Bioron), 1x T4-DNA Polymerase Puffer zunächst für 20 min bei 11 °C und danach für weitere 10 min bei 75 °C inkubiert, um die DNA Polymerase zu inaktivieren.

5.1.3 Agarosegelelektrophorese

| | |
|---------------------|--|
| 6x DNA-Probenpuffer | 0,1 % (w/v) Bromphenolblau 0,1 % (w/v) Xylencyanol 15 % (v/v) Glycerin |
|---------------------|--|

| | |
|----------------------------|--|
| Laufpuffer (1xTAE), pH 8.5 | 40 mM Tris/HCl, pH 7.4 5 mM NaAc 1 mM EDTA |
|----------------------------|--|

Zur Größenbestimmung der DNA-Fragmente wurden die PCR Produkte sowie die Restriktionsverdaus im Agarosegel untersucht (1-2 %, je nach erwarteter Fragmentgröße). Dazu wurde die DNA mit 1/6 Vol. 6x DNA-Probenpuffer versetzt und zum Größenvergleich 5 µl des DNA-Markers Lambda/EcoRI+HindIII (MBI Fermentas) bzw. 10 µl des Markers *GeneRuler DNA Ladder Mix* (MBI Fermentas) geladen. Die DNA wurde bei 0.8 V pro cm Lauflänge aufgetrennt. Das Agarosegel wurde anschließend für 10 min in einem Ethidiumbromid-Bad (2.5 µg/ml in TAE-Puffer) gefärbt und wiederum für 10 min in ddH₂O entfärbt.

5.1.4 Isolierung und Reinigung von DNA-Fragmenten

Nach den präparativen Verdaus wurde die gewünschte DNA-Bande aus dem Gel herausgeschnitten und mittels *QIAquick Gel Extraction Kit* (Qiagen) gereinigt. DNA-Fragmente, die nach einer PCR erhalten und mit den entsprechenden Restriktionsenzymen verdaut wurden, konnten ebenfalls mit dem *QIAquick Gel Extraction Kit* (Qiagen) gereinigt werden.

5.1.5 DNA-Ligation

Die Vektoren, in die die DNA-Fragmente kloniert werden sollten, wurden nach dem Restriktionsverdau am 5'-Ende dephosphoryliert. Dazu wurden sie mit jeweils 0.5 µg CIAP (MBI Fermentas) pro

µg Vektor inkubiert. Bei 5'-Überhängen erfolgte die Inkubation bei 37 °C für 30 min, bei glatten und 3'-Überhängen für 15 min bei 37 °C und anschließend für 15 min bei 56 °C.

Um für die Ligation ein optimales Verhältnis von Vektor zu Insert zu erhalten, wurden die Mengen der verwendeten Insert- und Vektorfragmente mit folgender Formel abgeschätzt:

$$\frac{\text{Vektor [ng]} \times \text{Länge des Inserts [kb]}}{\text{Länge des Vektors [kb]}} \times 3 = \text{Insert [ng]}$$

Die Ligationsansätze von insgesamt 20 µl (add ddH₂O) enthielten je 10 U T4-Ligase (MBI Fermentas) und 1/10 Vol. 10x T4-Puffer. Kontrollansätze wurden identisch angesetzt, allerdings ohne das Insert. Die Ligation erfolgte bei 16 °C für 4 h bzw. über Nacht.

5.1.6 DNA-Fällung, Konzentrationsbestimmung und Sequenzierung

A) Fällung der DNA

Die nach der Ligation erhaltenen DNA Produkte wurden mit 1/10 Vol. 3 M NaAc, pH 5,2 und 2,5 Vol. 100% EtOH gefällt. Dazu wurden die Proben über Nacht bei -20 °C inkubiert, anschließend bei 16000 x g in einer Tischzentrifuge (Kendro) bei 4 °C für 20 min zentrifugiert und dann zweimal mit je 1 ml 70% EtOH gewaschen (5min, 16000 x g, Kendro). Das DNA-Pellet wurde bei RT getrocknet und in 10-50 µl ddH₂O resuspendiert. Um sterile DNA zu gewinnen, wurde die DNA nach einem 20 minütigen Zentrifugationsschritt mit sterilem 70 % EtOH gewaschen und anschließend in steriles ddH₂O aufgenommen.

B) DNA-Konzentrationsbestimmung

Am UV-Spektrometer (Thermo Fisher Scientific) konnte die DNA-Konzentration bestimmt werden (A₂₆₀ nm). Dabei entspricht 1 OD₂₆₀ 50 µg/ml dsDNA, 40 µg/ml ssDNA, bzw. 33 µg/ml ssOligonukleotiden. Zur Messung wurde die DNA 1:200 in H₂O verdünnt. Neben der DNA-Konzentration wurde auch die Reinheit (A₂₆₀/A₂₈₀ nm) ermittelt. Der Quotient einer sauberen DNA Präparation sollte bei ~ 1.8 liegen.

C) DNA-Sequenzierung

Zur Überprüfung der DNA-Sequenzen wurden die nach der Ligation erhaltenen DNA Produkte gefällt wie in **5.1.6 A** beschrieben und gelöst in 10 µl ddH₂O bei MWG-BIOTECH (Ebersberg) sequenziert.

5.1.7 Herstellung von chemokompetenten Bakterien

Die Bakterien wurden entweder aus einer Übernachtskultur oder aus dem Glyzerinstock auf eine LB/Amp-Platte ausgestrichen und diese bei 37 °C über Nacht inkubiert. Für die Herstellung von chemokompetenten Rosetta2(DE3), BL21(DE3)pLysS und BL21Star(DE3)pLysS wurden LB-Platten mit zusätzlicher Chloramphenicolresistenz verwendet. Am Folgetag wurde eine einzelne Kolonie gepickt

bei 37 °C inkubiert wurde. Die Bakterienernte erfolgte bei 4 °C und 6000 x g für 15 min (Avanti J-25, Beckman; Rotor JLA-10.500). Zur Plasmidisolierung wurde das *QIAprep[®] Spin Maxiprep* Kit von Qiagen verwendet. Dazu wurde das Bakterienpellet in 10 ml Puffer P1 resuspendiert, nach Zugabe von 10 ml Puffer P2 durch Invertieren gemischt und anschließend für 5 min auf Eis inkubiert. Weitere 10 ml Puffer P3 wurden hinzugefügt, das Reaktionsgefäß durch Invertieren gemischt und nach einer 20-minütigen Inkubation auf Eis für 30 min unter obigen Bedingungen zentrifugiert. Die Säule wurde vor dem Probenauftrag mit 10 ml QBT-Puffer equilibriert. Nachdem das Lysat über die Säule gelaufen war, wurde zweimal mit jeweils 30 ml QC-Puffer gewaschen. Die Elution erfolgte mit 10 ml QF-Puffer in ein frisches Reaktionsgefäß. Durch Zugabe von 10.5 ml Isopropanol wurde die eluierte DNA gefällt und konnte durch eine Zentrifugation für 1 h unter obigen Bedingungen pelletiert werden. Die gefällte DNA wurde mit 5 ml 70 % EtOH gewaschen, wiederum zentrifugiert und dann bei RT getrocknet. Anschließend wurde die DNA in 400 µl TE-Puffer aufgenommen und gelöst.

5.2 Proteinbiochemische Methoden

5.2.1 Lagerung und Kultivierung von *E. coli* zur Proteinexpression

XL1 Blue, die zur Klonierung dienen, wurden stets in LB-Medium kultiviert. Für Rosetta und BL21 wurde für die Vorkultur SOB-Medium, ansonsten ebenfalls LB-Medium gewählt. Zur Aufbewahrung wurden die transformierten Bakterien mit 15 % Glycerin gemischt, in flüssigem Stickstoff eingefroren und dann bei -70 °C gelagert.

5.2.2 Transformation von *E. coli*

Für die Expression der rekombinanten Proteine in *E. coli* wurden die Bakterienstämme Rosetta2(DE3), BL21(DE3)pLysS und BL21Star(DE3)pLysS verwendet. Zur Transformation wurden 100 µl der chemokompetenten Bakterien auf Eis aufgetaut und mit 0.1-1 µg Plasmid-DNA (in 3 µl) zunächst für 30 min auf Eis, dann für 45 sec bei 42 °C inkubiert. Bevor 1 ml Soc⁺⁺-Medium hinzugefügt wurde, wurden die Bakterien auf Eis nach dem Hitzeschock abgekühlt. Anschließend schüttelten die Zellen bei 400 rpm, 37 °C (Thermomixer, Eppendorf) im Reaktionsröhrchen für 45 min. Von diesem Ansatz wurden 50 µl auf eine SOB/Amp/Cam-Platte ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

5.2.3 Expression der Hitzeschockfusionsproteine in *E. coli*

Für die Testexpression wurde ein Klon zunächst in 2 ml SOB/Amp/Cam über Nacht bei 37 °C inkubiert und dann in 25 ml SOB/Amp/Cam überführt, so dass die optische Dichte (OD₆₀₀) auf einen Wert von 0.1 eingestellt wurde. Nachdem die OD₆₀₀ auf 0.6 gestiegen war, wurde die Genexpression mit 1 mM

IPTG induziert und für Expressionsuntersuchungen stündlich eine 1 ml Probe abgenommen. Die Bakterien wurden für 2 min bei 16000 x g (Eppendorf) geerntet und bei -20 °C aufbewahrt.

Für die Produktion der Fusionsproteine im 400 ml Maßstab wurde zunächst eine 25 ml Vorkultur (SOB/Amp/Cam) über Nacht bei 37 °C geschüttelt (Sartorius, 300 rpm), welche am Folgetag mit 400 ml LB/Amp/Cam auf eine OD₆₀₀ von 0.1 verdünnt wurde. Sobald eine OD₆₀₀ von 0.6 erreicht wurde, erfolgte die Induktion der Genexpression mit 1 mM IPTG für 4 h bei 37°C. Die Bakterien konnten geerntet werden, indem die Kultur für 20 min bei 6000 x g und 4 °C abzentrifugiert wurde (Avanti J-25, Beckman; Rotor JLA-10.500). Nach der Bestimmung des Feuchtgewichts, wurden die Zellen bis zur Lyse und Aufreinigung bei -20 °C aufbewahrt.

5.2.4 Lyse der Bakterien

| | |
|------------|--|
| Lysepuffer | 0.1 % Tween20 300 µg/ml Lysozym in PBS, pH 8.0 |
|------------|--|

Die gewonnenen Bakterien der 400 ml Kultur wurden zunächst in 25 ml Lysepuffer resuspendiert und für 1.5 h bei RT unter leichtem Drehen inkubiert (RM 5-40, CAT). Anschließend wurde dem Lysat Harnstoff und Kochsalz zu gesetzt, um eine Endkonzentration von 8 M Harnstoff bzw. 150 mM NaCl zu erhalten. Das Gemisch wurde weitere 30 min bei RT unter Drehen inkubiert, bis sich das Salz und der Harnstoff gelöst hatten. Anschließend wurden die Zellen per Ultraschall aufgeschlossen (6 x 30 sec, Sonofier 250, Branson; *Output Control 4, Duty Cycle 50 %*). Anschließend wurde das Lysat bei 4 °C für 30 min bei 11000 x g zentrifugiert (Avanti J-25, Beckman; Rotor JLA-10.500). Der Überstand wurde dekantiert und bis zur Aufreinigung bei -20 °C aufbewahrt. Die obigen Schritte wurden solange wiederholt, bis eine vollständige Lyse der Bakterienpellets erreicht werden konnte.

Für den Zellaufschluß der Bakterienpellets für die Testexpression wurde eine mechanische Zellyse per Hitzeschock angewandt. Dazu wurden die Bakterien in 20 mM Phosphatpuffer pH 7.7 resuspendiert und durch Wechselbäder in flüssigem Stickstoff bzw. 42 °C warmem Wasser aufgeschlossen. Anschließend wurde das Lysat durch Zentrifugation für 4 min bei 4 °C und 16000 x g (Eppendorf) abgetrennt und bis zur Analyse bei -20 °C aufbewahrt.

5.2.5 Aufreinigung der Proteine über Affinitätschromatographie

A) Nickelaffinitätschromatographie

| | |
|------------------------|---|
| Waschpuffer 1 (pH 8.0) | 100 mM NaH ₂ PO ₄ 10 mM Tris 8 M Harnstoff 150 mM NaCl 1 % Triton X-114 |
|------------------------|---|

| | |
|------------------------|---|
| Waschpuffer 2 (pH 6.3) | 100 mM NaH ₂ PO ₄ 10 mM Tris |
|------------------------|---|

| | |
|-------------------------|---|
| | 8 M Harnstoff |
| | 150 mM NaCl |
| | 40 mM Imidazol |
| | 1 % Triton X-114 |
| Waschpuffer 3 (pH 7.8) | 25 mM Tris |
| | 150 mM NaCl |
| | 0.4 % Triton X-114 |
| | 0.4 % Tween20 |
| Elutionspuffer (pH 8.0) | 200 mM Imidazol |
| | 2.5 mg/ml Proteaseinhibitor-Cocktail in Endotoxin-freiem PBS |

Die Aufreinigung der Hsp-HER2/neu-Fusionsproteine erfolgte per Nickelaffinitätschromatographie unter denaturierenden Bedingungen. Dazu wurde eine Chromatographiesäule (Bio-Rad) mit 3 ml 50 % Ni-NTA-Agarose (Qiagen) bestückt und mit 12 ml des Waschpuffer 1 (dies entspricht dem 4fachen Säulenvolumen) equilibriert. Das Lysat wurde zweimal über die Säule geführt und der Durchlauf aufgefangen. Gewaschen wurde jeweils mit einem vierfachen Säulenvolumen: zweimal mit Waschpuffer 1, dann dreimal mit Waschpuffer 2. Zur Endotoxinanreicherung wurden die an die Säule gebundenen Proteine mit einem Liter Waschpuffer 3 gewaschen, ehe sie durch die Zugabe von 300 ml Endotoxin-freiem PBS, pH 7.2 renaturiert wurden. Die Elution mit Elutionspuffer erfolgte in 10 Fraktionen zu je 0.5 ml. Die eluierten Proteine wurden bei 4 °C aufbewahrt.

B) Protein-A-Sepharose Affinitätschromatographie

Die Zellkulturüberstände wurden an verschiedenen Tagen gesammelt und bis zur Aufreinigung bei -20 °C aufbewahrt. Die Proteinaufreinigung erfolgte bei 4 °C bzw. auf Eis. Dazu wurde eine Chromatographiesäule (Bio-Rad) mit 500 µl 50 % Protein-A-Sepharose bestückt, welche zuvor mit D-PBS gewaschen und dann für 30 min in 10 ml D-PBS/10 % FCS inkubiert wurde, um unspezifische Bindungsstellen abzusättigen. Die Matrix wurde anschließend in die Säule überführt, mit 50 ml D-PBS equilibriert, ehe der aufgetaute Zellüberstand mittels Gravitation über die Säule geführt wurde. Um ein Verstopfen der Säule zu vermeiden, musste der Zellüberstand zuvor noch filtriert werden (0.22 µm, Steritop). Anschließend wurde die Säule mit 50 ml D-PBS gewaschen. Zur Proteinelution mit 50 mM Zitronensäure pH 2.9 wurden 15 Fraktionen zu je 450 µl gesammelt. Zur Neutralisation war in die Reaktionsgefäße zu Beginn je 50 µl 1 M Tris/HCl pH 8.0 vorgelegt worden. Die Fraktionen wurden bis zur Analyse im SDS Gel bei 4 °C aufbewahrt. Um das Säulenmaterial erneut verwenden zu können, wurde es in 50 % TBS 0.1 % NaN₃ bei 4 °C gelagert. Vor einer neuen Aufreinigung wurde die Matrix für 2 min in 50 mM Zitronensäure pH 2.9 inkubiert, damit alle gebundenen Proteine abgewaschen werden konnten. Anschließend konnte das Säulenmaterial wie oben beschrieben eingesetzt werden.

C) Gelfiltration

| | |
|--------------|-------------|
| SBB (pH 8.0) | 150 mM NaCl |
| | 10 mM Tris |

Zur Aufreinigung der Proteine entsprechend ihrer Größe mittels Gelfiltration wurden die Proben zunächst für 10 min bei 4 °C und 16000 x g (Kendro) abzentrifugiert. Die HPLC-Apparatur und die Säule (HiLoad 16/60, Superdex 200, *prep grade*) wurden von Jürgen Kretschmer (DKFZ) zur Verfügung gestellt. Zunächst wurden alle Zuläufe und Pumpen der HPLC mit 0.45 µm gefiltertem SBB-Puffer gespült und die Säule mit dem 5fachen Säulenvolumen (600 ml) über Nacht equilibriert. Dabei betrug die Flussrate 0.5 ml/min bei einem maximalen Druck von 3 bar. Der Probenauftrag erfolgte durch Injektion mit einer Spritze. Bei einer Flussrate von 1 ml/min wurden Fraktionen von je 2 ml gesammelt, die später im SDS-Gel untersucht wurden.

D) Streptavidin-Agarose

| | |
|----------------|--|
| LSSBB (pH 8.0) | 150 mM NaCl 10 mM Tris 2 mM Biotin |
|----------------|--|

| | |
|----------------|---------------------------------------|
| HSSBB (pH 8.0) | 1 M NaCl 10 mM Tris 2 mM Biotin |
|----------------|---------------------------------------|

Für die Aufreinigung der Proteine mittels Streptavidin-Agarose im Batchverfahren wurden die nach der Nickelaffinitätschromatographie erhaltenen Eluate mit 100 µl des zuvor gewaschen Materials für 30 min bei 4 °C inkubiert. Die Streptavidin-Agarose wurde dreimal mit je 1 ml SBB-Puffer gewaschen und für 5 min bei 16000 x g abzentrifugiert. Die Elution der Proteine erfolgte mit 100 µl LSSBB-Puffer bzw. 100 µl HSSBB-Puffer.

E) Methoden zur Endotoxinanreicherung

Neben der in **5.2.5 A** beschriebenen Methode, Endotoxin direkt auf der Chromatographiesäule abzureichern, wurden noch zwei weitere Methoden eingesetzt.

Mittels einer Polymixin-B-Säule (*Detoxi-Gel AffinityPak Pre-packed Columns*, Pierce) sollte das eluierte, dialysierte Protein LPS angereichert werden. Dazu wurde die Säule zunächst regeneriert, indem sie fünfmal mit je 1 ml 1% Natrium-Deoxycholat gewaschen wurde. Anschließend folgten 3 Waschschriffe mit je 1 ml Endotoxin freiem H₂O (Charles River Laboratories). Nach der Equilibrierung der Säule mit pyrogenfreiem PBS (Gibco) wurde das Protein geladen, für ca. 1 h auf der Säule inkubiert, ehe es wiederum mit LPS freiem PBS eluiert wurde. Für eine optimale Endotoxinanreicherung wurde der beschriebene Vorgang insgesamt 5 Mal durchgeführt.

Als zweite Methode zur LPS-Anreicherung wurde Triton X-114 eingesetzt. Dazu wurde das dialysierte Protein mit 1 % Triton X-114 versetzt. Beides wurde gründlich miteinander vermischt und anschließend für 5 min auf Eis inkubiert. Dann wurde erneut gemischt und für 5 min bei 37 °C inkubiert. Nun entstand eine trübe Lösung, welche für 1 min bei 37 °C und 16000 x g zentrifugiert wurde (Biofuge fresco, Kendro). Hierbei entstand eine Phasentrennung, wobei die obere wässrige Phase, welche das Protein enthielt, abgenommen wurde. In der unteren organischen Phase befand sich das Triton X-114 und gebundenes LPS. Das abgetrennte Protein wurde erneut mit Triton X-114 versetzt und der Vorgang wurde wie beschrieben wiederholt.

5.2.6 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

| | |
|---------------------|---|
| 6x SDS-Probenpuffer | 62.5 mM Tris, pH 6.8 20 % Glycerin 2 % SDS (w/v) 714 mM β -Mercaptoethanol 0.025 % Bromphenolblau (w/v) |
| Laufpuffer SDS-PAGE | 25 mM Tris, pH 8.3 192 mM Glycin 0.1 % SDS (w/v) |
| Trenngel (12%) | 12 % (v/v) Rotiphorese 0.375 M Tris, pH 8.8 1 % SDS (w/v) 0.9 % APS (w/v) 0.1 % TEMED (v/v) |
| Trenngel (10 %) | 10 % (v/v) Rotiphorese 0.375 M Tris, pH 8.8 1 % SDS (w/v) 1 % APS (w/v) 0.04 % TEMED (v/v) |
| Sammelgel (5 %) | 5 % (v/v) Rotiphorese 125 mM Tris, pH 6.8 0.1 % SDS (w/v) 0.1 % APS (w/v) 0.01 % TEMED (v/v) |

Zur Proteinauftrennung nach Laemmli (1970) wurde entweder ein Standardgel (16 x 16 cm Trenngelgröße) mit 10%-igem Trenn- und 5%-igem Sammelgel, oder ein Minigel (8.6 x 6.8 cm) mit 12%-igem Trenn- und 5%-igem Sammelgel gewählt. Das Trenngel wurde zwischen die Glasplatten in der jeweiligen Trennvorrichtung (Miniprotean 3 Cell für Minigele, Protean II xi Cell für Standardgele, Bio-Rad) gegossen und mit Isopropanol überschichtet. Nachdem auch das Sammelgel ausgehärtet war, wurden die Proben geladen. Von den einzelnen Elutionsfraktionen, sowie vom Lysatüberstand und dem Probendurchlauf wurden jeweils 20 μ l für 5 min bei 96 °C in 6x SDS-Probenpuffer aufgeköcht. Für den Größenvergleich der Proteinbanden wurde 5 μ l Marker (*Precision Plus Protein Standard*, Bio-Rad) aufgetragen. Die Proteinauftrennung in den Standardgelen erfolgte bei 180 mA und 90 V für 16 h, die Minigele wurden bei 150 V für 1-1.5 h aufgetrennt.

5.2.7 Detektion der eluierten Proteine

A) Detektion der Proteine mittels Coomassie-Färbung

| | |
|-----------------------|---|
| Coomassie-Färbelösung | 40 % Methanol (v/v) 12 % Essigsäure (v/v) 0.16 % Coomassie Brilliant Blue R (w/v) |
| Entfärbelösung | 40 % Methanol (v/v) 12 % Essigsäure (v/v) |

C) Aufbewahrung der Proteine

Nach der Konzentrations- und Endotoxingehaltsbestimmung der Proteine, wurden die Reaktionsgefäße beschriftet und bei 4 °C aufbewahrt. Die Proben wurden stets steril behandelt, d. h. nur unter der Zellkulturbank geöffnet.

5.3 Zellbiologische Methoden

5.3.1 Kultivierung von eukaryontischen Zellen

Trypsin/EDTA 0.05 % Trypsin
 0.65 mM EDTA
 (in PBS)

Trypanblau-Färbelösung 25 % Trypanblau-Lösung (in PBS)

Alle Zelllinien, die im Folgenden beschrieben sind, wurden bei 37 °C, 5 % CO₂ und gesättigtem Wasserdampf kultiviert (Hera Cell 240, Kendro). Die Insektenzellen SF9 dagegen wurden bei 28 °C kultiviert. Die entsprechenden Medien für die einzelnen Zelllinien sind **4.5.2 B** zu entnehmen. Die Kultivierung der Zellen erfolgte in 75 cm² Flaschen, zur Expansion wurden 150 cm² Flaschen verwendet (TPP). Suspensionszellen wie T2-K^d wurden verdünnt, indem je nach Zelldichte ein Teil des Mediums mit frischem ersetzt wurde. Adhärente Zellen wie z. B. HEK293T mussten zunächst trypsinisiert werden. Dazu wurde das Medium vollständig abgenommen und gegen steril filtriertes Trypsin/EDTA ausgetauscht (3 ml in 75 cm², 6 ml in 150 cm² Flaschen). Nachdem die Zellen vollständig abgelöst waren, wurden sie in ein steriles Teströhrchen (TPP) überführt, für 5 min bei 716 x g abzentrifugiert (Minifuge 2, Kendro, Rotor 2705) und je nach Zelldichte 1:10 oder 1:20 in frisches Medium aufgenommen. Um die Zellzahl zu bestimmen wurde eine Neubauer Zählkammer (Marienfeld) verwendet. Dazu wurden die Zellen in Trypanblau-Färbelösung verdünnt, welches die Unterscheidung von lebenden und toten Zellen ermöglicht. Unter Berücksichtigung des Verdünnungsfaktors (VF) errechnet sich die Zellzahl wie folgt:

$$\frac{\text{Zellzahl in alle vier Großquadraten} \times \text{VF} \times 10^4}{4} = \text{Zellen/ml}$$

5.3.2 Einfrieren und Auftauen von eukaryontischen Zellen

Einfrieremedium 40 % RPMI (v/v)
 50 % FCS (v/v)
 10 % DMSO (v/v)

Um Zellen einzufrieren, wurden je 5 x 10⁶ Zellen für 5 min bei 716 x g abzentrifugiert (Minifuge 2, Kendro, Rotor 2705) und in 1 ml Einfrieremedium aufgenommen. Zur Aufbewahrung wurden 1.5 ml Schraubdeckelröhrchen (Cryo, Nalgene) gewählt. Die Zellen wurden bei – 70 °C aufbewahrt, bei

längerfristiger Lagerung wurden sie in den Stickstofftank (-138 °C) überführt. Zur erneuten Kultivierung der Zellen wurden diese im Schraubdeckelröhrchen bei 37 °C aufgetaut, in ein Teströhrchen mit vorgewärmtem Zellkulturmedium überführt und das Konservierungsmedium per Zentrifugation unter obigen Bedingungen entfernt. Die Zellen wurden in frisches vorgewärmtes Medium aufgenommen und in eine 75 cm² Flasche ausgesät.

5.3.3 Transfektion von eukaryontischen Zellen

A) Transfektion von HEK293T

| | |
|-----------------|---|
| 2 x HBS, pH 7.0 | 1.5 mM Na ₂ HPO ₄ |
| | 55 mM Hepes |
| | 274 mM NaCl |

In eine 14 cm Zellkulturschale (TPP) wurden 4 x 10⁶ Zellen ausgesät. Das Gesamtvolumen an Medium betrug 20 ml pro Schale. Am Folgetag waren die Zellen konfluent und konnten transfiziert werden. Dazu wurde zunächst das Kulturmedium in den Schalen gewechselt und dann ein Transfektionsansatz mit einem Gesamtvolumen von 5 ml pro Schale vorbereitet: 40 µg DNA wurden mit 2.25 ml auf 37 °C vorgewärmtem sterilem ddH₂O aufgefüllt und durch Vortexen vermischt. Anschließend wurden 250 µl 2 M CaCl₂ hinzugefügt und für 5 min bei 37 °C inkubiert. Dieser Ansatz wurde mit sterilfiltriertem und vorgewärmtem 2 x HBS auf 5 ml aufgefüllt, für 10 min bei 37 °C inkubiert und dann tropfenweise in das Medium überführt. Nach 24 Stunden wurde das Medium gewechselt und die Zellen bis zur Ernte des Zellüberstandes kultiviert.

B) Transfektionskontrolle in HEK293T

| | |
|----------------|---|
| FACS-Puffer | 1 % FCS (v/v) |
| | 15 mM NaN ₃ |
| | in D-PBS |
| Substratpuffer | 5 % AEC (v/v) |
| | 0.1 % H ₂ O ₂ (v/v) |
| | in 0.1 M NaAc [AEC und NaAc wurden zunächst filtriert, 0.22 µm] |

Für die Transfektionskontrolle wurden 2.5 x 10⁵ Zellen in eine 6 Loch-Zellkulturplatte (TPP) in einem Gesamtvolumen von 5 ml ausgesät. Der Transfektionsansatz wurde wie oben beschrieben angesetzt, lediglich die Mengen wurden jeweils auf 1/10 verringert, so dass pro Loch 500 µl des Ansatzes hinzugefügt wurden. Die Transfektionskontrolle diente dazu, die Zellen an den jeweiligen Erntetagen auf ihre Transfektion bzw. die Expression des gewünschten Proteins zu überprüfen. Dazu wurden die Zellen durch Pipettieren von der Platte abgelöst, in 100 µl PBS aufgenommen und mittels Zentrifugation für 5 min bei 70 rpm auf einen Objektträger gebracht (Cytospin 2, Shandon). Die Zellen wurden nach dem Trocknen für 10 min in eiskaltem Aceton fixiert, wiederum getrocknet und dann für 10 min in PBS gewässert. Die Färbung der transfizierten Zellen auf den Objektträgern erfolgte mit in FACS-Puffer verdünntem Peroxidase-gekoppeltem Antikörper für 30 min. Bevor die Antikörperverdünnung auf die Zellen pipettiert werden konnte, musste zunächst die restliche

Flüssigkeit vollständig abgesaugt werden. Nachdem die Objektträger in PBS gewaschen und die Flüssigkeit entfernt wurde, konnte die Substratreaktion erfolgen. Dazu wurde ein Tropfen von 50 µl des Substratpuffers auf die Zellen pipettiert und nach 10 min wieder abgewaschen. Die getrockneten Objektträger wurden mit Gelatine und Deckgläschen versiegelt, sodass unter dem Mikroskop die Transfektion überprüft werden konnte.

C) Transfektion von SF9

| | |
|----------------------|--|
| Grace-Medium | 10 % FCS (v/v) 100 U/ml Penicillin/Streptavidin 0.35 g/l Natriumbicarbonat pH 6.15 sterilfiltriert (0.22 µm) |
| Präzipitationspuffer | 25 mM Hepes 125 mM CaCl ₂ 140 mM NaCl pH 6.8/6.9/7.0/7.1 sterilfiltriert (0.22 µm) |
| Färbelösung | 1 ml X-Gal Lösung 770 µg/ml X-Gal (in β-Gal Lösung) |

Für die Transfektion der Insektenzellen SF9 musste zunächst das Grace-Medium und der Präzipitationspuffer frisch hergestellt werden. Um den optimalen pH Wert des Präzipitationspuffers zu bestimmen, wurde der Puffer mit vier verschiedenen pH Werten hergestellt. Für den Puffertest wurden in vier 25 cm² Flaschen (TPP) jeweils 4 x 10⁶ SF9-Zellen ausgesät. Am Folgetag waren die Zellen konfluent und das Kulturmedium (TMN-FH) wurde abgesaugt. Dann wurden die Zellen einmal mit 2 ml Grace-Medium gewaschen und anschließend in 1 ml Grace-Medium aufgenommen. Zu den Zellen wurde nun 10 µg der Test DNA (pIE-βGal) in 1 ml des jeweiligen Präzipitationspuffers tropfenweise hinzugegeben. Dabei musste die Kulturflasche ständig geschwenkt werden. Nach einer 5-stündigen Inkubation bei 28 °C wurde der Transfektionsansatz abgenommen, die Zellen zweimal mit TMN-FH Medium gewaschen und schließlich in 10 ml TMN-FH Medium aufgenommen. Nach 3 Tagen der Inkubation bei 28 °C wurde der Zellüberstand abgesaugt und die Zellen zweimal mit D-PBS gewaschen, ehe sie in 1 ml eiskaltem Methanol für 1 min fixiert wurden. Nach erneutem Waschen wurde dann 1 ml der Färbelösung zugefügt und die Zellen für mehrere Minuten inkubiert bis eine Färbung sichtbar wurde. Zellen, die erfolgreich transfiziert wurden, zeigten eine deutliche Blaufärbung. So konnte für die weiteren Transfektionen der beste Präzipitationspuffer ermittelt werden.

Für die Transfektion der SF9-Zellen mit der DNA der Hitzeschockfusionsproteine wurden wiederum pro Ansatz eine 25 cm² Flasche mit jeweils 4 x 10⁶ SF9-Zellen ausgesät. Wie oben beschrieben wurden die Zellen gewaschen und in Grace-Medium aufgenommen. 6 µg der DNA wurden zusammen mit 0.3 µg der Baculovirus DNA (Sigma) in ein Reaktionsgefäß überführt und mit 1 ml des optimalen Präzipitationspuffers gemischt. Unter Schwenken wurde dieses Gemisch tropfenweise auf die Zellen getropft und dann für 5 h bei 28 °C inkubiert. Wie in der Testtransfektion wurden die Zellen anschließend gewaschen und die schließlich in 10 ml TMN-FH für 7 Tage liegend inkubiert.

5.3.4 Proteinexpression in eukaryontischen Zellen

A) Expression der Hsp-HER2/neu-Fusionsproteine und MHC-Klasse-I-Fc-Dimere in HEK293T

Für die Produktion von Proteinen in HEK293T-Zellen wurden in eine 14 cm Zellkulturschale (TPP) 4×10^6 Zellen ausgesät und wie in **5.3.3 A** beschrieben transfiziert. Die Ernte des Zellüberstandes zur Aufreinigung der sekretierten Proteine erfolgte an Tag 3 und 6 nach der Transfektion. Dazu wurde das Kulturmedium abgenommen, für 5 min bei $716 \times g$ abzentrifugiert (Minifuge 2, Kendro, Rotor 2705) und der klare Überstand bis zur Aufreinigung bei $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ aufbewahrt.

B) Expression der Hsp-HER2/neu-Fusionsproteine in SF9

Um Proteine in SF9 Zellen zu exprimieren, wurden sie wie in **5.3.3 C** beschrieben transfiziert. Nach einer 7-tägigen Inkubation bei $28 \text{ }^\circ\text{C}$ in 10 ml TMN-FH wurden sie passagiert. Dazu wurde am Vortag eine 25 cm^2 Flasche mit jeweils ca. 4×10^6 SF9-Zellen ausgesät und auf diese, nachdem das Medium abgesaugt worden war, 8 ml der Zellen aus der vorigen Flasche gegeben. Da SF9-Zellen semiadhärent wachsen, mussten sie mit einem Zellschaber (TPP) vorsichtig gelöst werden. Die passagierten Zellen wurden für 1.5 h bei RT unter leichtem Schwenken inkubiert, dabei setzten sich die Zellen ab, so dass anschließend der Überstand abgesaugt und 10 ml frisches TMN-FH Medium zugefügt werden konnte. Die Flaschen wurden wieder für eine Woche bei $28 \text{ }^\circ\text{C}$ inkubiert, ehe die zweite Passage folgte, die analog zur ersten durchgeführt wurde. Nach wiederum 7 Tagen wurden die Zellen das dritte Mal passagiert, dieses Mal in eine 75 cm^2 Flasche mit insgesamt 25 ml Medium. In der vierten und letzten Passage wurden 20 ml der Zellen in eine 150 cm^2 Flasche überführt und für eine Woche in 50 ml Medium kultiviert. Die Durchführung der Passage erfolgte jeweils analog zur ersten. Am Ende der vierten Passage wurden die Zellen durch Abschaben vorsichtig abgelöst, für 10 min bei RT und $716 \times g$ abzentrifugiert und bis zur Aufreinigung bei $4 \text{ }^\circ\text{C}$ aufbewahrt. 1 ml dieses Zellüberstandes wurde bei $-70 \text{ }^\circ\text{C}$ als Backup gelagert.

5.3.5 Durchflusszytometrische Untersuchungen von eukaryontischen Zellen

A) Färbung von Zelloberflächenmolekülen

FACS-Puffer 1 % FCS (v/v)
 0.015 M NaN_3
 in D-PBS

Blockierungslösung 5 % Venimmun (v/v)
 in FACS-Puffer

Um den Aktivierungszustand eukaryontischer Zellen zu untersuchen, wurde das *Fluorescence Activated Cell Sorting* (FACS) angewandt. Hierbei können mittels Antikörpern, welche mit einem fluoreszierenden Farbstoff konjugiert sind, die einzelnen Zelloberflächenmoleküle oder auch intrazelluläre Moleküle spezifisch nachgewiesen werden. Für die Färbungen wurden die Antikörper mit den Farbstoffen Fluorescein (FITC; Emissionsmaximum bei 519 nm), R-Phycoerythrin (PE;

Emissionsmaximum bei 578 nm), Allophycocyanin (APC; Emissionsmaximum bei 660 nm), Peridinin-Chlorophyll-Proteinkomplex (PerCP; Emissionsmaximum bei 675 nm) oder Alexa 647 (Emissionsmaximum bei 669 nm) verwendet. Antikörper, die biotinyliert waren bzw. kein Konjugat trugen, wurden entweder mit Fluorochrom konjugiertem Streptavidin oder mit einem sekundären fluoreszenzmarkiertem Antikörper gefärbt. Um unspezifische Bindungen der Antikörper an Fc-Rezeptoren zu verhindern, wurden diese mit einer Blockierungslösung für 15 min auf Eis abgesättigt. Sollten mehrere Oberflächenmoleküle auf einer Zelle angefärbt werden, wurden die Antikörper in einer Färbung kombiniert. Streptavidin und auch die sekundären Antikörper wurden stets in einem zweiten Schritt auf den Zellen inkubiert, nach der Färbung mit den Erstantikörpern. Die Verdünnungen variierten je nach Antikörper zwischen 1:100 und 1:500 und sind dem Abschnitt **4.3.2 A** zu entnehmen. Für die Färbung wurden die Zellen jeweils für 30 min unter Lichtabschluss auf Eis in einem Volumen von 50 µl inkubiert. Um lebende Zellen von den toten unterscheiden zu können, wurde Propidiumiodid (PI) in die Färbung integriert. Dies war allerdings nur bei nicht fixierten Zellen möglich. PI wurde in Zytotoxizitätsstudien 1 µg/ml bzw. bei Oberflächenfärbungen in einer Konzentration von 0.3 µg/ml eingesetzt und direkt vor der Messung auf die Zellen gegeben. Die Messung erfolgte in FACS Röhren (Greiner) an den Geräten FACScan oder FACSCalibur (BD Bioscience). Zur Datenverarbeitung und Datenauswertung wurde die Software Cell-Quest Pro (BD Bioscience) bzw. FlowJo (Tree Star, Ashland, USA) verwendet.

B) Färbung von intrazellulären Molekülen

Für die Färbung intrazellulärer Moleküle mussten die Zellen fixiert werden. Hierbei wurde das BD Cytofix/Cytoperm Plus Kit (BD Bioscience) verwendet. Sollten zusätzlich noch Oberflächenmoleküle angefärbt werden, so wurde dies vor der Zellfixierung durchgeführt wie oben beschrieben. Nach der Färbung wurden die Zellen in Perm/Waschlösung gewaschen, dann für 20 min auf Eis unter Lichtabschluss mit je 100 µl Cytofix inkubiert und anschließend wiederum mit Perm/Waschlösung gewaschen. Danach konnten mit einem fluoreszierenden Antikörper die intrazellulären Moleküle angefärbt werden (30 min auf Eis, im Dunkeln). Im Anschluss wurden die Zellen mit FACS-Puffer gewaschen und in einem Volumen von 50 µl für die Färbung in ein FACS Röhren (Greiner) überführt.

C) Färbung der Zellen über das MHC-Klasse-I:Peptid-IgG₁-Fc-Dimer

Für die Färbung der PBMC bzw. BMDC mit dem in HEK293T-Zellen exprimierten MHC-Klasse-I:Peptid-IgG₁-Fc-Dimer wurde das Protein zunächst mit 10 µg/ml Peptid für 30 min bei RT beladen. Die Inkubation des Peptid beladenen Dimers auf den Zellen erfolgte in 96 Lochplatten in unterschiedlichen Konzentrationen für 30 min auf Eis. Im Anschluss wurde das Dimer analog **5.3.5 A** über Sekundärantikörper angefärbt. Die zusätzliche Färbung weiterer Oberflächenmoleküle der T-Zellen ist ebenfalls **5.3.5 A** zu entnehmen.

5.3.6 Peptidbindungsassay

Um die Bindung einzelner Peptide an das MHC-Klasse-I-Molekül H2-K^d zu testen, wurden in eine 96-Lochplatte jeweils 1×10^5 T2-K^d-Zellen pro Loch in 200 μ l T2-K^d-Medium verteilt. Zusätzlich zu 100 ng/ml humanem β_2 Mikroglobulin (β_2m) wurden unterschiedliche Peptidkonzentrationen zugefügt. Nach einer Inkubation von 20 Stunden bei 37 °C wurden die Zellen durch Zentrifugation bei 716 x g und 4 °C für 5 min abzentrifugiert (Minifuge 2, Kendro, Rotor 2705). Die Stabilisierung von H2-K^d wurde durch spezifische Färbung des Zelloberflächenmoleküls wie in **5.3.5 A** beschrieben untersucht.

5.3.7 Isolierung von mononukleären Zellen aus humanem Blut und Knochenmark

A) Präparation der PBMC und BMMC aus *Buffy Coats*

Blut- und Knochenmarksspenden von HER2/neu-positiven Mammakarzinompatientinnen konnten über Dr. Philipp Beckhove (DKFZ) aus der Frauenklinik Heidelberg bezogen werden. Material von gesunden Spendern wurde aus dem Institut für klinische Transformationsmedizin und Zelltherapie (IKTZ, Heidelberg) erhalten. Um mononukleäre Zellen aus dem Blut bzw. Knochenmark (PBMC bzw. BMMC) von humanen Spendern zu gewinnen, wurde eine Dichtegradientenzentrifugation mittels Ficoll-Histopaque durchgeführt. Dazu wurden zunächst spezielle 50 ml Falcongefäße mit Filter (Leucosep, Greiner) mit 15 ml Ficolllösung (Biocoll, Biochrom) befüllt und bei 716 x g und 25 °C für 5 min abzentrifugiert (Minifuge 2, Kendro, Rotor 2705). Nach der Zentrifugation befand sich die Ficolllösung unterhalb des Filters. Dann wurden jeweils 20 ml der Blut- bzw. Knochenmarkspende vorsichtig in das Röhrchen pipettiert und mit RPMI (inklusive 10 mM Hepes und 100 U/ml Penicillin/Streptavidin) auf 50 ml aufgefüllt. Die darauf folgende Zentrifugation für 20 min bei 716 x g und 25 °C fand ohne Bremse statt, um den entstehenden Gradient während des Bremsvorgangs nicht zu zerstören. Mononukleäre Zellen konnten durch vorsichtiges Absaugen mit einer Glaskanüle aus der weißlichen Zwischenschicht entnommen werden, wobei darauf geachtet werden musste, keine Erythrozyten aus der darunter liegenden Schicht zu überführen. Die PBMC bzw. BMMC wurden dreimal mit D-PBS bei 716 x g und 25 °C für 5 min gewaschen und anschließend in X-Vivo20 Medium überführt. Die Zellen wurden bis zur Analyse in 6-Lochplatten kultiviert.

B) HLA-Typisierung der Spenderproben

Zur Typisierung der Proben wurden jeweils 5×10^6 PBMC bzw. BMD in FACS-Puffer gewaschen (716 x g und 25 °C für 5 min, Minifuge 2, Kendro, Rotor 2705) und für 15 min auf Eis mit 5 % Venimmun in FACS-Puffer inkubiert, um unspezifische Bindungen abzusättigen. Die spezifische Detektion des HLA-A2-Oberflächenmoleküls erfolgte mit 50 μ l des BB7.2 Hybridomüberstandes (anti-HLA-A2) für 30 min auf Eis. Nachdem die Zellen wie oben beschrieben gewaschen wurden, folgte die Inkubation mit dem FITC-konjugierten Zweitantikörper Ziege-anti-Maus-IgG-(Fab')₂ (Dianova) für 30 min auf Eis. Die Messung wurde wie in **5.3.5 A** beschrieben am FACSCalibur durchgeführt.

5.3.8 Kultivierung und Stimulation von murinen BMDC aus dem Knochenmark

Die BMDC wurden wie in 5.4.7 beschrieben isoliert. Zur Kultivierung bei 37 °C sollten jeweils 5×10^5 der aus dem Knochenmark gewonnenen Zellen in eine 6-Lochplatte mit 5 ml BMDC-Medium pro Loch ausgesät werden. Da BMDC zunächst an der Kulturschale anhaften, sich aber während ihrer Ausreifung ablösen, wurde hier keine herkömmliche Zellkulturplatte verwendet. Stattdessen wurden unbeschichtete Platten verwendet, so dass die normalerweise gewünschte homogene Anhaftung der Zellen hier nicht stattfand. Zwei Tage nachdem die Zellen ausgesät worden waren, wurde die Hälfte des Mediums vorsichtig ausgetauscht, so dass der Plattenboden nicht berührt bzw. die Zellen nicht aufgewirbelt wurden. Am vierten Tag wurde die Prozedur wiederholt, wobei hier der Zellüberstand vorsorglich abzentrifugiert wurde (5 min bei 4 °C und 402 x g; Minifuge 2, Kendro, Rotor 2705), um Zellen, die sich bereits abgelöst hatten nicht zu verlieren. Die Stimulation der BMDC mit rekombinantem Fusionsprotein fand für 48 Stunden von Tag 6 bis Tag 8 statt. Hierzu wurde zunächst der Zellüberstand komplett abgenommen und gegen 2 ml frisches BMDC-Medium ausgetauscht, wobei wiederum darauf geachtet wurde, die Zellen so wenig wie möglich zu berühren. Zu diesen 2 ml wurde dann das entsprechende Protein, bzw. als Kontrolle LPS (Sigma), in verschiedenen Mengen hinzugegeben und bei 37 °C inkubiert. Die Zellen wurden an Tag 8 geerntet, in FACS-Puffer überführt, so dass sie wie in 5.3.5 beschrieben auf die Expression ihrer Oberflächenmarker untersucht werden konnten.

5.3.9 *In vitro* Restimulation von T-Zellen

A) Kurzzeitige *in vitro* Restimulation der T-Zellen zur IFN γ -Sekretion

Um T-Zellen zu restimulieren, wurden zunächst aus der Milz bzw. den drainierenden Lymphknoten wie in 5.4.5 beschrieben Einzelzellsuspensionen hergestellt. Die Suspension einer Milz wurde in 1 ml Restimulationsmedium aufgenommen, was eine Zellkonzentration von ungefähr 10^8 Zellen/ml ergab. Je 100 μ l der Zellsuspension (10^7 Zellen) wurden in eine 96-Lochplatte pipettiert. Die Zellsuspension der Lymphknoten wurde komplett entsprechend der Probenzahl zu je 100 μ l pro Loch auf die Platte verteilt. Zu den Zellen wurden wiederum 100 μ l des Restimulationsmediums dazugegeben, entweder mit Brefeldin A allein (1:1000; BD *Cytofix/CytopermTM Plus* Kit, BD Bioscience), oder zusätzlich mit 10 μ g/ml Concanavalin A bzw. 10 μ g/ml des zu untersuchenden Peptids. Die Zellen wurden anschließend bei 37 °C für 4 bis 6 Stunden inkubiert. Die Färbung der Oberflächenmoleküle bzw. der intrazellulären Moleküle erfolgte wie in 5.3.5 beschrieben.

B) Mehrtägige *in vitro* Restimulation der T-Zellen zur IFN γ -Sekretion

Für eine Akkumulation der spezifischen T-Zellen wurden jeweils 2×10^7 Zellen aus der Milz in Restimulationsmedium mit 1 μ M Peptid aufgenommen. Die Restimulation fand in einer 25 cm³ Kulturflasche aufrecht stehend statt. Zellen aus den Lymphknoten wurden in 48-Lochplatten kultiviert. Dabei wurden alle gewonnenen Zellen in 1 ml des Restimulationsmediums mit 1 μ M Peptid

aufgenommen. Kontrollgruppen erhielten nur das Medium ohne Peptidzugabe. Nach fünftägiger Kultur wurden die Zellen geerntet (5 min bei 4 °C und 716 x g, Minifuge 2, Kendro, Rotor 2705) und wie in **5.3.5** beschrieben untersucht.

5.3.10 Nachweis der T-Zellaktivität im ELISPOT

Waschpuffer 0.05 % Tween20
 in PBS

Die T-Zellaktivität in Form von IFN γ Sekretion nach der Stimulation durch Protein-beladene BMDC wurde im Elispot (*Enzyme linked immune spot technique*) untersucht. Dazu wurden zunächst T-Zellen aus der Milz und den drainierenden Lymphknoten von immunisierten BALB/c gewonnen und wie in **5.3.9 B** beschrieben *in vitro* restimuliert. Die Beladung der BMDC mit 5 μ M Protein ist **5.3.8** zu entnehmen. Für die letzten 24 Stunden der Proteininkubation wurden die BMDC zusätzlich mit 1 μ g/ml LPS maturiert. Bevor BMDC und T-Zellen kokultiviert werden konnten, mussten die speziellen Elispot 96-Lochplatten (Milipore) mit dem Detektionsantikörper vorbehandelt werden. Für die Durchführung des Elispot wurden alle Reagenzien aus dem Maus IFN γ ELISPOT *Ready Set Go* Kit (eBioscience) verwendet, die entsprechenden Verdünnungen der Antikörper und Verdünnungsreagenzien sind der Produktbeschreibung zu entnehmen. Die Bindung des anti-Maus-IFN γ Antikörpers erfolgte zu je 100 μ l pro Loch über Nacht bei 4 °C. Am Folgetag wurde die Platte zweimal mit je 200 μ l Bindungspuffer pro Loch gewaschen und schließlich in RPMI Restimulationsmedium für eine Stunde bei RT blockiert (200 μ l pro Loch). Für die Kokultur wurden pro Loch 1 x 10⁵ T-Zellen und 2 x 10⁴ BMDC in einem Totalvolumen von 200 μ l in RPMI Restimulationsmedium pro Loch eingesetzt, was einem Verhältnis von T-Zelle zu BMDC von 5 zu 1 entspricht. Nach 40-stündiger Kokultur wurde die Platte dreimal dem Waschpuffer gewaschen, ehe der Detektionsantikörper (anti-Maus-IFN γ -Biotin) für zwei Stunden bei RT inkubiert wurde. Für alle Waschschrte wurde ein Volumen von 200 μ l pro Loch eingesetzt. Im Anschluss wurde die Platte viermal mit Waschpuffer gewaschen, wobei die Lösung jeweils für eine Minute bei RT inkubiert wurde. Dann wurde das Avidin-gekoppelte Enzym, Avidin-HRP, für 45 min bei RT auf den Zellen inkubiert (100 μ l pro Loch). Anschließend folgten drei weitere Waschschrte mit Waschpuffer bzw. ein zweimaliges Waschen mit PBS ohne Tween. Im Anschluss wurde das Substrat AEC Chromogen Kit (Sigma) zugeben, wobei die Durchführung der einzelnen Schritte hier ebenfalls der Produktbeschreibung zu entnehmen ist. Die Inkubation des Substrats erfolgte bei RT im Dunkeln bis eine deutliche Violettfärbung der positiven Kontrolle detektierbar war. Die Reaktion wurde durch Waschen mit deionisiertem Wasser abgestoppt und die Platte über Nacht an der Luft getrocknet. Die Auswertung der Spotanzahl erfolgte am Axioplan 2 *imaging* mit Hilfe des Programms KS EliSpot Version 4.9 von Zeiss.

5.4 Methoden zur Arbeit mit Mäusen

5.4.1 Zucht und Haltung der Tiere

Die hier verwendeten Mäuse wurden unter spezifisch pathogenfreien Bedingungen im zentralen Tierlabor des Deutschen Krebsforschungszentrums in Heidelberg gehalten.

5.4.2 DNA-Isolation aus Schwanzbiopsien transgener Mäusen

Gewebepuffer 100 mM Tris
 200 mM NaCl
 5 mM EDTA
 0.2 % SDS (w/v)
 pH 8.5

TE-Puffer 100 mM Tris
 10 mM EDTA
 pH 8.0

In dieser Arbeit wurde unter anderem mit der transgenen Mauslinie HHDII (H-2D^b/β₂m Doppelknockout, transgen für HLA-A2.1/D^b-hβ₂m; Dr. F. Lemonier) gearbeitet. Obwohl alle Nachkommen homozygot für das Transgen sein sollten, wurde dennoch die Expression der Moleküle in den einzelnen Mäusen per PCR überprüft. Dazu wurde Jungtieren im Alter von ungefähr 6 Wochen ein 0.5 cm langes Stück der Schwanzspitze abgetrennt und in 700 µl Gewebepuffer zusammen mit 10 µg Proteinase K über Nacht bei 56 °C unter leichtem Schütteln bei 300 rpm verdaut (Thermomixer comfort, Eppendorf). Am darauf folgenden Tag wurden die Proben bei 16000 x g und RT für 5 min abzentrifugiert (Centrifuge 5415 D, Eppendorf) und der Überstand in eine neues Reaktionsgefäß überführt. Die DNA wurde durch Zugabe von 0.6 Volumenteilen Isopropanol gefällt und konnte mit Hilfe einer Glaskapillare (Marienfeld) gefischt werden. Der DNA-Faden blieb dabei an der Kapillare haften und wurde in zunächst 70 %, dann 100 % Ethanol gewaschen und anschließend an der Luft getrocknet. Die DNA wurde anschließend zusammen mit der Kapillare in ein Reaktionsgefäß mit 100 µl TE-Puffer überführt und darin bei 64 °C für 30 min gelöst. Die Untersuchung der DNA mittels PCR wurde durchgeführt wie in **5.1.1** beschrieben.

5.4.3 Injektionen bei Mäusen

Die Immunisierungen der Mäuse mit Peptid bzw. Protein erfolgte jeweils subkutan. Dabei wurde das Peptid bzw. die verschiedenen Proteine zuvor mit CpG und dem T-Helferepitop in LPS-freiem PBS (Gibco) gemischt. Die einzelnen Mengen variierten je nach Experiment und sind dem Ergebnisteil zu entnehmen. In der Regel wurden die Tiere zweimal im Abstand von 7 Tagen immunisiert. Für *in vivo* Zytotoxizitätsanalysen wurden die fluoreszenzmarkierten Zielzellen intravenös in die Schwanzvene der Tiere appliziert. Tumorzellen wurden stets subkutan appliziert. Die Gruppengröße betrug bei *in vivo*

Zytotoxizitätsanalysen je 3 Tiere pro Gruppe, für Tumorversuche wurden jeweils 5 Tiere pro Gruppe untersucht.

5.4.4 Organentnahme bei Mäusen

Für die Entnahme der Lymphknoten bzw. der Milz wurden die Mäuse durch Begasung mit CO₂ oder durch zervikale Dislokation getötet.

5.4.5 Herstellung von Einzelzellsuspensionen aus Milzen und Lymphknoten

Wie in **5.4.4** beschrieben wurden die Tiere getötet und Milz bzw. Lymphknoten entnommen. Die Organe wurden nach der Entnahme sofort in eine 6-Lochplatte mit D-PBS überführt und während der Prozedur auf Eis inkubiert. Um Einzelzellsuspensionen der Milz herzustellen, wurde sie mit einem Spritzenstößel in einem Zellfilter (40 µm) zerdrückt und anschließend mittels einer Kanüle (27G, 0.4 x 20 mm) homogenisiert. Lymphknoten wurden zwischen zwei Objektträgern zerrieben und mit D-PBS abgespült. Anschließend konnten die Zellen in Kultur genommen werden, dazu wurden sie für 5 min bei 4 °C und 402 x g abzentrifugiert (Minifuge 2, Kendro, Rotor 2705) und in das entsprechende Medium bzw. D-PBS resuspendiert. Im Falle von *in vivo* Zytotoxizitätsanalysen wurde die Zellsuspensionen ebenfalls abzentrifugiert und in FACS-Puffer mit Propidiumiodid aufgenommen (siehe **5.3.5 A**).

5.4.6 Lyse der Erythrozyten

| | |
|------------|---------------------------|
| ACK-Puffer | 0.15 M NH ₄ Cl |
| | 10 mM KHCO ₃ |
| | 0.1 mM EDTA |
| | pH 7.3 |

Für die Analyse von Milzzellen im FACS mussten für die Messung störende Erythrozyten lysiert werden. Dazu wurden aus den Milzen wie in **5.4.5** beschrieben Einzelzellsuspensionen hergestellt und pro Milz in 2 ml ACK-Puffer für 5 min bei RT inkubiert. Die Erythrozytenlyse wurde durch Waschen mit D-PBS abgestoppt.

5.4.7 Entnahme von Knochenmark und Isolation von BMDC

Für eine Kultur von dendritischen Zellen (DC) aus dem Knochenmark wurde den Mäusen Femur und Tibia freipräpariert. Die Knochen wurden für wenige Sekunden in 70 % Ethanol gewaschen und dann in steriles D-PBS überführt. Da eine Kultur angelegt werden sollte, musste nach der Präparation steril gearbeitet werden. Um die Zellen zu isolieren, wurden die Knochen jeweils an den Enden aufgeschnitten und mit Hilfe einer Kanüle (20G, 0.9x40 mm) mit D-PBS solange gespült, bis das

Knochenmark herausgeschwemmt wurde. Es konnte durch mehrmaliges Pipettieren homogenisiert werden. Anschließend wurden die Zellen für 5 min bei 4 °C und 402 x g abzentrifugiert (Minifuge 2, Kendro, Rotor 2705) und konnten dann in das entsprechende Medium aufgenommen und ausgesät werden (siehe **5.3.8**).

5.4.8 *In vivo* Zytotoxizitätsanalysen

Zur Analyse der zytotoxischen Effektoreigenschaften von T-Zellen *in vivo* wurden BALB/c-Mäuse, wie in **5.4.3** beschrieben, immunisiert, damit eine antigenspezifische Immunantwort induziert wird. Eine Woche nach der letzten Immunisierung wurde den Mäusen antigenbeladene und fluoreszenzmarkierte Zielzellen aus einer syngenen Maus intravenös in die Schwanzvene appliziert. Diese Zielzellen wurden aus Milzen gewonnen, aus denen wie in **5.4.5** beschrieben Einzelzellsuspensionen hergestellt wurden. Dabei musste für jedes Versuchstier die Hälfte einer Milz einer syngenen Spendermaus gerechnet werden. Nach der Lyse der Erythrozyten (siehe **5.4.6**) wurden die Zellen in D-PBS aufgenommen, filtriert (40 µm, BD Falcon) und zu zwei gleichen Teilen in D-PBS aufgenommen mit einer Konzentration von 2×10^7 Zellen pro ml. Die eine Hälfte wurde mit 1 µM des zu untersuchenden antigenen Peptids für 15 min bei 37 °C beladen, während die andere Hälfte der Zellen unbeladen blieb. Um die Zellen für die Untersuchung im FACS sichtbar zu machen, wurden sie mit CFSE (5,6-Carboxyfluorescein-diacetat-succinimidyl-ester; Sigma), einem fluoreszierenden Farbstoff markiert. CFSE wurde in einer Stammkonzentration von 5 mM in DMSO bei -20 °C aufbewahrt. Für die Markierung wurde die Zellfraktion, die mit Peptid beladen wurde, mit einer Konzentration von 1.5 µM CFSE (CFSE^{hi}) für 15 min bei RT im Dunkeln gefärbt. Die nicht beladenen Zellen wurden mit 0.15 µM CFSE (CFSE^{lo}) unter identischen Bedingungen gefärbt. Wurden zwei Antigene parallel untersucht, mussten die vereinigten Milzzellen der Spendermäuse in drei Teile geteilt werden. Eine Fraktion blieb wiederum unbeladen, die anderen beiden wurden mit dem ersten bzw. zweiten Peptid wie oben beschrieben beladen. Für die Färbung wurden die unbeladenen Zellen mit 0.5 µM CFSE (CFSE^{int}) gefärbt, die Peptid beladenen Zellfraktionen mit 3 µM (CFSE^{hi}) bzw. 0.08 µM CFSE (CFSE^{lo}). Durch die verschiedenen Konzentrationen konnten die unterschiedlich beladenen Zellfraktionen im FACS auseinander gehalten werden. Nach der Färbung wurden die Zellen einmal mit RPMI / 10 % FCS, dann zweimal mit D-PBS gewaschen. Die Zentrifugation der Zellen erfolgte dabei stets bei 402 x g für 5 min bei 4 °C (Minifuge 2, Kendro, Rotor 2705). Zum Abschluss mussten die Zellen filtriert (40 µm, BD Falcon), gezählt und dann 1:1, bzw. 1:1:1 gemischt werden. Von diesem Gemisch wurde den immunisierten Mäusen sowie den PBS-injizierten Kontrollmäusen dann wie oben beschrieben ungefähr 20×10^6 Zielzellen appliziert. Nach 16 bis 20 Stunden wurden die Versuchstiere getötet, Milz und Lymphknoten präpariert und aus diesen Organen wie in **5.4.5** beschrieben Einzelzellsuspensionen hergestellt. Die Zellsuspensionen wurden unter obigen Bedingungen abzentrifugiert und in FACS-Puffer mit 1 µg/ml Propidiumiodid aufgenommen. Die Messung erfolgte im FACScan (BD Bioscience), die Datenauswertung konnte mit der Software Cell-Quest Pro (BD Bioscience) durchgeführt werden. Zur Berechnung der antigenspezifischen Zytotoxizität wurden die unterschiedlich stark gefärbten

Zellen gezählt und der CFSE Quotient der antigenspezifischen zu unbeladenen Zellen errechnet: Zellzahl CFSE^{hi} / Zellzahl CFSE^{lo} bzw. Zellzahl CFSE^{hi} / Zellzahl CFSE^{int} und Zellzahl CFSE^{lo} / Zellzahl CFSE^{int}. Parallel wurde der Quotient aus Zellzahl CFSE^{hi} / Zellzahl CFSE^{lo} der PBS-immunisierten Mäuse gebildet und der Mittelwert errechnet. Die antigenspezifische zytotoxische Aktivität ergibt sich durch folgende Formel:

$$100 - (100 \times \text{Quotient}_{\text{immunisiert}}) / \text{Mittelwert Quotient}_{\text{PBS}}$$

Der erhaltene Wert spiegelt die prozentuale antigenspezifische Zytotoxizität *in vivo* wider.

5.4.9 Überwachung von Tumorwachstum in BALB/c-Mäusen

Den Mäusen wurden 5×10^5 Tumorzellen in 100 μl D-PBS subkutan an die rechte Flanke appliziert. Das Tumorwachstum wurde jeden zweiten bis dritten Tag mit Hilfe einer Schieblehre gemessen. Für die Berechnung des Tumorumfanges konnte folgende Formel angewandt werden:

$$V = 0.5 \times \text{Länge} \times \text{Breite}^2$$

Das Tumorwachstum wurde bis zu einer Größe von ca. 3 cm^3 verfolgt, dann wurden die Tiere wie in **5.4.4** beschrieben getötet.

6 Ergebnisse

6.1 Klonierung der Hsp-HER2/neu-Fusionsproteine

Der Herstellung der Hitzeschockfusionsproteine lag die Idee zugrunde, vier verschiedene Hitzeschockproteine (Hsp) kombiniert mit einem Tumorantigen als Vakzine einzusetzen und den Adjuvanseffekt der einzelnen Hitzeschockproteinanteile zu vergleichen. Die Proteine sollten im Mausmodell eingesetzt werden. Um keine Kreuzreaktivität gegen xenogene Hitzeschockproteine hervorzurufen, wurden drei murine Hitzeschockproteine gewählt (mHsp70, mHsc70, mHsp70L1) und diese mit dem C-terminalen Teil von *Mycobacterium tuberculosis* Hsp70 [*m.tub.*Hsp70(ct)] verglichen. Als Tumorantigen diente das in Brustkrebspatientinnen häufig überexprimierte HER2/neu. Von der humanen DNA wurde ein Teilabschnitt gewählt (HER2/neu₂₉₉₋₅₇₉), der das CD8⁺ Epitop KIFGSLAFL und ein weiteres CD8⁺ Epitop ILHNGAYSL enthält. Beide Epitope sind HLA-A2-restringiert, werden also von humanen MHC-Klasse-I-Molekülen präsentiert. Damit diese humanen A2-restringierten Epitope auch in Mäusen präsentiert werden können, wurde das HDDII-Mausmodell gewählt. HDDII-Mäuse besitzen keine eigenen MHC-I-Moleküle (K^b/D^b) mehr, sondern sind transgen für ein humanisiertes MHC-I-Molekül. Dieses besteht aus der humanen α 1- und α 2-Untereinheit aus dem HLA-A2-Molekül und einem humanen β ₂-Mikroglobulin (β _{2m}). Lediglich die α 3-Domäne der schweren Kette ist murin, was für die Bindung des murinen CD8-Moleküls erforderlich ist.

Für die Klonierung dieser Fusionsproteine wurden zwei verschiedene Expressionsvektoren gewählt (pRSETB und pET21d), welche sich durch die Position des Hexa-Histidin-Tags (His₆) in den *multiple cloning sites* unterscheiden. Dadurch wurde der His-Tag einerseits N-terminal an das rekombinante Protein kloniert (pRSETB) bzw. an den C-Terminus des Proteins gesetzt (pET21d). Der Einfluss der Position des His-Tags auf die spätere Proteinaufreinigung konnte so untersucht werden. Die Herstellung der Hsp-HER2/neu-Fusionsproteine bzw. der einzelnen HER2/neu- und Hitzeschockproteine umfasste mehrere Klonierungsschritte. Die in Abbildung 3A für die Konstrukte in pRSETB dargestellte Strategie sah vor, zunächst das für die spätere Detektion wichtige Streptavidinbindende Peptid (SBP) in den Expressionsvektor pRSETB zu klonieren. Anschließend wurden die Hitzeschockproteine über einen Zwischenvektor (pBSKS⁺) hinzugefügt. Zur Herstellung der Fusionsproteine wurde das Fragment der humanen HER2/neu DNA (HER2/neu₂₉₉₋₅₇₉) ebenfalls in den SBP enthaltenden Expressionsvektor kloniert. In einem letzten Schritt wurden die Hitzeschockproteine an das HER2/neu-SBP Konstrukt in pRSETB angefügt, so dass das Protein am N-Terminus mit dem His-Tag beginnt, gefolgt vom Hitzeschockprotein bzw. HER2/neu-Fragment. Das Streptavidinbindende Peptid schließt das Protein am C-Terminus ab. Die Klonierung der rekombinanten Proteine in den Expressionsvektor pET21d verlief analog. Die Abfolge der einzelnen Proteinteile ist hier identisch, jedoch bildet der His-Tag das C-terminale Ende des Proteins hinter dem SBP (Abb. 3B).

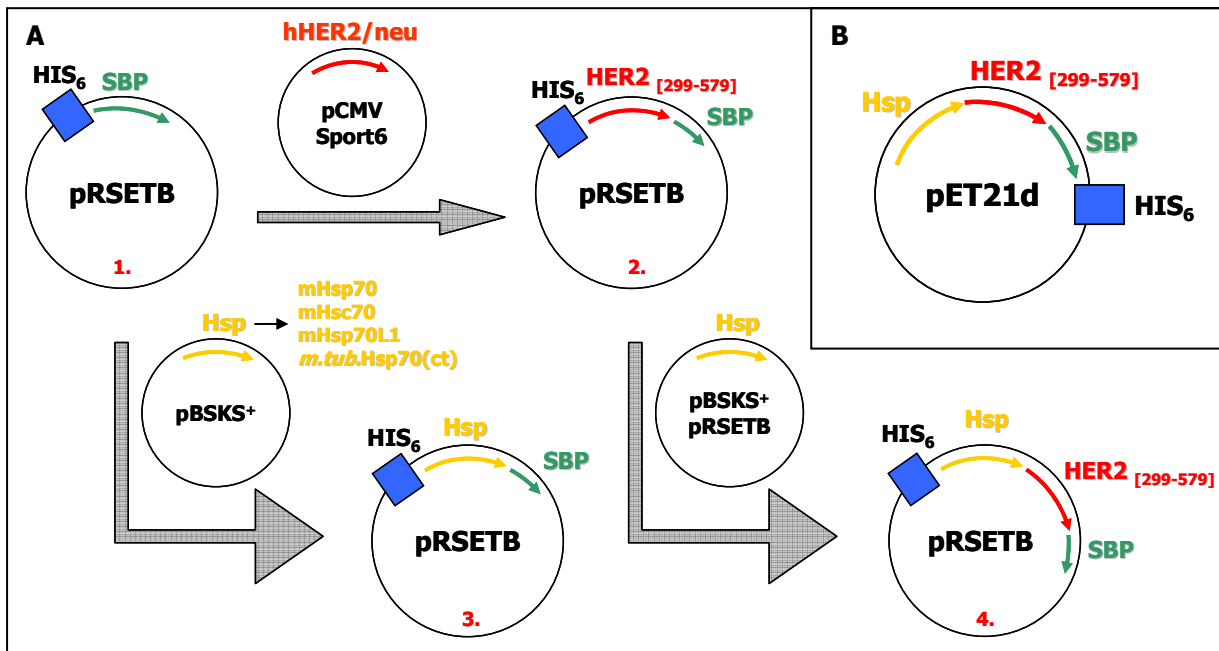


Abbildung 3: Schematische Darstellung der Klonierungsstrategie. Für die Klonierung der Hsp-HER2/neu-Fusionsproteine wurde zunächst das Streptavidin-bindende Peptid (SBP) in den Expressionsvektor pRSETB eingebracht (A). Dabei wurde das SBP C-terminal hinter den His-Tag kloniert (1.). Ein Fragment der humanen HER2/neu DNA (HER2/neu₂₉₉₋₅₇₉) wurde aus pCMV Sport6 zwischen den His-Tag und SBP eingefügt (2.). Ebenso wurden die vier verschiedenen Hitzeschockproteine [mHsp70, mHsc70, mHsp70L1 und *m.tub.Hsp70(ct)*] als PCR-Produkte aus dem Klonierungsvektor pBSKS⁺ entnommen und an SBP angefügt (3.). Um Fusionsproteine zu erhalten, mussten anschließend die einzelnen Hitzeschockproteine N-terminal vor das HER2/neu-Fragment eingebracht werden (4.). Die Klonierung der Fragmente in den Expressionsvektor pET21d verlief analog. Im Gegensatz zu den Konstrukten in pRSETB liegt hier der His-Tag am C-Terminus des Proteins (B).

6.1.1 Klonierung der His-Hsp-HER2/neu-SBP-Fusionsproteine in pRSETB

A) Klonierung des Streptavidin-bindenden Peptids in pRSETB

Die DNA des Streptavidin-bindenden Peptids (SBP) wurde mit den Restriktionsenzymen BamHI und SalI aus dem Vektor pBSKS⁺ entnommen und sollte in den mit Bsp119I geöffneten Vektor pRSETB eingefügt

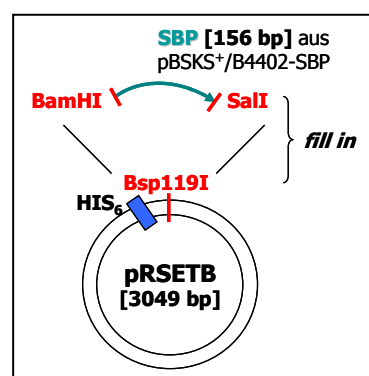


Abbildung 4: Klonierung des SBP in pRSETB. Der Vektor pBSKS⁺ wurde mit BamHI und SalI geöffnet und die Schnittstellen mit T4-Polymerase aufgefüllt. Der Expressionsvektor pRSETB wurde mit Bsp119I geöffnet und ebenfalls auf eine *blunt end* Ligation vorbereitet. Nach der Ligation ergab sich ein Vektor der Größe 3049 bp.

werden (Abb. 4). Um eine *blunt end* Ligation zu ermöglichen, wurden die Schnittstellen der Fragmente mit der T4-Polymerase behandelt. Nach der Ligation ergab sich ein Vektor der Größe 3049 bp. Da das SBP Fragment nach der Ligation in beiden Leserichtungen im Vektor vorliegen kann, wurde die Ligation über einen Kontrollverdau mit BamHI überprüft. Dabei zeigten sich, sofern das Insert in der Leserichtung des Promotors vorliegt, drei Fragmente von 40, 156 und 2853 bp (hier nicht gezeigt).

B) Klonierung der Hitzeschockproteine in pBSKS⁺

Um die für die weitere Klonierung nötigen Schnittstellen zu erhalten, mussten zunächst Oligonukleotide generiert werden. Mit diesen Primern wurde die cDNA der Hitzeschockproteine über PCR amplifiziert und zusätzliche Restriktionsschnittstellen am 5' und 3' Ende angefügt. Die PCR-Produkte für mHsp70 und mHsc70 konnten nun mit den Enzymen XhoI und KpnI geschnitten und in den entsprechend verdauten Vektor pBSKS⁺ kloniert werden (Abb. 3A). Dabei ergab sich eine Vektorgröße von 4888 bp für mHsc70 bzw. 4874 bp für mHsp70. Das PCR-Produkt für mHsp70L1 wurde mit XhoI und NcoI/Eco32I in pBSKS⁺ eingebracht, was eine Vektorgröße von 4480 bp ergab (Abb. 5B). Durch einen Kontrollverdau mit XhoI, NcoI und KpnI bzw. eine Sequenzierung der Vektoren konnten die Schnittstellen bestätigt werden.

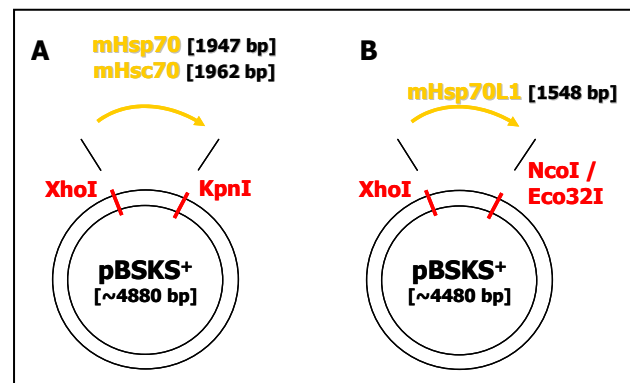


Abbildung 5: Klonierung der Hsp in pBSKS⁺. Den Hitzeschockproteinen wurden zunächst über PCR weitere Restriktionsschnittstellen an das 5' und 3' Ende angefügt, welche eine Klonierung in den Vektor pBSKS⁺ ermöglichte. Hsp70 und Hsc70 wurden jeweils mit XhoI und KpnI (A), Hsp70L1 mit XhoI und EcoRI verdaut (B).

C) Klonierung der Hitzeschockproteine in pRSETB-SBP

Das PCR-Produkt von *m.tub.*Hsp70(ct) wurde mit den Restriktionsenzymen XhoI und NcoI verdaut und konnte dann direkt in den SBP enthaltenden Vektor pRSETB kloniert werden (Abb. 6A). Die Ligation ergab einen Vektor der Größe 3796 bp. Mit Hilfe einer Sequenzierung wurden die Schnittstellen überprüft. Die restlichen drei Hitzeschockproteine wurden entsprechend ihrer neuen Restriktionsschnittstellen mit XhoI, KpnI bzw. NcoI/Eco32I aus dem Klonierungsvektor pBSKS⁺ ausgeschnitten und in pRSETB-SBP überführt. Dabei wurden die Hitzeschockproteine jeweils C-terminal hinter den His-Tag in den Vektor eingebracht (Abb. 6A und 6B). Überprüft wurde die Ligation durch einen Kontrollverdau mit den entsprechenden Restriktionsenzymen.

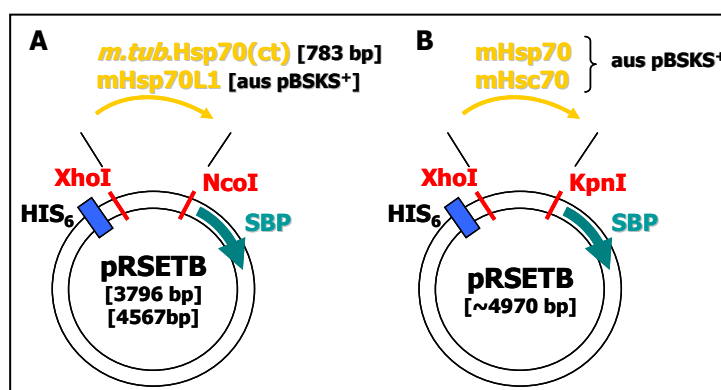


Abbildung 6: Klonierung der Hsp in pRSETB. Analog zu den anderen Hitzeschockproteinen wurde auch das PCR-Produkt von *m.tub.*Hsp70(ct) mit den XhoI und NcoI/Eco32I verdaut und direkt in pRSETB-SBP überführt (A). Die in pBSKS⁺ enthaltenen Hsp wurden mit den entsprechenden Restriktionsenzymen ebenfalls in pRSETB kloniert. Dabei wurden die Hitzeschockproteine zwischen den His-Tag und das SBP eingefügt (A und B).

D) Klonierung des HER2/neu-Fragments in pRSETB-SBP

Die cDNA der humanen HER2/neu Sequenz lag in pCMVSPORT6 vor. Für die Klonierung sollte ein Teilstück der DNA verwendet werden, welches die beiden CD8⁺ T-Zellepitope KIFGSLAFL und ILHNGAYSL enthält. Dieses Fragment wurde mit den Enzymen AhdI und BsaWI aus dem Vektor pCMVSPORT6 herausgeschnitten und sollte in den mit EcoRI geöffneten Vektor pRSETB-SBP kloniert werden (Abb. 7). Die Schnittstellen wurden mit der T4-Polymerase für eine *blunt end* Ligation vorbereitet. Da das Insert nach der Ligation in beide Leserichtungen eingebaut werden kann, musste die Orientierung des HER2/neu-Fragments mit Hilfe eines Kontrollverdaus überprüft werden. Der enzymatische Verdau mit EcoRI bestätigt, dass das Insert tatsächlich in den Vektor pRSETB-SBP eingebaut wurde, der Verdau mit BglII zeigt durch die Fragmente von 238 bp und 3660 bp die richtige Orientierung an.

Nach der Ligation ergab sich ein Vektor der Größe 3898 bp, wobei das HER2/neu-Fragment zwischen den His-Tag und SBP kloniert wurde.

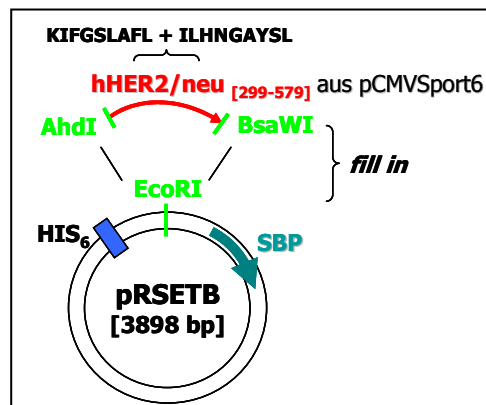


Abbildung 7: Klonierung von HER2/neu in pRSETB-SBP. Das HER2/neu-Fragment wurde mit AhdI und BsaWI aus pCMVSPORT6 herausgeschnitten und über eine *blunt end* Ligation in den mit EcoRI geöffneten Vektor pRSETB-SBP einkloniert. Nach der Ligation ergab sich ein Vektor der Größe 3898 bp. Die Orientierung des Fragments, das zwischen His-Tag und SBP kloniert lag, wurde mittels BglII Verdau geprüft.

E) Klonierung der Hsp-HER2/neu-Fusionsproteine in pRSETB-SBP

Für den letzten Schritt der Klonierung zur Herstellung der Hsp-HER2/neu-Fusionsproteine wurden die Hitzeschockproteine mHsp70, mHsc70 und mHsp70L1 mit den Restriktionsenzymen XhoI und KpnI bzw. XhoI und NcoI aus dem Klonierungsvektor pBSKS⁺ herausgeschnitten. Die DNA von *m.tub.Hsp70* wurde mit XhoI und NcoI direkt aus pRSETB entnommen (Abb. 8). Der Vektor pRSETB-HER2/neu-SBP wurde mit den entsprechenden Restriktionsenzymen geöffnet, so dass die Hitzeschockproteine C-terminal hinter den His-Tag und vor den N-Terminus des HER2/neu Fragments einkloniert werden konnten. Dabei ergab sich für pRSETB-*m.tub.Hsp70*-HER2 eine Vektorgröße von 4645 bp, für pRSETB mHsp70L1-HER2 5416 bp und für die Vektoren pRSETB-mHsp70-HER2 bzw. pRSETB-mHsc70-HER2 eine Größe von 5810 bzw. 5830 bp.

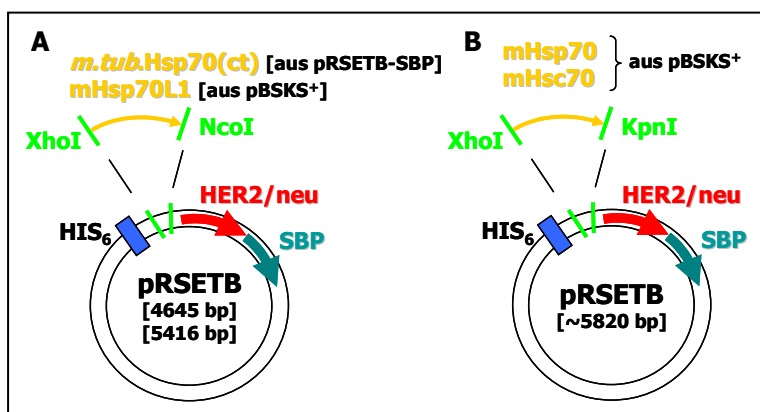


Abbildung 8: Klonierung der Hsp-HER2/neu Fusionsproteine. Die Hsp wurden aus den Vektoren pBSKS⁺ bzw. im Falle von *m.tub.Hsp70* aus pRSETB mit XhoI und NcoI (A) bzw. XhoI und KpnI (B) herausgeschnitten und in den entsprechend geöffneten Vektor pRSETB-HER2/neu-SBP kloniert. Dabei wurden die Hitzeschockproteine zwischen His-Tag HER2/neu-Fragment eingebracht.

6.1.2 Klonierung der Hsp-HER2/neu-SBP-His-Fusionsproteine in pET21d

A) Klonierung des Streptavidin-bindenden Peptids in pET21d

Um die für die Klonierung nötigen Schnittstellen zu erhalten, mussten zunächst Oligonukleotide generiert werden. Mittels einer PCR wurde die cDNA eines leicht verkürzten Streptavidin-bindenden Peptids (SBP) amplifiziert und zusätzliche Restriktionsschnittstellen an den Enden angefügt. Das PCR-Produkt wurde mit SalI und BclI verdaut und in den BamHI und XhoI geöffneten Vektor pET21d eingefügt (Abb. 9). Die Ligation ergab ein Vektor der Größe 5553 bp. Das Streptavidin-bindende Peptid wurde so in den Vektor kloniert, dass es in 5' Richtung vor dem His-Tag liegt.

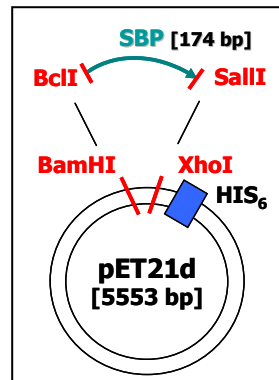


Abbildung 9: Klonierung des SBP in pET21d. Das PCR-Produkt SBP mit den neu generierten Schnittstellen wurde mit SalI und BclI verdaut und über *blunt end* Ligation in den XhoI und BamHI geöffneten Vektor pET21d kloniert. Dabei wurde das SBP N-terminal vor den His-Tag eingebracht.

B) Klonierung der Hitzeschockproteine in pET21d-SBP

Für die Klonierung der Hitzeschockproteine in pET21d wurde die DNA von mHsp70 und mHsc70 aus dem Vektor pBSKS⁺ mit den Restriktionsenzymen XhoI und KpnI herausgeschnitten und in den ebenso geöffneten Vektor pET21d-SBP überführt (Abb. 10A). Dabei ergab sich eine Vektorgöße von 7473 bzw. 7491 bp für pET21d-mHsp70-SBP bzw. pET21d-mHsc70-SBP. Die DNA der beiden anderen Hitzeschockproteine wurde aus dem Vektor pRSETB durch Restriktionsverdau mit XhoI und BamHI in pET21d-SBP kloniert. Nach der Ligation ergab sich für pET21d-*m.tub.*Hsp70-SBP ein Vektor der Größe 6309 bp, für pET21d-mHsp70L1-SBP eine Größe von 7080 bp (Abb. 10B). Die Hitzeschockproteine wurden N-terminal vor das SBP kloniert.

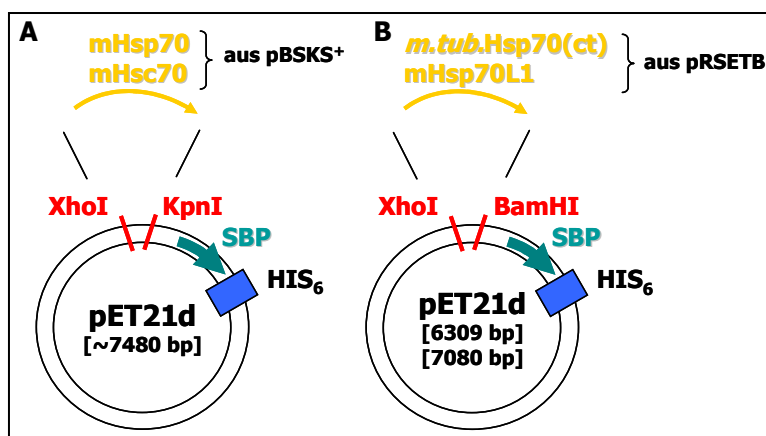


Abbildung 10: Klonierung der Hsp in pET21d-SBP. Die DNA von mHsp70 und mHsc70 wurde aus pBSKS⁺ bzw. mit den Restriktionsenzymen XhoI und KpnI in den Vektor pET21d-SBP überführt (A). *M.tub.*Hsp70 sowie mHsp70L1 konnten durch XhoI und BamHI Verdau von pRSETB in pET21d-SBP kloniert werden (B). Die Hsp wurden jeweils vor den N-Terminus des SBP kloniert.

C) Klonierung des HER2/neu-Fragments in pET21d-SBP

Die Klonierung der humanen HER2/neu DNA in den Vektor pET21d wurde analog zu der Klonierung in pRSETB durchgeführt (6.1.1 D). Wiederum wurde das HER2/neu-Fragment verwendet, das die

beiden CD8⁺ T-Zellepitope KIFGSLAFL und ILHNGAYSL enthält. Nach der *blunt end* Ligation ergab sich eine Vektorgröße von 6402 bp, wobei das HER2/neu-Fragment N-terminal vor SBP kloniert wurde.

D) Klonierung der Hsp-HER2/neu-Fusionsproteine in pET21d-SBP

Für die Herstellung der Hitzeschockfusionsproteine wurde die DNA von mHsp70, mHsc70 und mHsp70L1 aus dem in **6.1.1 B** beschriebenen Vektor pBSKS⁺ entnommen. Dazu wurden im Falle von mHsp70 und mHsc70 die Restriktionsenzyme XhoI und KpnI, für mHsp70L1 XhoI und NcoI verwendet. Der Vektor pET21d-HER2/neu-SBP wurde entsprechend geöffnet, so dass die Hitzeschockproteine N-terminal vor das HER2/neu-Fragment kloniert wurden (Abb. 11A). Dabei wurden Vektoren der Größe 8343 bp für mHsc70, 8322 bp für mHsp70 bzw. 7929 bp für mHsp70L1 erhalten. Um ein Fusionskonstrukt von *m.tub.Hsp70(ct)* klonieren zu können, musste der Vektor pET21d-*m.tub.Hsp70(ct)*-SBP zunächst mit den Enzymen NcoI und Bpu1102I geschnitten werden. Dabei entfiel das Hitzeschockprotein, SBP und der His-Tag. Dieses Fragment wurde durch HER2/neu, SBP und den His-Tag aus dem Vektor pET21d-HER2/neu-SBP durch identischen Restriktionsverdau ersetzt. In einem letzten Schritt wurde *m.tub.Hsp70(ct)* wiederum aus pET21d mit NcoI herausgeschnitten und in den durch vorige Ligation erhaltenen Vektor kloniert (Abb. 11B). Diese Ligation ergab einen Vektor der Größe 7158 bp, wie bei den anderen Hitzeschockproteinen wurde *m.tub.Hsp70(ct)* N-terminal vor das HER2/neu-Fragment kloniert.

Durch die in **6.1.1** und **6.1.2** beschriebenen Klonierungsschritte konnten jeweils vier Hitzeschockfusionsproteine, sowie die einzelnen Hitzeschockproteine bzw. HER2/neu-Proteine mit einem zusätzlichen Streptavidin-bindenden Peptid und einem Histidin-Tag hergestellt werden. Abbildung 12 bietet einen Überblick über den Aufbau der einzelnen Konstrukte und deren Molekülgrößen.

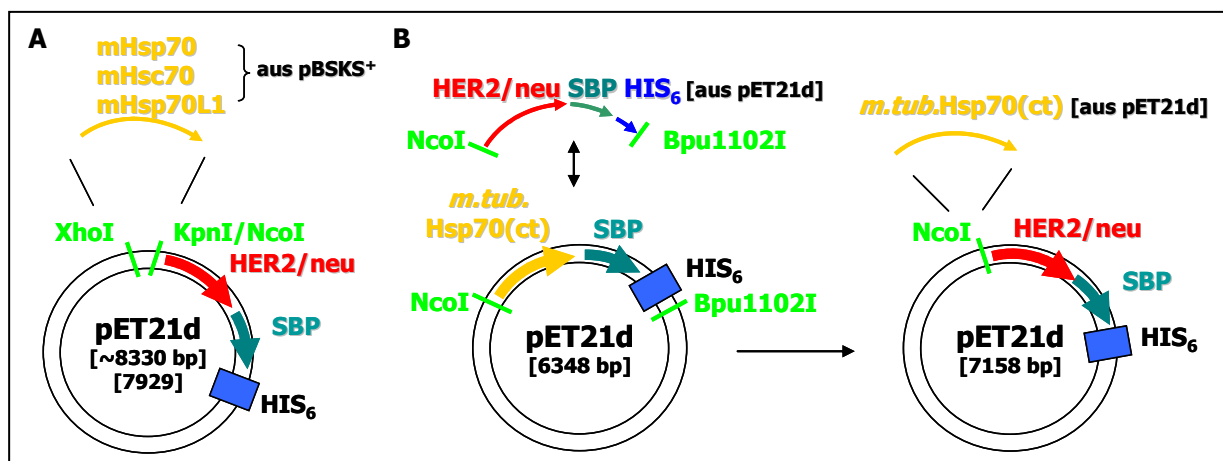


Abbildung 11: Klonierung der Hsp-HER2/neu-Fusionsproteine in pET21d. In den Vektor pET21d-HER2/neu-SBP wurde durch Restriktionsverdau mit XhoI und KpnI die DNA von mHsp70 bzw. mHsc70 eingefügt, was einen Vektor der Größe 8343 bzw. 8322 bp ergab. Die DNA von mHsp70L1 wurde mit den Enzymen XhoI und NcoI eingefügt (7929 bp) (A). Um *m.tub.Hsp70(ct)* an das HER2/neu-Fragment anzufügen, wurde aus pET21d-*m.tub.Hsp70(ct)*-SBP zunächst das Hitzeschockprotein, sowie das SBP und der His-Tag herausgeschnitten und gegen HER2/neu-SBP-His ersetzt. In diesen Vektor wurde durch Verdau mit NcoI *m.tub.Hsp70(ct)* N-terminal vor HER2/neu wieder eingefügt, was eine Vektorgröße von 7158 bp ergab (B).

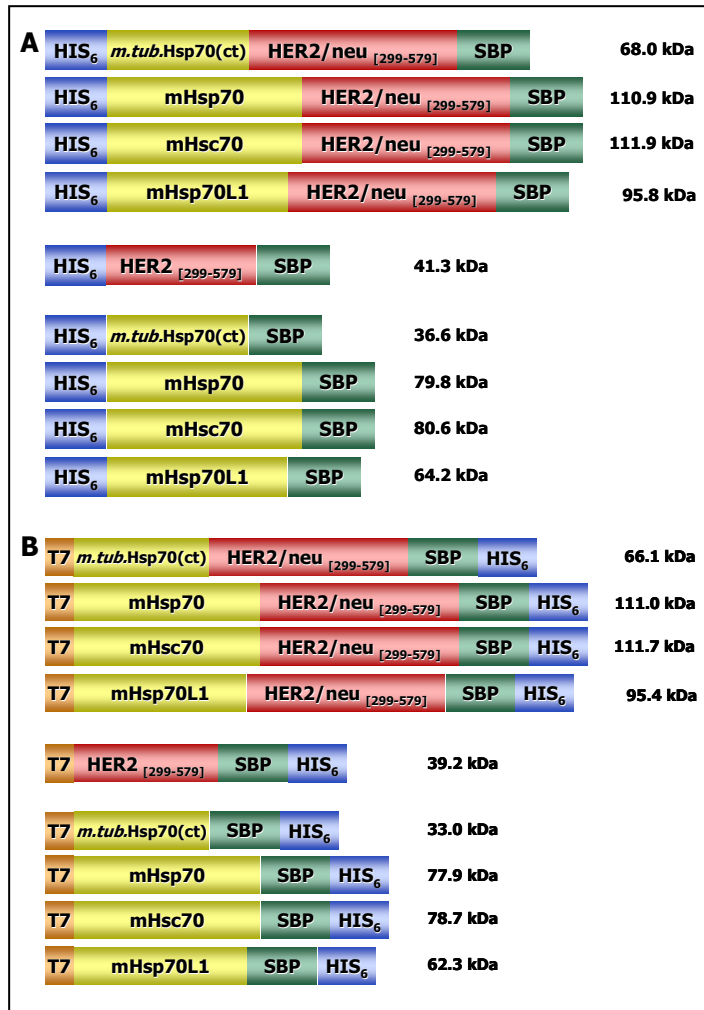


Abbildung 12: Schematische Darstellung der Hsp-HER2/neu₂₉₉₋₅₇₉-Fusionsproteine mit HLA-A2-Epitopen. Im Expressionsvektor pRSETB liegen die einzelnen Fragmente in folgender Reihenfolge vor: am N-Terminus beginnt das Protein mit dem His-Tag, gefolgt von den einzelnen Hitzeschockproteinen und einem Fragment von HER2/neu. Den Abschluss bildet hier das Streptavidin-bindende Peptid am C-Terminus (A). Im Vektor pET21d ist die Abfolge von Hsp, HER2/neu und SBP analog. Im Gegensatz zu pRSETB liegt der His-Tag hier C-terminal vom SBP. N-Terminus vom Hsp liegt ein T7-Tag, der durch den pET21d-Vektor vorgegeben wird (B).

6.1.3 Klonierung der Hsp-HER2/neu-SBP-His-Fusionsproteine mit K^d-Epitopen

Parallel zu HDDII-Mäusen sollten die Hitzeschockfusionsproteine auch in Wildtyp BALB/c-Mäusen eingesetzt werden. Bei diesen Konstrukten musste beachtet werden, dass die Antigenerkennung hier über das MHC-Klasse-I-Molekül H-2K^d stattfindet. Aufgrund dessen konnten für die Immunisierungen von BALB/c-Mäusen nicht die in 6.1.1 und 6.1.2 beschriebenen Hsp-HER2/neu-Fusionsproteine eingesetzt werden. Stattdessen wurden Proteine hergestellt, die verschiedene K^d-restringierte CD8⁺ Epitope enthalten. Für ein erstes Set an Proteinen wurden die beiden Epitope TYLPTNASL₆₃₋₇₁ und PYVSRLGI₇₈₀₋₇₈₈ gewählt, die in der DNA Sequenz ungefähr 2100 Basenpaare auseinander liegen. Da ein Fusionsprotein, das ein HER2/neu-Fragment mit beiden Epitopen enthält, sicherlich zu groß für eine Expression in *E. coli* gewesen wäre, wurden als HER2/neu-Antigenanteil lediglich die beiden CD8⁺ Epitope TYLPTNASL₆₃₋₇₁ und PYVSRLGI₇₈₀₋₇₈₈ in Reihe kloniert, so dass ein Tandemepitop (TE) entstand (HER2/neu_{TE}, Abb. 13A). In einem zweiten Set an Fusionsproteinen wurde wiederum das CD8⁺ Epitop TYLPTNASL₆₃₋₇₁ als Antigen verwendet. Hier sollte das Epitop aber im Proteinkontext belassen werden. Somit wurde ein 110 Aminosäure großes HER2/neu-Fragment gewählt (HER2/neu₂₆₋

¹³⁶, Abb. 13B), welches das CD8⁺ Epitop TYLPTNASL₆₃₋₇₁ enthält. Zusätzlich zu diesen Fusionsproteinen wurde ein weiteres HER2/neu Protein (HER2/neu₁₋₁₃₆) hergestellt, das außer TYLPTNASL noch ein weiteres CD8⁺ Epitop (ALCRWGGLL₅₋₁₃) und ein CD4⁺T-Helferepitop enthält (LLPPGAASTQVCTGTD₁₅₋₃₀, Abb. 13B). Aus klonierungstechnischen Gründen konnten an HER2/neu₁₋₁₃₆ keine Hitzeschockproteine fusioniert werden. In einem weiteren Set wurde zusätzlich ein N-terminales zellpenetrierendes Peptid aus dem HIV-tat-Protein an die Hsp-HER2/neu₂₆₋₁₃₆-Fusionsproteine angefügt, das eine verbesserte Proteinaufnahme ermöglichen sollte (Abb. 13C). Die Fusionsproteine entsprechen vom Aufbau her den in **6.1.2** beschriebenen Konstrukten. Sie wurden in den Expressionsvektor pET21d kloniert und enthalten jeweils eines der vier verschiedenen Hitzeschockproteine, gefolgt von entweder dem Tandemkonstrukt aus den beiden CD8⁺ Epitopen oder der beschriebenen HER2/neu-Sequenz. Am C-Terminus enden die Proteine mit dem Streptavidinbindenden Peptid und Hexa-Histidin-Tag. Abbildung 13 veranschaulicht den Aufbau der Hsp-HER2/neu-[K^d]-Fusionsproteine. Die Klonierungen wurden von PD Dr. Frank Momburg durchgeführt.

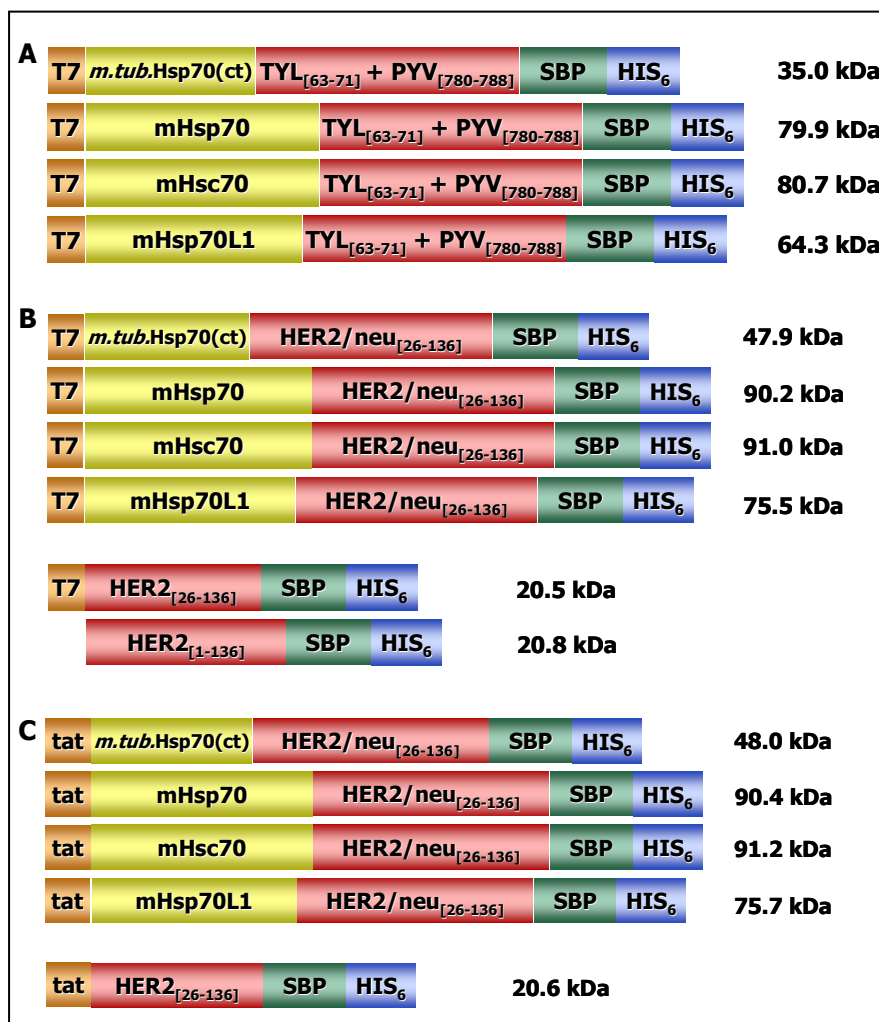


Abbildung 13: Schematische Darstellung der Hsp-HER2/neu-Fusionsproteine mit K^d-Epitopen. Für das BALB/c-System wurden drei Gruppen an Fusionsproteinen konstruiert: Im ersten Set sind die verschiedenen Hsp mit zwei K^d-restringierten CD8⁺ T-Zellepitopen (TYLPTNASL, PYVSRGLLI) fusioniert (A). Das zweite Set enthält das Epitop TYLPTNASL im DNA Kontext (HER2/neu₂₆₋₁₃₆). Zum Vergleich wurden zwei HER2/neu-Proteine mit unterschiedlicher Länge hergestellt (B). Als drittes Set an Proteinen wurde an die Hsp-HER2/neu₂₆₋₁₃₆ eine N-terminale Translokationssequenz (tat) angehängt (C). Alle Konstrukte wurden in den Expressionsvektor pET21d kloniert und enthalten am C-Terminus SBP und einen His-Tag.

6.1.4 Klonierung der Fusionsproteine zur Expression in Eukaryonten

Eine Expression in *E. coli* bringt zwar generell hohe Ausbeuten der rekombinanten Proteine, hat aber den Nachteil, dass diese mit bakteriellem Lipopolysacchrid (LPS) verunreinigt sind. Für Immunisierungen in Mäusen muss das hergestellte Protein aber unbedingt frei von LPS sein, bzw. darf nur geringe Spuren enthalten, da sonst LPS-induzierte Immunantworten ausgelöst werden und keine klaren

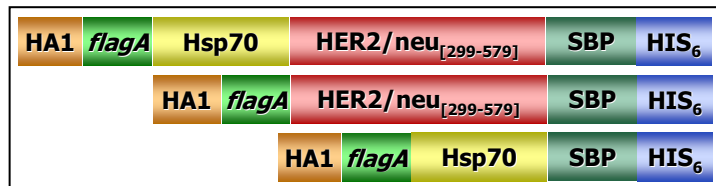


Abbildung 14: Schematische Darstellung der Hsp-HER2/neu für die Expression in SF9 und HEK293T.

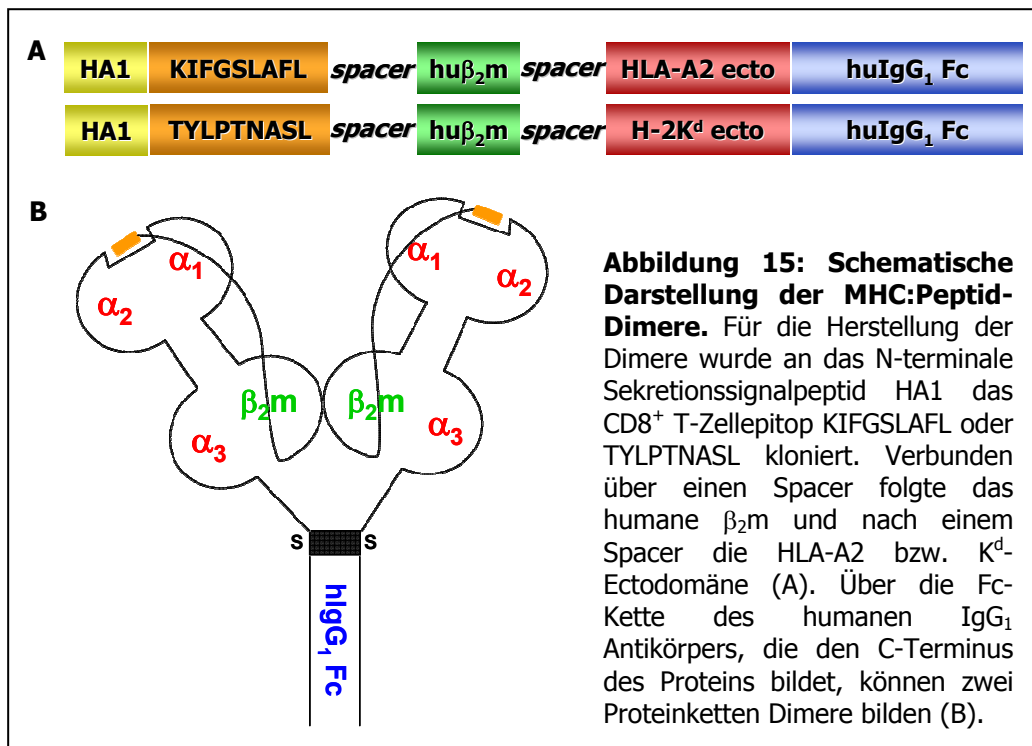
Für das eukaryontische Expressionssystem wurden Fusionsproteine generiert, die am N-Terminus ein Sekretionssignalpeptid des Influenza Virus (HA1) enthalten, gefolgt von einem *flagA*-Tag. Darauf folgen die verschiedenen Hitzeschockproteine und das HER2/neu₂₉₉₋₅₇₉-Fragment. Am C-Terminus enden die Proteine wiederum mit SBP und His-Tag.

Aussagen mehr über die Immunogenität der Fusionsproteine getroffen werden können. Daher sollten die Hsp-HER2/neu-Fusionsproteine nicht nur in *E. coli* exprimiert werden, sondern parallel auch in zwei eukaryontischen Expressionssystemen, den HEK293T-Zellen und den Insektenzellen *Spodoptera frugiperda* (SF9). Der Vorteil ist hier, dass die produzierten Proteine keine Verunreinigungen durch bakterielles Lipopolysacchrid (LPS) aufweisen. Daher wurde die DNA der einzelnen Fusionsproteinteile für die Expression in HEK293T-Zellen in den Vektor pMT2mcs kloniert bzw. für die Herstellung in SF9 in den Baculovirus Transfervektor pVL1393 unter Kontrolle des Polyhedrin-Promotors kloniert. Dabei wurde die grundsätzliche Struktur der Fusionsproteine mit C-terminalem SBP und His-Tag beibehalten. Zusätzlich wurde am N-Terminus ein ER-Signalpeptid aus dem Hämagglutinin des Influenza Virus (HA1) angefügt, das die spätere Sekretion der exprimierten Proteine in das extrazelluläre Medium ermöglicht. Für eine Detektion der Proteine befindet sich C-terminal des Signalpeptids ein *flagA*-Tag. Abbildung 14 veranschaulicht den Aufbau der Fusionsproteine. Die Klonierungen wurden von PD Dr. Frank Momburg durchgeführt.

6.1.5 Klonierung der MHC:Peptid-Dimere

Für die Detektion der HER2/neu-spezifischen T-Zellen wurden sogenannte MHC:Peptid-Dimere hergestellt. Diese Moleküle werden aus zwei Einzelproteinen gebildet, die aus einem MHC-Klasse-I/ β_2 m-Dimer mit fusioniertem Peptid und einem humanen IgG₁-Fc-Fragment bestehen. Nach der Expression in HEK293T-Zellen können beide Proteine über Schwefelbrücken zwischen den Ketten des Fc-Teils dimerisieren. Die Konstrukte der Dimerketten, die PD Dr. Frank Momburg herstellte, wurden in den Vektor pMT2mcs kloniert und enthalten am N-Terminus das Sekretionssignalpeptid des Influenza Virus (HA1), gefolgt von einem HLA-A2 bzw. K^d-restringierten CD8⁺ Epitop (KIFGSLAFL oder TYLPTNASL). Dieses Peptid ist über einen Spacer mit der cDNA des humanen β_2 -Mikroglobulin (β_2 m) verbunden, worauf wiederum nach einem Spacer die Domänen α_1 , α_2 und α_3 der schweren Kette des MHC-Klasse-I Moleküls folgen (HLA-A2 bzw. K^d). Den C-terminalen Abschluss des Konstrukts bildet

das Fc-Fragment des humanen IgG₁ Antikörpers. In Abbildung 15 ist der Aufbau der Dimere dargestellt.



Abschnitt 6.1 stellt den Aufbau der verschiedenen Fusionsproteine dar, die aus den vier Hitzeschockproteinen *m.tub.Hsp70*, *mHsp70*, *mHsc70* und *mHsp70L1* und dem Tumorantigen HER2/neu generiert wurden. Zur späteren Proteinaufreinigung dient ein N- bzw. C-terminaler Hexa-Histidin-Tag. Es wurden Fusionsproteine mit unterschiedlich MHC-restringierten CD8⁺ T-Zellepitopen konstruiert, die im Mausmodell HHD oder BALB/c eingesetzt werden können. Weiterhin wurden die Konstrukte für eine Expression in *E. coli* bzw. in eukaryontischen Insektenzellen SF9 in die entsprechenden Vektoren kloniert. Zusätzlich zu den Hitzeschockfusionsproteinen wurden MHC:HER2/neu-Peptid-Dimere generiert, die eine Detektion der HER2/neu-spezifischen T-Zellen ermöglichen sollen.

6.2 Expression der Hsp-HER2/neu-Fusionsproteine

6.2.1 Testexpression in BL21(DE3)pLysS

Für die Herstellung der Fusionsproteine in *E. coli* sollte zunächst in einem kleinen Kulturansatz die Expression überprüft werden. Dabei stellte sich die Frage, ob das eukaryontische Protein in Bakterien überhaupt exprimierbar ist bzw. ob es ausgeschleust wird oder intrazellulär vorliegt. Es wurde der Bakterienstamm BL21(DE3)pLysS gewählt, der für die Expression T7-regulierter Gene optimiert wurde. Die Expressionsvektoren pRSETB und pET21d besitzen 3' des T7 Promotors ein lac-Operator Element,

das die Regulation der Genexpression ermöglicht. Im nicht-induzierten Zustand bindet ein Repressor an die DNA im Bereich des Promotors und Operators, so dass eine Bindung der Polymerase und somit eine Genexpression verhindert wird. Erst nach der Zugabe des Induktors IPTG, welcher an den Repressor bindet, fällt dieser ab und gibt den Promotor für die T7 RNA Polymerase frei, so dass die Transkription erfolgen kann. Die Expression der T7 RNA Polymerase wird ebenfalls durch IPTG induziert, wodurch die Bildung des rekombinanten Proteins normalerweise streng reguliert wird. Das T7 Lysozym, das über einen zusätzlichen Chloramphenicol resistenten Vektor (pLysS) im Bakterium kodiert wird, bindet an die T7 RNA Polymerase und blockiert somit die Transkription des Zielmoleküls im nicht-induzierten Zustand (Mofatt und Studier, 1987). Um nun die Expression in BL21 zu überprüfen, wurde ein Klon der transformierten Bakterien im kleinen Maßstab kultiviert und ab dem Zeitpunkt der Induktion stündlich eine Probe zur Untersuchung der Genexpression entnommen. Der Zellaufschluß erfolgte mechanisch mittels mehrerer Einfrier- und Auftauzyklen, wobei auch hier wieder das bakterielle T7 Lysozym eine Rolle spielt, welches eine spezifische Bindung in der Peptidoglykanschicht der Bakterienzellwand zerstört und somit die Zellyse erleichtert (Inouye *et al.*, 1973). Eine Färbung der Proteine mit Streptavidin-Peroxidase ließ die spezifische Detektion der rekombinanten Fusionsproteine über deren Streptavidin-bindendes Peptid (SBP) zu. Bei allen getesteten Bakterienklonen zeigte sich, dass die Proteine vorrangig intrazellulär, also im Bakterienpellet zu finden sind und nur sehr schwach im Zellüberstand detektiert werden können. Dies deutet auf eine Aggregation der rekombinanten Proteine und der Bildung von *Inclusion Bodies* hin, was für die spätere Aufreinigung berücksichtigt werden musste. Die Proteindetektion zum Zeitpunkt der IPTG Zugabe („0h“) zeigte, dass auch im nicht-induzierten Zustand eine konstitutive

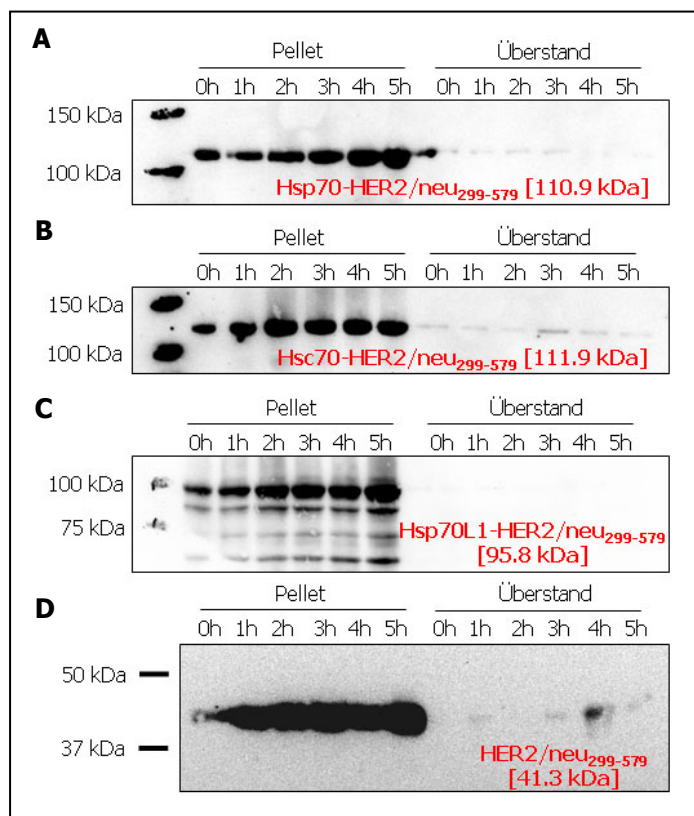


Abbildung 16: Testexpression der His-Hsp-HER2/neu₂₉₉₋₅₇₉-SBP-Fusionsproteine in BL21(E3)pLysS. Die Proteine Hsp70-HER2/neu₂₉₉₋₅₇₉ (A), Hsc70-HER2/neu₂₉₉₋₅₇₉ (B), Hsp70L1-HER2/neu₂₉₉₋₅₇₉ (C) und HER2/neu₂₉₉₋₅₇₉ (D) konnten in den Bakterien BL21 exprimiert werden. Dabei zeigte sich, dass die Geninduktion eine maximale Proteinexpression nach 4 bis 5 Stunden bewirkt und die Proteine vorrangig intrazellulär akkumulieren.

Proteinexpression vorlag, die aber durch eine Induktion deutlich gesteigert werden konnte (Abb. 16). Nach 4 bis 5 Stunden wurde ein Plateau erreicht und die Proteinmenge stieg nicht mehr weiter an.

Anhand dieser Vorversuche konnte eine Proteinexpression in BL21 etabliert werden, die eine Induktion der Genexpression für 4 bis 5 Stunden vorsah. Das Protein wurde nicht in das Kulturmedium sezerniert, war daher unlöslich und musste speziell aufgereinigt werden.

6.2.2 Aufreinigung der His-Hsp-HER2/neu-SBP-Fusionsproteine

Die Fusionierung des Hexa-Histidin-Tags und des Streptavidin-bindenden Peptids (SBP) an die Hsp-HER2/neu Proteine sollte nicht nur eine spezifische Detektion ermöglichen, sondern auch eine Aufreinigung der rekombinanten Proteine über diese Tags erlauben. Die Strategie sah vor, die Proteine über den His-Tag mittels Nickel-Affinitätschromatographie spezifisch zu binden. Der N-terminale His-Tag ermöglicht über den Imidazolring des Histidins die Bindung an die reaktiven Gruppen des Trägermaterials, während Fremdproteine, die keine Affinität zu Nickel besitzen, ausgewaschen werden. Durch Imidazol können die spezifisch gebundenen rekombinanten Proteine eluiert werden. Um eine Aufreinigung der Fusionsproteine zu erzielen, mussten zunächst einige Parameter definiert werden. Aufbauend auf die Daten der Testexpression (6.2.1) wurde die Genexpression für vier Stunden induziert, ehe die Kultur geerntet und das Bakterienpellet für die Proteinaufreinigung lysiert wurde. Um die Zellen optimal aufzuschließen, wurde nicht nur die mechanische Lyse durch wiederholtes Einfrieren und Auftauen angewandt, sondern eine enzymatische Lyse mittels Lysozym mit dem mechanischen Zellaufschluss per Ultraschall kombiniert. Ein Vergleich der Ausbeuten machte deutlich, dass durch diese Methode wesentlich höhere Mengen des gewünschten Proteins erzielt werden konnten (nicht gezeigt). In den Vorexperimenten wurde

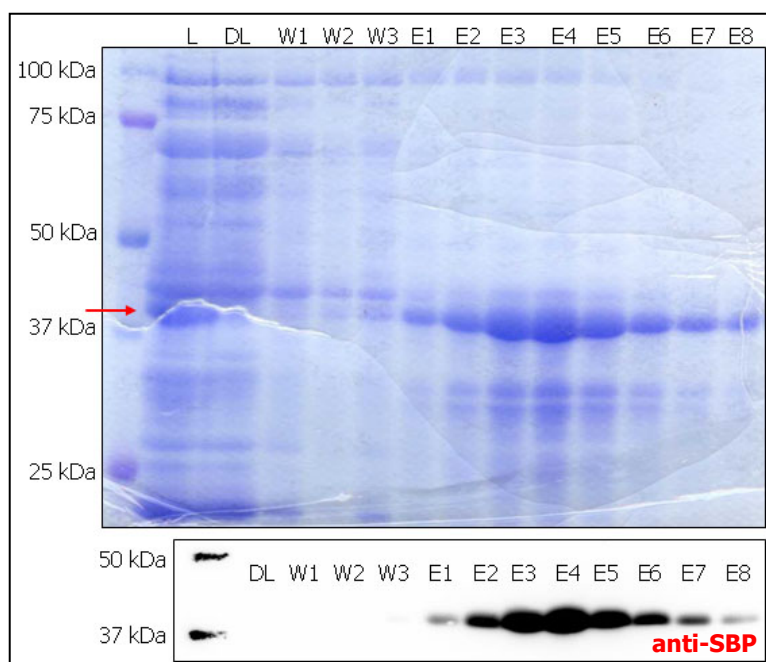


Abbildung 17: Etablierung der Aufreinigung mittels Nickel-Affinitätschromatographie.

Anhand des Proteins HER2/neu₂₉₉₋₅₇₉ wurde das Aufreinigungsprotokoll optimiert. Der Vergleich des Lysats (L) mit dem Durchlauf (DL) im Coomassie-Gel zeigte, dass einige der bakteriellen Proteine nicht an die Säule binden, sondern direkt abgetrennt werden. Durch mehrere Waschschritte konnten weitere Proteine ausgewaschen werden (W1-3). In den Elutionsfraktionen (E1-8) wurde hauptsächlich HER2/neu [41.3 kDa] eluiert, das im Western Blot mittels Peroxidase-gekoppeltem Streptavidin spezifisch detektiert werden konnte.

festgestellt, dass die Proteine intrazellulär als *Inclusion Bodies* aggregierten. Um diese nun aufzuschließen und die Proteine für die Affinitätschromatographie in den löslichen Zustand zu überführen, wurden denaturierende Aufreinigungsbedingungen gewählt und sowohl der Lyse- als auch die Waschpuffer enthielten 8 M Harnstoff, der für seine denaturierenden Eigenschaften bekannt ist. Es war davon auszugehen, dass auch bakterielle Proteine unspezifisch bzw. über den Imidazolring einzelner Histidine an die Nickelsäule binden würden. Daher musste der Waschpuffer soweit optimiert werden, dass möglichst viele dieser Kontaminationen ausgewaschen wurden und die gewünschten Proteine mit hoher Reinheit eluiert werden konnten. So enthielt der Waschpuffer geringe Konzentrationen an Imidazol, sowie die Detergenzien Triton X-114 und Tween20 und eine leicht erhöhte Salzkonzentration. Des Weiteren wurde bei pH 6.3 gewaschen, was ebenfalls die Stringenz erhöhte und für ein Auswaschen der Fremdproteine sorgte. Zur Renaturierung der an die Säule gebundenen Proteine diente ein Salzpuffer mit einem pH von 8.0. Die Elution der Fusionsproteine konnte mit einer Imidazolkonzentration von 200 mM erreicht werden. Die Fraktionen nach der Aufreinigung sind in Abbildung 17 exemplarisch für HER2/neu₂₉₉₋₅₇₉ dargestellt. Während im Lysat (L) das rekombinante Protein bei der erwarteten Größe von 41.3 kDa zu detektieren war, zeigte der Durchlauf (DL) bereits eine deutliche Abschwächung dieser Bande, was darauf hindeutet, dass das Protein HER2/neu an die Säule gebunden hatte. In den Waschfraktionen W1 bis W3 konnten bakterielle Fremdproteine ausgewaschen werden, so dass in den Elutionsfraktionen hauptsächlich das rekombinante Protein zu finden war, das durch Peroxidase-gekoppeltes Streptavidin spezifisch detektiert werden konnte. Allerdings wurden auch andere, vorrangig kleinere Proteine, eluiert und verunreinigten die Probe. Diese Beobachtungen konnten auch bei der Aufreinigung der restlichen Fusionsproteine gemacht werden (Abb. 21, linke Spalte). Alle Konstrukte konnten mittels Nickel-Affinitätschromatographie aus dem Bakterienlysat aufgereinigt werden (nicht gezeigt für His-*m.tub*.Hsp70(ct)-SBP), wobei densitometrische Untersuchungen ergaben, dass jeweils eine Reinheit von 20-60 % vorlag (nicht gezeigt). Die Verunreinigungen waren vom Molekulargewicht meist kleiner als die rekombinanten Proteine und konnten im Western Blot durch Peroxidase-gekoppeltes Streptavidin nicht nachgewiesen werden. Daher wurde vermutet, dass es sich um C-terminale Abbauprodukte bzw. Translationsabbrucher handelte. Um dies zu prüfen, wurden Elutionsfraktionen im Western Blot parallel auf Histidin- bzw. Streptavidin-spezifische Abbauprodukte getestet. In Abbildung 18 wird deutlich, dass über den

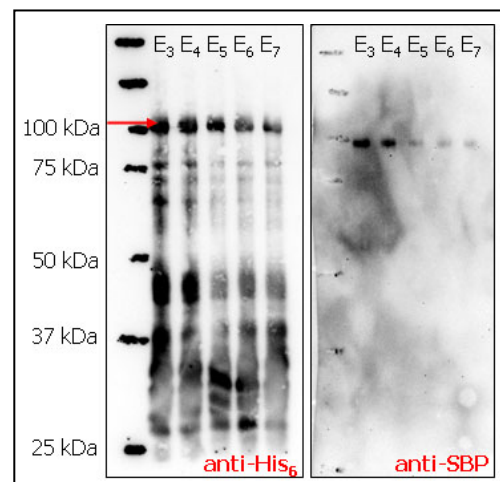


Abbildung 18: Überprüfung der Eluate nach N- bzw. C-terminalen Abbauprodukten. Anhand des Proteins Hsp70L1-HER2/neu₂₉₉₋₅₇₉ [95.8 kDa] wurden die nach der Nickel-Affinitätschromatographie erhaltenen Eluate im Western Blot über den His-Tag bzw. SBP angefärbt. Die Detektion des His-Tags zeigte neben dem rekombinanten Protein viele weitere Fragmente, während sich über SBP ausschließlich Hsp70L1-HER2/neu₂₉₉₋₅₇₉ anfärben ließ.

Um die Stringenz der Bindung an die Nickelsäule weiter zu erhöhen und damit eine bessere Reinheit der Proteine im ersten Aufreinigungsschritt zu erzielen, wurde der Waschpuffer mit Glycerin versetzt, die Salzkonzentration erhöht und die Imidazolmenge variiert. Zusätzlich wurde der Elutionspuffer mit Proteaseinhibitoren versetzt, damit die Proteindegradation während der Aufreinigung minimiert werden konnte. Außerdem wurde statt BL21(DE3)pLysS der Bakterienstamm BL21Star(DE3)pLysS zur Proteinexpression eingesetzt, in dem durch eine Mutation im *rne* Gen eine erhöhte mRNA Stabilität gewährleistet ist und somit eine vollständige Translation der Proteine erreicht werden soll. Jedoch führten alle diese Maßnahmen nicht zur erhofften Verbesserung der Proteinreinheit.

Die Aufreinigung der Fusionsproteine mit N-terminalem His-Tag konnten demnach mittels Affinitätschromatographie angereichert werden, die Eluate enthielten aber stets C-terminale Abbauprodukte, die weder durch zusätzliche Aufreinigungsverfahren, noch durch eine Verminderung der Proteindegradation oder eine stringenteren Reinigung entfernt werden konnten.

6.2.3 Aufreinigung der Hsp-HER2/neu-SBP-His-Proteine über Nickel-Affinitätschromatographie

Parallel zu den Hitzeschockfusionsproteinen mit N-terminalem Hexa-Histidin-Tag waren auch Konstrukte hergestellt worden, die den His-Tag am C-Terminus enthielten (6.1.2). Wie in 6.2.2 gezeigt, lieferte die Aufreinigung der Proteine mit N-terminalem Histidin aufgrund vieler C-terminaler Abbauprodukte bzw. unvollständig translatierter Proteinfragmente nur eine unzureichende Reinheit der rekombinanten Proteine. Ein Positionswechsel des His-Tags sollte dies entscheidend verbessern, da über ein C-terminales Histidin nur noch vollständig translatierte Moleküle und N-terminale Abbauprodukte aufgereinigt werden. Analog zu 6.2.2 wurden die transformierten Bakterien BL21 zur Proteinexpression für vier Stunden induziert und nach der Ernte mittels Ultraschall aufgeschlossen. Die Proteine Hsp70, Hsc70 und Hsp70L1 wurden im Bakterienlysat und im Durchlauf nach der Affinitätschromatographie auf N- bzw. C-terminale Proteinfragmente untersucht (Abb. 20). Dabei diente am C-Terminus der His-Tag und am N-Terminus ein vom Vektor pET21d vorgegebener T7-Tag zur Detektion. Die α T7-Färbung ergab mehrere Proteinbanden im Western Blot, was

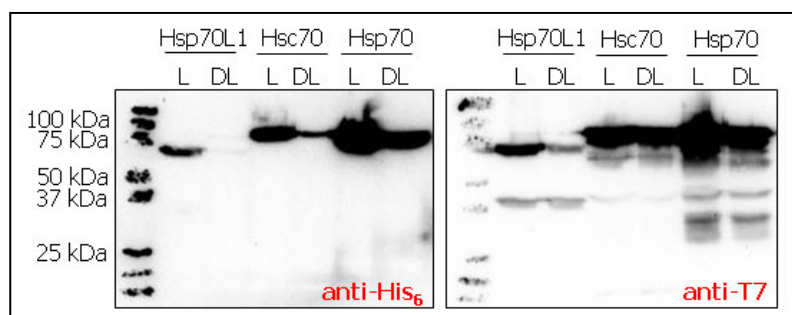


Abbildung 20: Überprüfung der Lysate von Hsp-SBP-His-Fusionsproteinen nach N- bzw. C-terminalen Abbauprodukten. Die Bakterienlysate und Durchläufe nach der Nickel-Affinitätschromatographie der Proteine Hsp70 [77.9 kDa], Hsc70 [78.7 kDa] und Hsp70L1 [62.3 kDa] wurden im Western Blot über den N-terminalen T7-Tag bzw. das C-terminale SBP angefärbt. Die Detektion des T7-Tags zeigte neben den rekombinanten Proteinen einige weitere Fragmente, während sich über den His-Tag ausschließlich das jeweilige Hitzeschockprotein anfärben ließ.

wiederum auf C-terminale Abbauprodukte und Translationsabbrécher schließen lässt. Über den His-Tag dagegen wurde in allen getesteten Konstrukten nur eine Proteinbande detektiert, welche der Größe des jeweiligen rekombinanten Proteins entsprach. Um zusätzlich die Möglichkeit der unvollständigen Translation zu minimieren, wurde statt BL21 der Bakterienstamm Rosetta(DE3) zur Proteinexpression eingesetzt. Dieses Bakterium enthält auf einem weiteren Chloramphenicol-resistenten Plasmid die Gene für verschiedenen tRNAs, die in Prokaryonten selten verwendet werden. Da hier eukaryontische Proteine in *E. coli* exprimiert werden sollten und diese Proteine einige der in *E. coli* seltenen Codons enthalten, könnte dies die Ursache für eine unvollständige Translation sein.

Die Gegenüberstellung der Eluate der einzelnen Fusionsproteine mit N- bzw. C-terminalem His-Tag in Abbildung 21 zeigt, dass durch die Klonierung des Hexa-Histidin-Tags an den C-Terminus der Proteine die Reinheit nach der Nickel-Affinitätschromatographie deutlich erhöht werden konnte. Die Zahl der kontaminierenden Proteinbanden war in den Eluatén der Fusionsproteine mit C-terminalem Histidin stark reduziert. Densitometrische Messungen dieser Proteine ergaben Reinheiten von durchschnittlich 70 bis 90 %. Die Ausbeuten lagen je nach Protein zwischen 0.2 und 1 mg/ml, wobei generell höhere Mengen bei den kleineren Fusionsproteinen erhalten wurden.

Das Protein His-*m.tub*.Hsp70(ct)-SBP konnte zwar exprimiert werden, jedoch gelang es nicht, es analog zu den anderen rekombinanten Proteinen zu eluieren. Grund dafür war eine niedrigere Affinität des Proteins zur Nickelsäule. Im Gegensatz zu den anderen Fusionsproteinen wurde *m.tub*.Hsp70(ct)

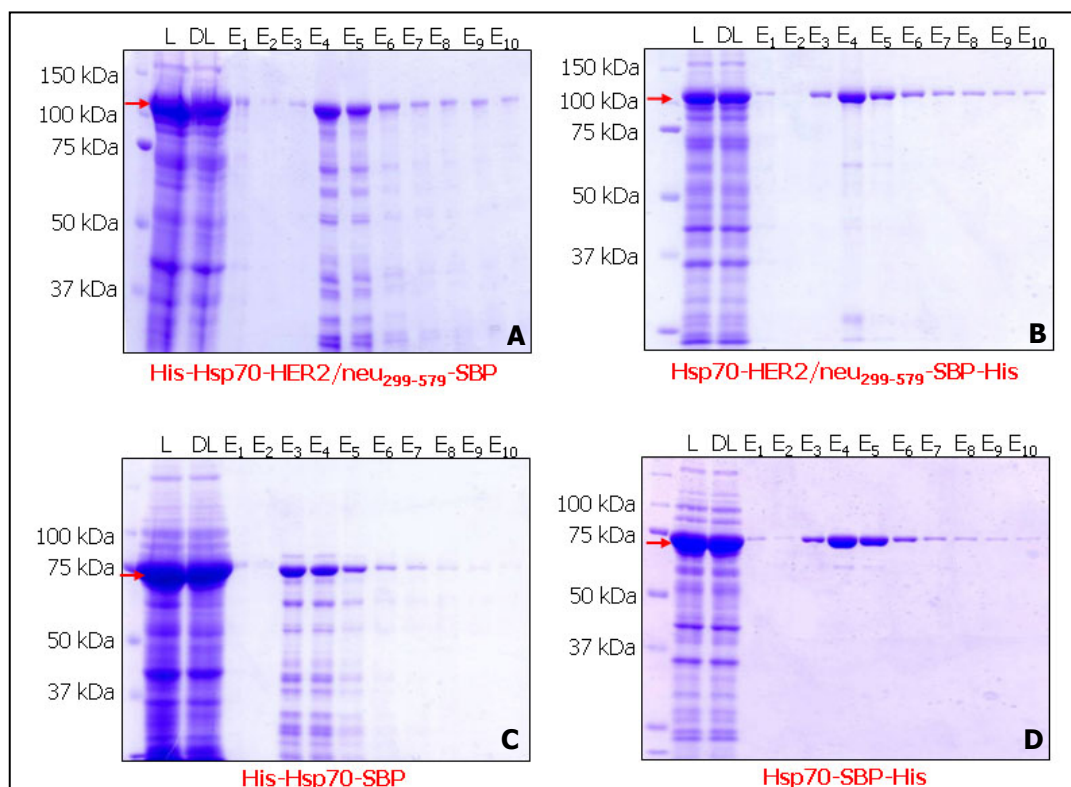


Abbildung 21.1: Vergleich der Reinheit der Hsp70-HER2/*neu*₂₉₉₋₅₇₉-Fusionsproteine mit N- bzw. C-terminalem His-Tag. In den Elutionsfraktionen von Hsp70-HER2/*neu*₂₉₉₋₅₇₉-SBP-*His* (B) bzw. Hsp70-SBP-*His* (D) sind deutlich weniger Fremdproteine zu detektieren, als in den entsprechenden Konstrukten mit N-terminalem Histidin (A und C).

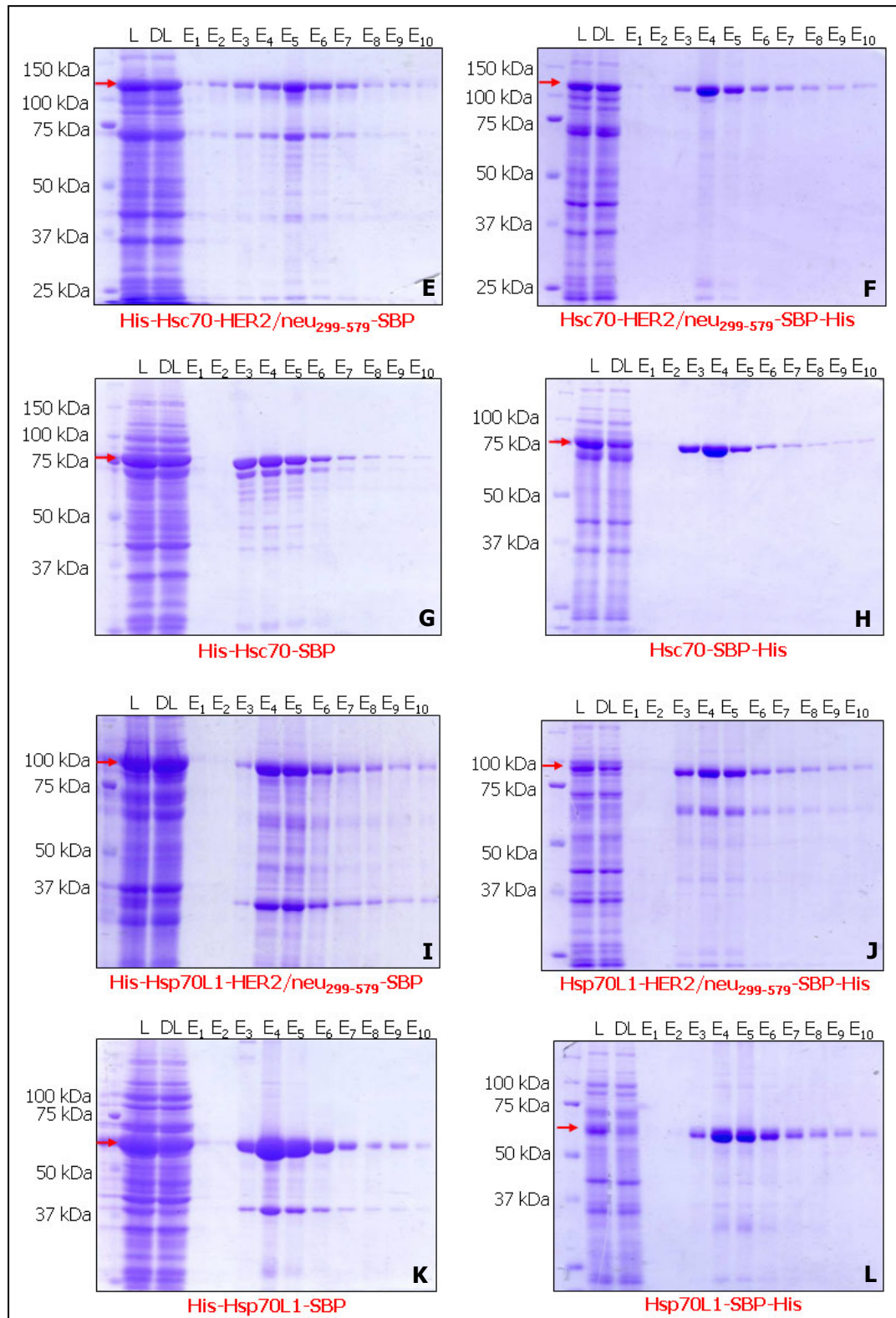
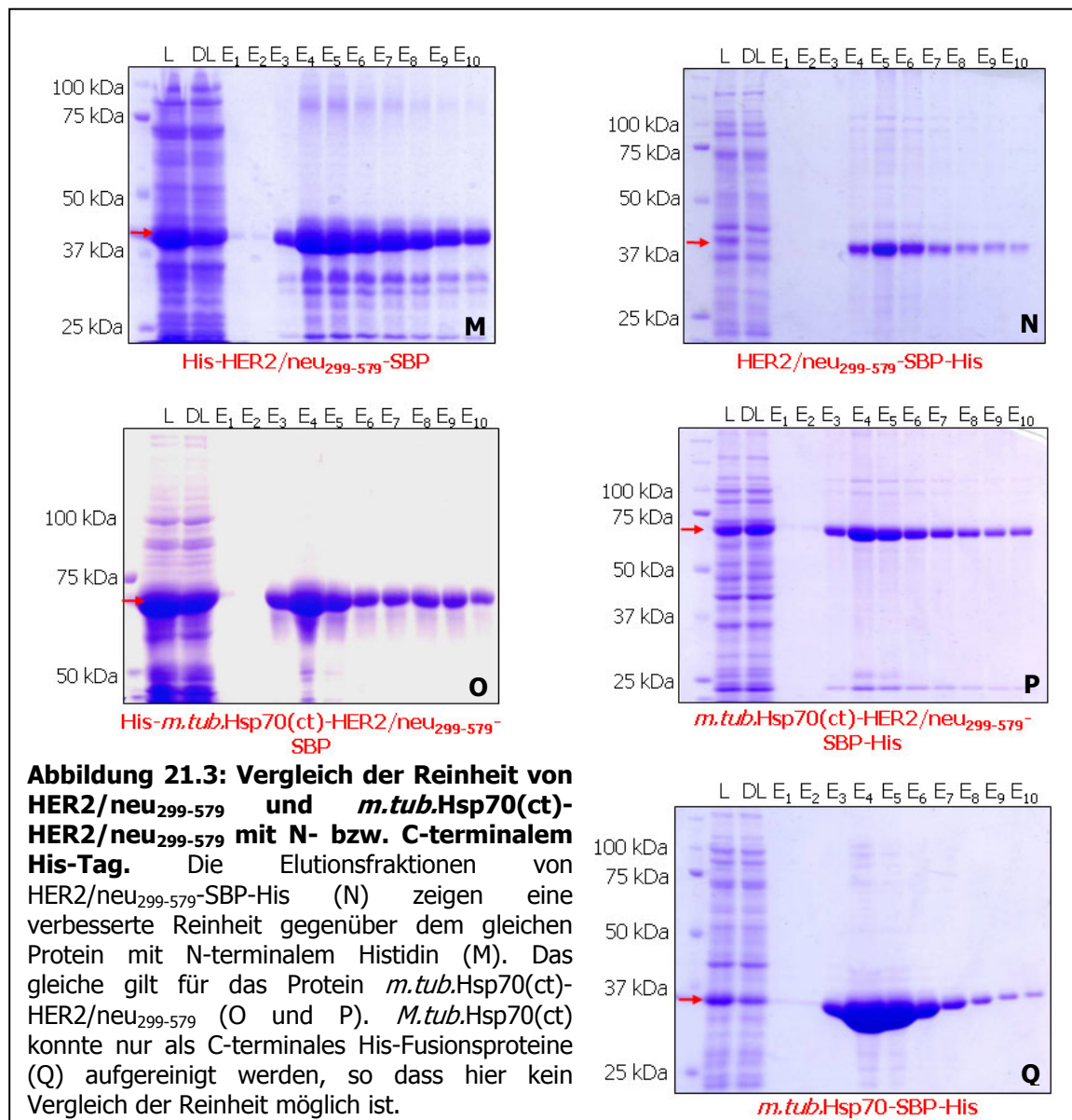


Abbildung 21.2: Vergleich der Reinheit der Hsc70- und Hsp70L1-HER2/neu₂₉₉₋₅₇₉-Fusionsproteine mit N- bzw. C-terminalem His-Tag. Nach der Nickel-Affinitätschromatographie zeigen die Proteine Hsc70-HER2/neu₂₉₉₋₅₇₉-SBP-His (F) und Hsp70L1-HER2/neu₂₉₉₋₅₇₉-SBP-His (J) bzw. die einzelnen Hitzeschockproteine Hsc70-SBP-His (H) und Hsp70L1-SBP-His (L) deutlich weniger Fremdproteine in den Eluaten als die entsprechenden Konstrukte mit N-terminalem Histidin (E, G, I und K).



durch niedrige Imidazolkonzentrationen im Waschpuffer bereits ausgewaschen. Erst bei der Aufreinigung der Proteine aus den Bakterien Rosetta(DE3) konnte das spezifische Aufreinigungsprotokoll für *m.tub.Hsp70(ct)* etabliert werden, so dass Abbildung 21 auch nur das Fusionsprotein mit C-terminalem His-Tag zeigt.

Der Positionswechsel des Histidin-Tags vom N- an das C-terminale Ende der rekombinanten Proteine ermöglichte eine deutliche Verbesserung der Proteinreinheit von 20 bis 60 % auf 70 bis 90 %. C-terminale Abbauprodukte bzw. unvollständig translatierte Moleküle konnten durch die C-terminale Position des His-Tags angereichert werden. Daher wurden auch die für das BALB/c-Mausmodell benötigten Hsp-HER2/neu-Fusionsproteine mit den K^d-Epitopen mit ausschließlich C-terminalem Histidin hergestellt und analog mittels Nickel-Affinitätschromatographie aufgereinigt. Die Reinheit dieser Proteine lag wiederum bei durchschnittlich 80 % (Daten nicht gezeigt). Die Proteinausbeuten lagen je nach Molekül zwischen 0.2 und 1 mg/ml.

6.2.4 Abreicherung des bakteriellen Lipopolysaccharids in den eluierten Proteinen

Die Expression der in **6.2.2** und **6.2.3** aufgereinigten Fusionsproteine erfolgte in Prokaryonten. Dieses Expressionssystem hat den prinzipiellen Nachteil, dass bakterielles Lipopolysaccharid (LPS) die rekombinanten Proteine verunreinigt. Für den Einsatz der Moleküle im Mausmodell ist eine Kontamination durch LPS unerwünscht, da das Immunsystem unspezifisch stimuliert wird und so nur schwer Rückschlüsse auf die Immunogenität des eingesetzten Fusionsproteins gezogen werden können.

Um das LPS aus den Proteinlösungen zu entfernen, wurden verschiedene Verfahren getestet. Zunächst sollte eine Säule (Detoxi-Gel) mit immobilisiertem Polymixin B verwendet werden. Das antimikrobielle Polypeptid Polymixin B neutralisiert die biologische Aktivität des LPS, indem es an das Lipid A des bakteriellen Lipopolysaccharids bindet. Entgegen der Beschreibung des Herstellers waren die Eluate nach der Behandlung noch immer mit LPS kontaminiert. Außerdem konnte nach dem Säulenauftrag das Protein kaum noch eluiert werden, so dass dieses Verfahren nicht weiter verfolgt wurde. Eine zweite Methode sah vor, LPS über eine Phasentrennung mittels nicht-ionischer Detergenzien zu entfernen. Dabei wurde Triton X-114 als Detergenz verwendet, das bei Temperaturen unter 20 °C mit wässrigen Lösungen mischbar ist, bei Temperaturen über 20 °C aber eine nicht-wässrige Phase bildet. Dieses Phänomen macht man sich zunutze, um an Detergenz gebundenes LPS aus den Proteinlösungen zu entfernen (Aida und Pabst, 1999). Ein entscheidender Nachteil dieser Methode war, dass der

Restgehalt an Triton X-114, der laut Literaturangaben bei ungefähr 0.018 % liegen sollte, ausreichte, um Zellen, die *in vitro* mit den LPS-abgereicherten Proteinen stimuliert wurden, zu lysieren. Schließlich wurde eine Methode gewählt, in der die Proteine noch an der Nickelsäule mit einem Triton X-114 enthaltenden Puffer gewaschen wurden. Dieses Verfahren ermöglichte ein Abwaschen des kontaminierenden LPS, ohne dass das Protein verloren ging. Nach einer Elution der Proteine mit LPS-freiem PBS und deren Dialyse gegen LPS-freies PBS

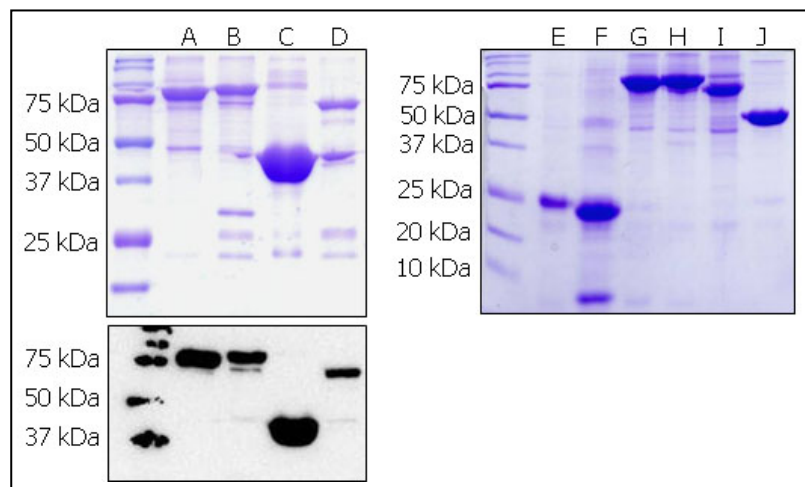


Abbildung 22: Überprüfung der Reinheit und Spezifität der Dialysate. Die Reinheit und Integrität der dialysierten LPS abgereicherten Proteine konnte mittels Coomassiefärbung bzw. durch Färbung des SBP im Western Blot analysiert werden. Hier sind die Hsp-HER2/neu-Fusionsproteine mit K^d-restringierten Epitopen für das BALB/c-Modell dargestellt. Hsp70-HER2/neu_{TE} (79.9 kDa, A), Hsc70-HER2/neu_{TE} (80.7 kDa, B), *m.tub.*Hsp70(ct)-HER2/neu_{TE} (35.0 kDa, C), Hsp70L1-HER2/neu_{TE} (64.3 kDa, D), HER2/neu₁₋₁₃₆ (20.8 kDa, E), HER2/neu₂₆₋₁₃₆ (20.5 kDa, F), Hsp70-HER2/neu₂₆₋₁₃₆ (90.2 kDa, G), Hsc70-HER2/neu₂₆₋₁₃₆ (91 kDa, H), *m.tub.*Hsp70(ct)-HER2/neu₂₆₋₁₃₆ (47.9 kDa, I), Hsp70L1-HER2/neu₂₆₋₁₃₆ (79.5 kDa, J).

konnten Proteinausbeuten von 0.2 bis 1 mg/ml erhalten werden. Die Messung des verbliebenen Endotoxingehalts ergab Werte von 0.004 bis 0.07 EU/ μ g Protein. Die nach der Dialyse erhaltenen Proteinlösungen wurden im Coomassie-Gel und Western Blot auf ihre Reinheit bzw. Integrität überprüft, hier dargestellt anhand der Hsp-HER2/neu-Fusionsproteine mit K^d-restringierten Epitopen für das BALB/c-Mausmodell (Abb. 22).

6.2.5 Expression der Hsp-HER2/neu-Fusionsproteine in Eukaryonten

Die Hitzeschockfusionsproteine sollten zusätzlich zur Expression in *E. coli* auch in eukaryontischen Expressionssystemen wie den HEK293T-Zellen bzw. SF9-Insektenzellen hergestellt werden. Zwar werden in eukaryontischen Zellen im Vergleich zu Prokaryonten geringere Mengen des rekombinanten Proteins produziert, es findet aber keine Verunreinigung der Proben durch bakterielles Lipopolysaccharid statt. Um die Expression in HEK293T-Zellen zu prüfen, wurden die Zellen auf einen Objektträger zentrifugiert. Durch Anfärbung des SBP bzw. His-Tags konnte die intrazelluläre Expression des rekombinanten Proteins nachgewiesen werden (nicht gezeigt). Untersuchungen des Zellüberstandes, des Zellpellets und intrazellulärer Bestandteile nach der Zellyse machten deutlich, dass trotz des N-terminalen ER-Signalpeptids (HA1) das rekombinante Protein nicht in den Zellüberstand sekretiert wurde bzw. dort nicht detektiert werden konnte. Daher wurden die Zellen durch mechanische Lyse per Ultraschall aufgeschlossen und das Lysat analog zum prokaryontischen System mittels Nickel-Affinitätschromatographie aufgereinigt. Die Fusionsproteine wurden lediglich im Lysat und Durchlauf nachgewiesen, konnten aber nicht an die NiNTA gebunden bzw. eluiert werden (nicht gezeigt). Da aber eine Expression des Proteins festgestellt wurde und dieses in den lysierten Zellen auch detektiert werden konnte, wird vermutet, dass in HEK293T-Zellen nur unzureichende Mengen an Protein produziert werden, die mit den hier verwendeten Methoden nicht aufgereinigt werden konnten. Aus diesem Grund wurde die Expression der Fusionsproteine in HEK293T nicht weiter verfolgt.

Die Proteinexpression in Insektenzellen hat gegenüber anderen eukaryontischen Expressionssystemen den Vorteil, relativ hohe Ausbeuten an rekombinantem Protein zu liefern. Die Strategie sah vor, das gewünschte Gen über einen Transfervektor zusammen mit der linearisierten Baculovirus DNA in SF9-Zellen zu transfizieren, wo die Rekombination des Baculovirus erfolgt. Um den Virustiter und damit die Menge des produzierten rekombinanten Proteins zu erhöhen, wurden die Zellen mehrmals passagiert. Wie auch im HEK293T System enthielten die Konstrukte am N-Terminus ein Sekretionssignalpeptid (HA1), das die Sekretion des Proteins ins Zellmedium ermöglichen sollte. Um die Expression zu testen, wurden Viren mit verschiedenen Fusionsproteinen hergestellt. Die Untersuchung der Zellpellets und Zellüberstände zeigte, dass nicht alle rekombinanten Proteine in SF9 exprimierbar waren. Damit die Bandenintensität vergleichbar ist und Rückschlüsse auf die intra- oder extrazelluläre Proteinakkumulation geschlossen werden können, wurden prozentual identische Volumina vom Pellet bzw. Überstand auf das Gel geladen. Wie erwartet zeigten untransfizierte SF9-

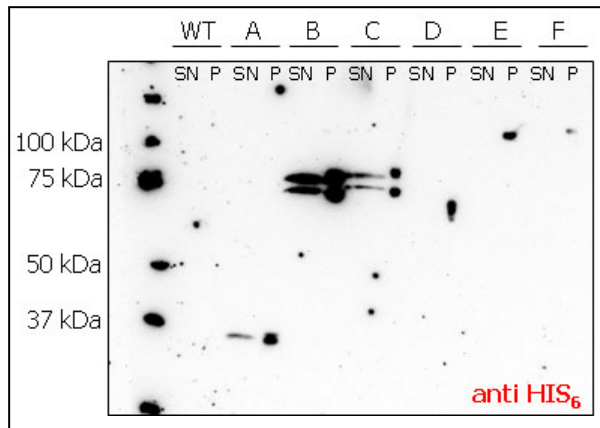


Abbildung 23: Testexpression der Hsp-HER2/neu₂₉₉₋₅₇₉-Fusionsproteine in SF9-Insektenzellen. Die Expression der Proteine *m.tub.Hsp70(ct)* (36.6 kDa, A), Hsp70 (79.8 kDa, B), Hsc70 (80.6 kDa, C), *m.tub.Hsp70(ct)-HER2/neu₂₉₉₋₅₇₉* (68.0 kDa, D), Hsp70-HER2/neu₂₉₉₋₅₇₉ (110.9 kDa, E) und Hsc70-HER2/neu₂₉₉₋₅₇₉ (111.9 kDa, F) in SF9-Zellen wurde im Western Blot durch Färbung des C-terminalen His-Tags überprüft. Dabei wurde das Zellpellet und der Überstand untersucht. Als Kontrolle wurden untransfizierte Zellen (Wildtyp, WT) analog analysiert.

Zellen (Wildtyp) kein Histidin-spezifisches Signal im Western Blot. Die Proteine Hsp70, Hsc70 und *m.tub.Hsp70* waren sowohl im Zellpellet als auch im Überstand nachweisbar, die jeweiligen Fusionsproteine dagegen konnten nur im Pellet detektiert werden (Abb. 23). Des Weiteren treten bei Hsp70 und Hsc70 Degradationsprodukte auf, bei denen es sich aufgrund der Anfärbung über den His-Tag um N-terminale Abbauprodukte handeln muss. Da die Expression von Hsp70 in SF9-Zellen im Vergleich zu anderen Proteinen am stärksten war, wurde dieses Protein für eine Testaufreinigung gewählt. Das rekombinante Protein sollte analog zum prokaryontischen Expressionsmodell mittels Nickel-Affinitätschromatographie aufgereinigt werden. Da hier keine Einschlusskörperchen wie in *E. coli* auftreten sollten, wurden native Aufreinigungsbedingungen gewählt. Abbildung 24A zeigt, dass unter diesen Bedingungen kein Protein eluiert werden kann. Stattdessen wird Hsp70 bei der erwarteten Größe von 79.8 kDa im Durchlauf detektiert, so dass vermutet wird, dass die Affinität des Proteins an die Nickelsäule nur gering ist. Zusätzlich zeigt sich wie bereits bei der Testexpression durch die Anfärbung über den His-Tag im Western Blot eine Doppelbande im Durchlauf, was wiederum auf N-terminale Abbauprodukte schließen lässt. Allerdings scheint im Pellet eine stärkere Degradation des Proteins stattzufinden als im Überstand, da die im Zellpellet detektierte Bande deutlich intensiver ist. Die Elution der Proteine aus dem lysierten Pellet ergab eine schwache Proteinbande in der Elutionfraktion E4. Die spezifische Detektion über den His-Tag zeigte allerdings, dass es sich aufgrund der Molekülgröße hier um ein Degradationsprodukt handeln muss. Durch native Aufreinigungsbedingungen konnte somit kein vollständiges Protein eluiert werden.

Da vermutet wurde, dass der Histidin-Tag im nativen Protein geringere Affinität zur Nickelsäule besitzt, sollte zusätzlich die Affinitätschromatographie unter denaturierenden Bedingungen getestet werden. Dazu wurde der Überstand der Zellen zunächst gegen den entsprechenden Aufreinigungspuffer dialysiert, damit durch äquimolare Konzentrationen an Salzen und Harnstoff eine bessere Bindung erfolgen kann. Der Überstand wurde zur Aufreinigung gewählt, da hier aufgrund der vorigen Ergebnisse weniger Degradationsprodukte erwartet wurden als im Zellpellet. Die Darstellung im Coomassie-Gel zeigt wiederum keine Elution des Proteins. Lediglich im Zellüberstand und Dialysat (D) konnten mittels spezifischer Färbung über den His-Tag Proteinbanden detektiert werden, die dem rekombinanten Protein und zusätzlichen N-terminalen Abbauprodukten entsprechen. Da unter denaturierenden Bedingungen (Abb. 24B) das Protein vor der Säulenbindung detektiert werden

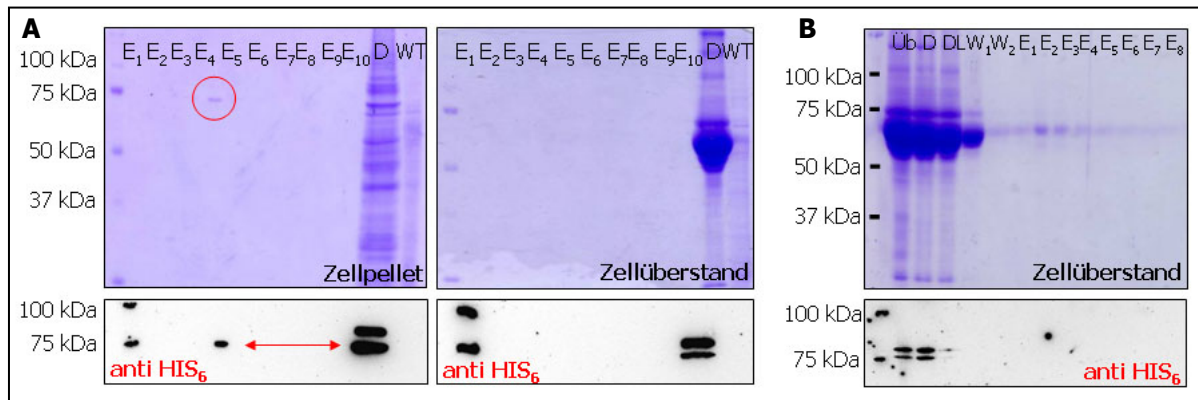


Abbildung 24: Aufreinigung von Hsp70 aus SF9 unter nativen und denaturierenden Bedingungen. Das Protein Hsp70 (79.8 kDa) wurde unter nativen (A) und denaturierenden Bedingungen (B) mittels Nickel-Affinitätschromatographie aufgereinigt. Die Detektion erfolgte im Coomassie-Gel bzw. über spezifische Anfärbung des His-Tags im Western Blot. Sowohl nach nativer als auch nach denaturierender Aufreinigung konnte das Protein Hsp70 nicht eluiert werden. Es wurde sowohl im Zellpellet als auch im Zellüberstand zusätzlich zu einem N-terminalen Degradationsprodukt detektiert. Zur Kontrolle wurden nicht-transfizierte SF9-Zellen parallel untersucht (WT).

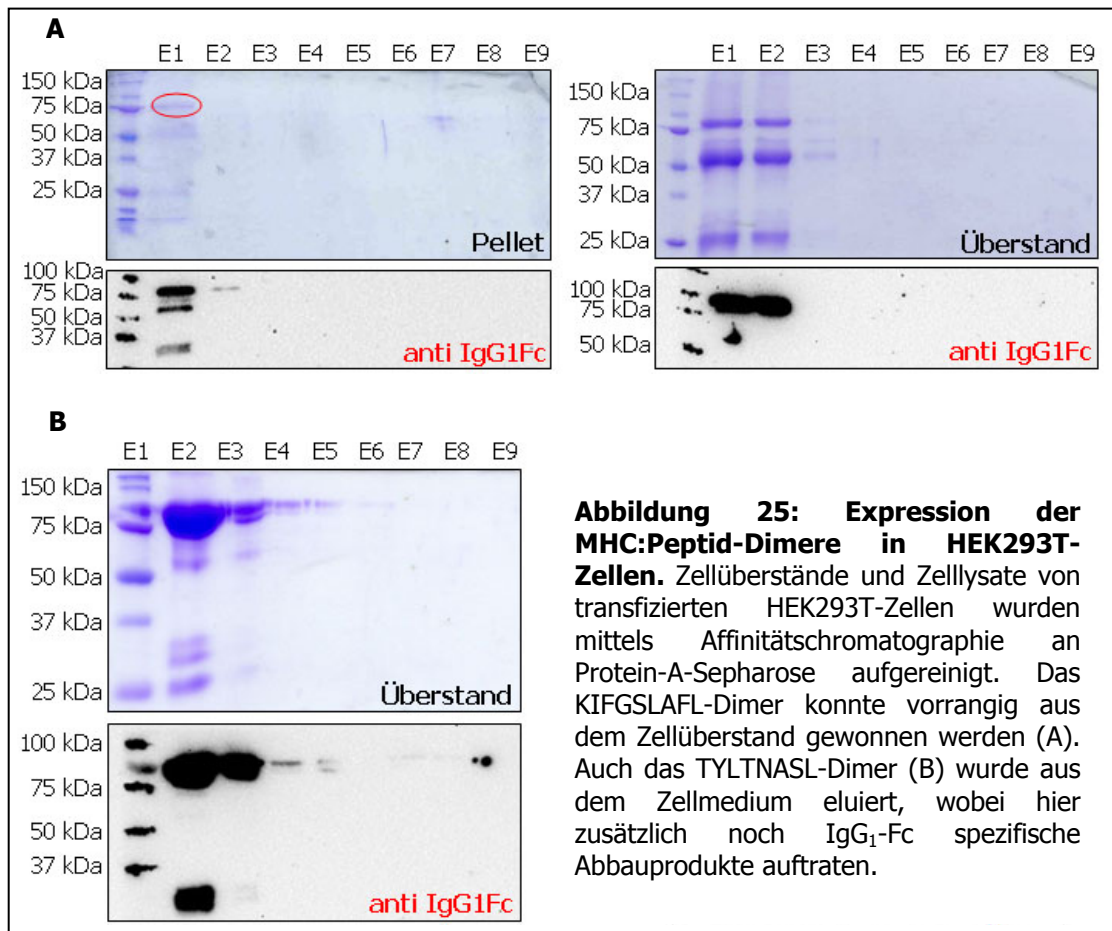
konnte, im Durchlauf (DL) aber nicht mehr auftrat, wurde die Säulenmatrix zusätzlich untersucht (nicht gezeigt). Doch auch die Analyse der Matrix zeigte keine Proteinbindung. Daher wird vermutet, dass insgesamt die Menge des exprimierten Proteins in SF9-Insektenzellen sehr gering war und möglicherweise durch Aggregation während der Dialyse Verluste auftraten.

Somit konnten die Hsp-Fusionsproteine weder im HEK293T-Expressionsmodell noch in SF9-Insektenzellen mittels Nickel-Affinitätschromatographie hergestellt werden. Als Gründe hierfür können einerseits ein niedriges Expressionsniveau sowie schlechte Affinität der rekombinanten Proteine an das verwendete Säulenmaterial aufgeführt werden.

6.2.6 Expression der MHC:Peptid-Dimere in HEK293T-Zellen

Zur Detektion HER2/neu-spezifischer T-Zellen wurden, wie in **6.1.5** beschrieben, MHC:Peptid-Dimere kloniert. Aus der humanen HER2/neu-Sequenz wurden zwei CD8⁺ T-Zellepitope gewählt: das HLA-A2-restringierte KIFGSLAFL und das H2-K^d-restringierte TYLPTNASL. Zur Expression der Fusionsmoleküle wurden HEK293T-Zellen transfiziert und sowohl das lysierte Zellpellet als auch der Zellüberstand mittels Affinitätschromatographie an Protein-A-Sepharose aufgereinigt. Die Überprüfung der Reinheit erfolgte im Coomassie-Gel, die spezifische Detektion der Dimere wurde durch Anfärbung mit einem Ziege-anti-human-IgG-Peroxidase Antikörper im Western Blot erreicht. Abbildung 25A zeigt, dass das ungefähr 85 kDa große KIFGSLAFL-Dimer hauptsächlich in den Zellüberstand sekretiert wird und mit den ersten beiden Elutionsschritten von der Säule eluiert werden kann. Es treten zusätzliche Proteinbanden auf, die aber im Western Blot über den IgG₁-Fusionsteil nicht angefärbt werden können. Da im Zellpellet dagegen nur geringe Mengen des Dimers detektiert wurden, sollte für die

Aufreinigung des TYLPTNASL-Dimers der Zellüberstand verwendet werden. Hier konnte wiederum das Protein bereits in den ersten beiden Elutionsfraktionen von der Säule gewaschen werden. Die spezifische Detektion des konstanten Teils von IgG₁ zeigt neben den 85 kDa Banden, die den Dimeren entsprechen, auch Abbauprodukte mit einer Größe von ungefähr 30 kDa (Abb. 25B und 25C). Unter Berücksichtigung der Fremdproteine wurde die Konzentration der Dimere ermittelt. Nach der Dialyse der Proteine wurde für das KIFGSLAFL-Dimer eine Konzentration von 170 µg/ml ermittelt und für das TYLPTNASL-Dimer konnte eine Konzentration von 2 mg/ml erreicht werden.



Abschnitt 6.2 beschreibt die Expression der Fusionsproteine und die Etablierung verschiedener Expressionssysteme. Die Hsp-HER2/neu-Fusionsproteine konnten erfolgreich in den Bakterien BL21 hergestellt werden. Hier zeigte sich, dass die Positionierung des Hexa-Histidin-Tags an den N-Terminus des Proteins für die Aufreinigung unvorteilhaft war, da viele Degradationsprodukte bzw. unvollständig translatierte Proteine parallel aufgereinigt wurden, welche über zusätzliche Aufreinigungsschritte wie die Gelfiltration oder Streptavidin-Agarose nicht entfernt werden konnten. Auch der Versuch, die Stringenz zu verbessern, erhöhte die Reinheit der His-Hsp-HER2/neu Proteine von 20-60 % nicht. Die C-terminale Position des His-Tags dagegen verbesserte die Reinheit auf 70-90 %. Die erreichten Proteinausbeuten von 0.2-

1 mg/ml korrelierten mit der Molekülgröße, wobei größere Proteine stets in geringerer Menge erhalten wurden. Die Messung des bakteriellen Endotoxins LPS ergab Werte von 0.004-0.07 EU/ μ g rekombinantes Protein. Die Herstellung der Hsp-HER2/neu Proteine in eukaryontischen Zellen wie HEK293T oder SF9 schlug aufgrund eines zu geringen Expressionsniveaus und technischer Probleme bei der Nickel-Affinitätschromatographie fehl. Dagegen konnten die MHC:HER2/neu-Peptid-Dimere aus dem Zellüberstand von HEK293T-Zellen mittels Protein-A-Sepharose aufgereinigt werden, wobei Proteinkonzentrationen von 0.2-2 mg/ml erzielt wurden.

6.3 Induktion einer HER2/neu-spezifischen Immunantwort durch die Hsp-HER2/neu-Fusionsproteine *in vivo*

6.3.1 Etablierung der HER2/neu-spezifischen Immunantwort in BALB/c

Ein Teil der rekombinanten Hitzeschockfusionsproteine wurden zur Immunisierung von BALB/c-Mäusen eingesetzt. Ziel war es, eine HER2/neu-spezifische Immunantwort zu generieren, wobei die Adjuvanswirkung der vier verschiedenen Hitzeschockproteine untereinander verglichen werden sollte. Wie in **6.1.3** beschrieben waren für das BALB/c-Modell Proteine konstruiert worden, welche die beiden K^d-restringierten CD8⁺ T-Zellepitope TYLPTNASL₆₃₋₇₁ bzw. PYVSRLGI₇₈₀₋₇₈₈ der humanen HER2/neu-Sequenz (HER2/neu_{TE}) enthalten. Die Immunisierung der Tiere mit den humanen Epitopen würde eine Evaluierung des Adjuvanzeffektes der verschiedenen Hitzeschockproteine erlauben. Um die Immunogenität der Fusionsproteine beurteilen zu können, sollte zunächst durch eine Immunisierung mit entsprechenden synthetischen Peptiden eine HER2/neu-spezifische Immunantwort etabliert werden.

Die Strategie sah vor, die Mäuse dreimal im Abstand von sieben Tagen subkutan mit jeweils 100 μ g der diesen beiden Epitopen entsprechenden synthetischen Peptiden zu immunisieren. Da eine alleinige Immunisierung mit den CD8⁺ T-Zellepitopen ohne Adjuvans nicht Erfolg versprechend ist, wurden die Peptide mit inkomplettem Freund-Adjuvans (IFA) gemischt. Ein weiterer Faktor, der für die Immunogenität der Peptide entscheidend ist, sind adäquate Signale durch CD4⁺ T-Helferzellen. Durch die Kombination eines zytotoxischen T-Zellepitops mit T-Helferepitopen kann die antigenspezifische IFN γ -Sekretion signifikant erhöht werden (Zaks und Rosenberg, 1998). Daher wurde ein HER2/neu generiertes T-Helferepitop T_hHER2 (HER2/neu₁₆₋₃₀, LPPGAASTQVCTGTD), bzw. ein T-Helferepitop aus Ovalbumin T_hOVA (OVA₃₂₃₋₃₃₉, ISQAVHAAHAEINEAGR) mit den CD8⁺ T-Zellepitopen kombiniert. Die Messung der antigenspezifischen Immunantwort erfolgte hier durch die Färbung des intrazellulären IFN γ nach Aktivierung der CD8⁺ Zellen. Dazu wurde den Tieren eine Woche nach der letzten Immunisierung die Milz und die drainierenden Lymphknoten entnommen und Zellsuspensionen hergestellt. Nach kurzzeitiger *in vitro* Restimulation mit einem der Peptide und Inhibierung des Golgi-Apparates konnte das intrazellulär akkumulierte IFN γ in den Zellen über fluoreszenzmarkierte

Antikörper nachgewiesen werden. Abbildung 26 zeigt, dass nach dreimaliger Peptidimmunisierung sowohl in Milzzellen als auch in Zellen der drainierenden Lymphknoten eine spezifische Immunogenität gegen TYLPTNASL, nicht aber gegen PYVSRLGI detektiert werden konnte. Die Kombination der CD8⁺ Peptide mit dem OVA-generierten T-Helferepitop T_hOVA verbesserte die Immunogenität des Peptids TYLPTNASL deutlich im Vergleich zu dem Helferepitop T_hHER2 aus HER2/neu.

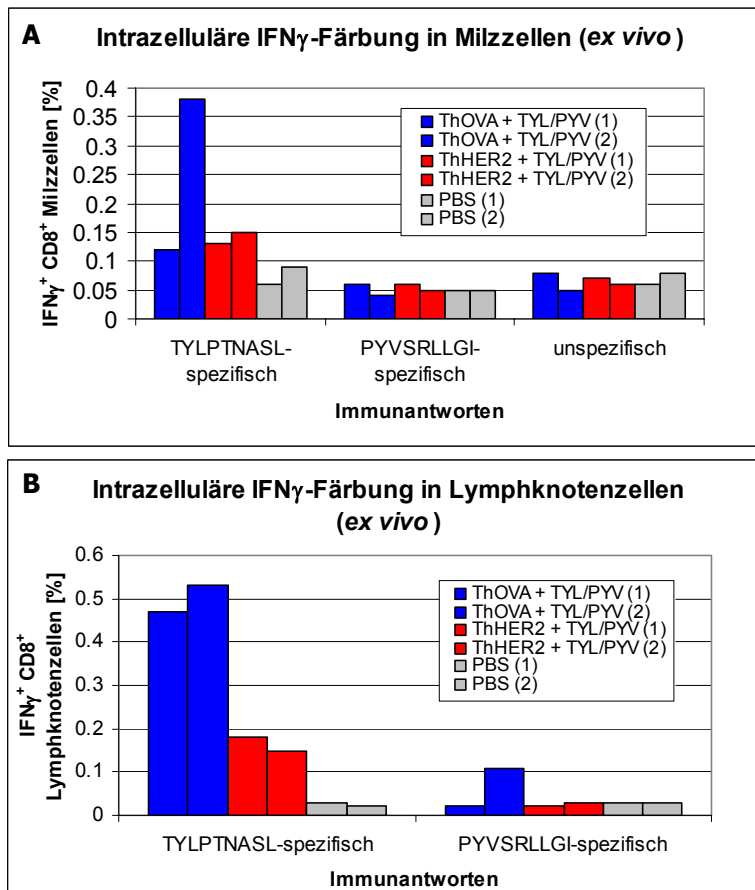


Abbildung 26: Etablierung der HER2/neu-spezifischen T-Zellantworten in BALB/c-Mäusen.

BALB/c-Mäuse wurden dreimal im Abstand von 7 Tagen subkutan mit den CD8⁺ T-Zellepitopen TYLPTNASL und PYVSRLGI in Kombination mit den T-Helferepitopen aus Ovalbumin (T_hOVA) bzw. HER2/neu (T_hHER2) in IFA immunisiert. Eine TYLPTNASL-spezifische IFN_γ-Produktion konnte in der Milz (A) und den drainierenden Lymphknoten (B) detektiert werden. T_hOVA besitzt einen stärkeren Helfereffekt als T_hHER2. Gegen PYVSRLGI konnte keine spezifische Immunantwort induziert werden.

Die Frage, warum keine PYVSRLGI-spezifische IFN_γ-Produktion in zytotoxischen T-Zellen gemessen werden konnten, sollte durch einen Vergleich der Affinitäten der K^d-Epitope auf T2-K^d-Zellen geklärt werden. Hierbei handelt es sich um ein humanes TAP-defizientes B/T-Zellhybridom, das stabil mit dem murinen MHC-Klasse-I-Molekül H-2K^d transfiziert ist. In diesen Zellen können aufgrund der TAP-Defizienz im ER keine endogenen Peptide auf MHC-Klasse-I geladen werden. MHC-Klasse-I-Moleküle weisen ohne gebundenes Peptid nur eine geringe Stabilität auf, so dass leere MHC-Moleküle rasch endozytiert werden. T2-K^d-Zellen eignen sich daher dafür, die Bindung exogener Peptide auf H-2K^d und damit deren Stabilisierung an der Zelloberfläche zu untersuchen. Die Zellen wurden für 20 Stunden bei 37 °C mit unterschiedlichen Mengen an Peptid inkubiert. Anschließend konnte über den K^d-spezifischen (K9-18) und einen sekundären fluoreszenzmarkierten Antikörper die Zunahme der Peptid-stabilisierten H-2K^d-Moleküle auf den T2-K^d-Zellen gemessen werden (Abb. 27). Der Vergleich der Peptide machte deutlich, dass durch eine steigende Konzentration an PYVSRLGI die Menge an detektierbaren H-2K^d-Molekülen nicht gesteigert werden konnte. Dagegen wurde das MHC-Klasse-I-

Molekül bei der Zugabe des Peptids TYLPTNASL bis 10 μM zunehmend stabilisiert und konnte an der Zelloberfläche detektiert werden. Dies lässt die Vermutung zu, dass PYVSRLGI im Gegensatz zu TYLPTNASL eine wesentlich geringere Affinität zu H-2K^d und daher auch eine schlechtere Immunogenität besitzt.

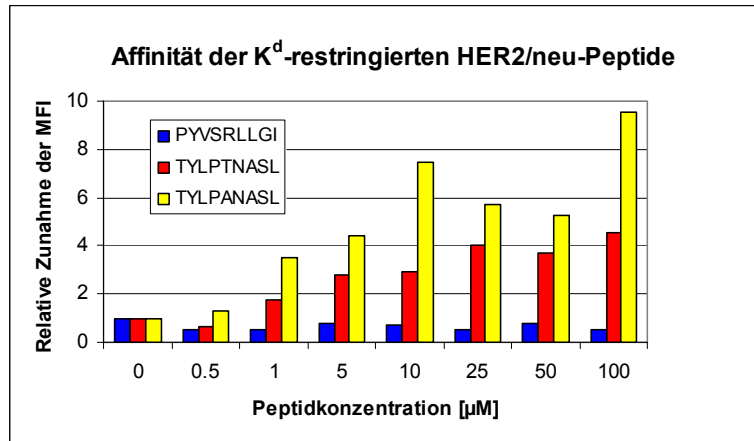


Abbildung 27: Affinitätsanalyse der K^d-Peptide auf T2-K^d. T2-K^d-Zellen wurden für 20 Stunden mit den Peptiden TYLPTNASL, TYLPANASL und PYVSRLGI inkubiert. Die Stabilisierung des H-2K^d-Moleküls durch die Peptide wurde mittels eines fluoreszenzmarkierten Antikörpers im FACS gemessen. Die Bindung von TYLPTNASL erhöht die Zahl der H-2K^d-Moleküle, während PYVSRLGI eine geringe Affinität zu H-2K^d besitzt und daher nur wenig stabilisierend wirkt.

Ein weiterer Grund neben diesem Affinitätsunterschied könnte aber auch die Tatsache sein, dass PYVSRLGI ein Selbstpeptid der Maus ist. Für die Herstellung der Proteine wurde stets die humane Sequenz von HER2/neu verwendet. Während sich die humane HER2/neu-Sequenz im Epitop TYLPTNASL in einer Aminosäure von der murinen Sequenz unterscheidet (TYLPANASL), ist die Peptidsequenz PYVSRLGI in Mensch und Maus vollkommen identisch. Parallel zu den beiden in den Fusionsproteinen vorkommenden CD8⁺ T-Zellepitopen wurde auch die Affinität des murinen Peptids TYLPANASL auf T2-K^d-Zellen geprüft. In Abbildung 27 wird deutlich, dass TYLPTNASL im Vergleich zum murinen Peptid TYLPANASL eine geringere Stabilisierung des H-2K^d-Moleküls bewirkt, aber dennoch deutlich affiner als das Peptid PYVSRLGI ist.

Somit konnte in BALB/c-Mäusen eine HER2/neu-spezifische Immunantwort induziert werden. Durch Peptidimmunisierung gelang die Induktion einer TYLPTNASL-spezifischen, nicht aber einer PYVSRLGI-spezifischen CD8⁺ T-Zellreaktivität.

6.3.2 Etablierung der Proteinimmunisierung in BALB/c

Nachdem die Aktivierung HER2/neu-spezifischer T-Zellen nach einer Peptidimmunisierung in BALB/c-Mäusen etabliert worden war, sollte ein Protokoll zur Immunisierung mit den rekombinanten Hitzeschockfusionsproteinen erarbeitet werden. Die Proteinimmunisierung wurde in diesem Mausmodell etabliert, da eine ausreichende Anzahl von BALB/c-Mäusen zur Verfügung stand. Als Modellprotein wurde *m.tub.Hsp70(ct)-HER2/neu_{TE}* gewählt, das die beiden K^d-restringierten CD8⁺ T-Zellepitope TYLPTNASL und PYVSRLGI als Tandemepitop beinhaltet. Von diesem rekombinanten Protein konnten hohe Mengen hergestellt werden, so dass dieses zur Etablierung der

Proteinimmunisierung gewählt wurde. Die Mäuse wurden mit 500 pmol des Fusionsproteins in Kombination mit 100 nmol CD4⁺ T-Helferepitop T_HOVA im Abstand von sieben Tagen subkutan immunisiert. Der immunogene Effekt des LPS-depletierten Fusionsproteins sollte nach einer Primärantwort sowie einer weiteren Restimulation in Kombination mit verschiedenen Adjuvanzen untersucht werden. Der Proteinansatz wurde dazu entweder 1:1 in komplettem Freund-Adjuvans (CFA) bzw. mit je 50 µg LPS bzw. dem Oligonukleotid CpG gemischt. Die verbleibende LPS-Kontamination in der applizierten Proteinlösung betrug 14 pg pro 500 pmol Protein (0.013 EU/µg bzw. 0.01 EU/µl).

Während für die in **6.3.1** beschriebene Peptidimmunisierung die intrazelluläre IFN γ -Produktion der spezifischen T-Zellen als Nachweis der Funktionalität der CD8⁺ T-Zellen diente, wurde hier die zytotoxische Aktivität der T-Zellen *in vivo* überprüft. Dazu wurden den Tieren eine Woche nach der letzten Behandlung antigenbeladene fluoreszenzmarkierte Milzzellen intravenös verabreicht. Diese Zellen dienten als Zielzellen und sollten durch aktivierte antigenspezifische T-Zellen getötet werden. Die Abnahme der fluoreszierenden Zellen spiegelt die zytotoxische Aktivität der HER2/neu-spezifischen CD8⁺ T-Zellen wider. Nach einer 16-stündigen Inkubation wurden die Tiere geopfert, um die Milz und die drainierenden Lymphknoten zu untersuchen. Bereits nach einer einmaligen Immunisierung der Tiere mit dem Protein *m.tub.Hsp70(ct)*-HER2/neu_{TE} konnte in den Lymphknoten eine TYLPTNASL-spezifische Zytotoxizität detektiert werden. Die Kombination des Proteins mit unterschiedlichen Adjuvanzen zeigte keinen deutlichen Unterschied in Bezug auf die Immunogenität des Proteins, wobei die antigenspezifische Zytotoxizität der CD8⁺ T-Zellen bei 24.6 % für CFA, 19.6 % für LPS und 34.9 % für CpG lagen (Abb. 28A). Tendenziell zeigte diese Primärantwort, dass in den Lymphknoten durch die Kombination des Proteins mit dem Adjuvans CpG die beste T-Zellstimulation erreicht wurde. Diese Vermutung wurde durch eine Restimulation der Tiere mit dem rekombinanten Protein und dem jeweiligen Adjuvans bestätigt (Abb. 28B). Hier wurde deutlich, dass die Kombination des Proteins mit CpG eine TYLPTNASL-spezifische Zytotoxizität auf 50.3 % erzielte, während in den mit LPS immunisierten Mäusen keine T-Zellaktivität detektierbar war. Komplettes Freund-Adjuvans (CFA) konnte nach einer weiteren Immunisierung die zytotoxische T-Zellfunktion zwar auf 37.3 % erhöhen, die Immunantwort blieb aber unter der des Proteins kombiniert mit CpG.

Die Zytotoxizität in der Milz blieb generell unter den Werten der Lymphknoten. Nach der Primärimmunisierung waren in keinem der Ansätze in der Milz T-Zellaktivitäten zu messen (nicht gezeigt). Durch eine Restimulation der Tiere mit Protein in Kombination mit CpG konnte eine TYLPTNASL-spezifische Zytotoxizität von 28.2 % erreicht werden (Abb. 28C). Das Protein induzierte aber weder mit LPS, noch in Kombination mit CFA zytotoxische T-Zellen, was wiederum zeigte, dass CpG im direkten Vergleich zu den getesteten Adjuvanzen den stärksten Adjuvanseffekt besaß. Nach einer weiteren Restimulation, also nach insgesamt drei Immunisierungen, konnte in keinem der Ansätze, weder in den Lymphknoten noch in Milzzellen, eine gesteigerte Immunantwort gegen TYLPTNASL beobachtet werden (nicht gezeigt).

Analog zu **6.3.1** wurden die Kontrolltiere auch mit dem Peptid TYLPTNASL und T_HOVA in IFA immunisiert, um zu überprüfen, ob durch eine Peptidimmunisierung neben der IFN γ -Produktion auch

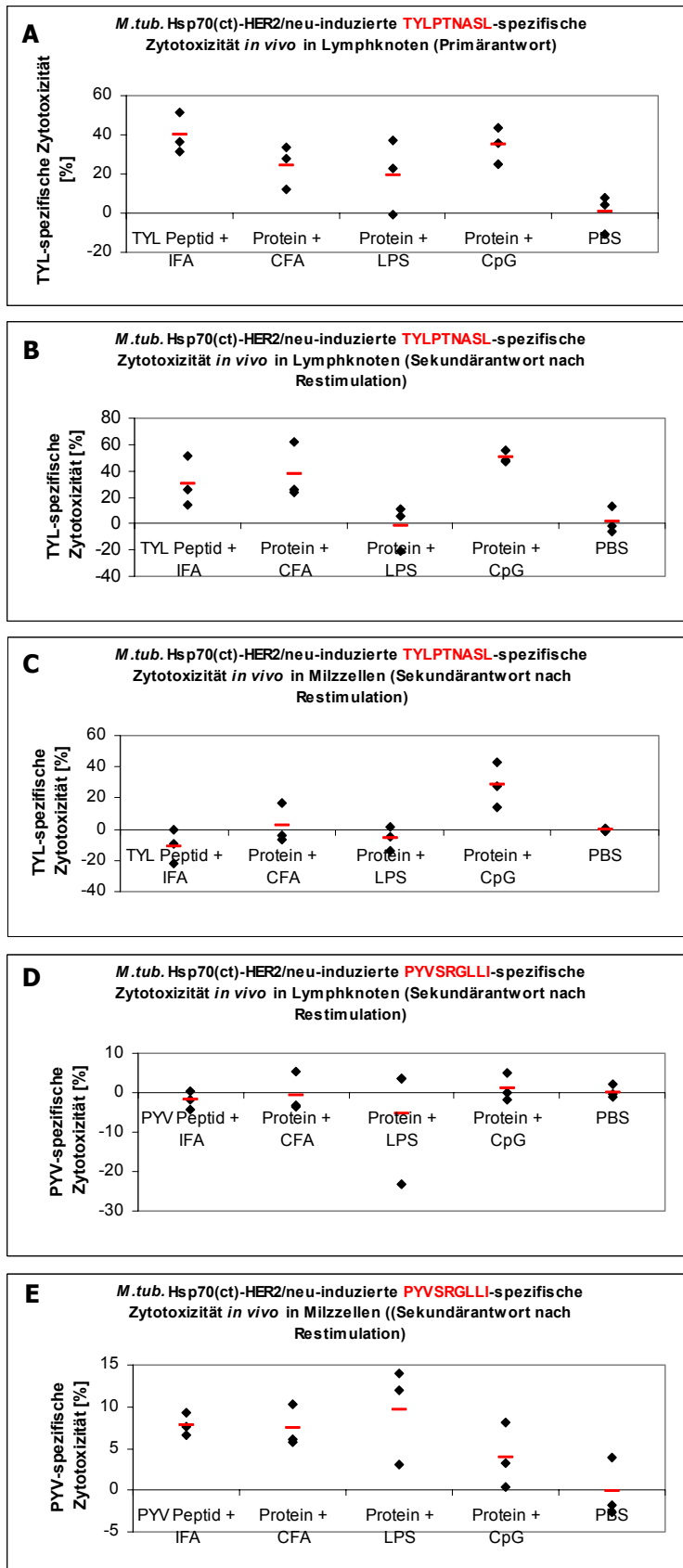


Abbildung 28: Etablierung der Proteinimmunisierung in BALB/c.

Die Mäuse wurden mit 500 pmol *m.tub.*Hsp70(ct)-HER2/neu_{TE} Protein bzw. 100 nmol TYLPTNASL-Peptid in Kombination mit 100 nmol T_hOVA und verschiedenen Adjuvanzien (CFA, LPS, CpG) subkutan immunisiert. Die antigenspezifische T-Zellzytotoxizität wurde an Tag 7 nach einmaliger Immunisierung bzw. an Tag 14 nach zweimaliger Immunisierung *in vivo* in Milz und Lymphknoten untersucht. In den Lymphknoten wurden nach einer Applikation in allen Ansätzen TYLPTNASL-spezifische Immunantworten detektiert (A), die nach einer weiteren Immunisierung mit CpG gesteigert werden konnten (B). Ähnliche Beobachtungen wurden in Milzzellen gemacht, wobei die antigenspezifische Zytotoxizität insgesamt geringer war (C). Im Gegensatz zu TYLPTNASL wurde durch die Immunisierung mit Fusionsprotein bzw. synthetischem Peptid keine Immunantwort gegen das Epitop PYVSRLLGI induziert (D und E).

eine zytotoxische T-Zellfunktionalität erzielt werden kann. Nach einmaliger Applikation trat in den Lymphknoten eine antigenspezifische Zytotoxizität von 39.7 % (Abb. 28A), in der Milz von 16.5 % auf (nicht gezeigt). Eine Steigerung der Werte durch eine Restimulation wie nach einer Immunisierung mit

m.tub.Hsp70(ct)-HER2/neu_{TE} in Kombination mit CpG konnte hier nicht beobachtet werden (Abb. 28B).

Das Protein *m.tub.Hsp70(ct)-HER2/neu_{TE}* beinhaltet neben dem CD8⁺ T-Zellepitop TYLPTNASL auch das Epitop PYVSRLGI. Während in *m.tub.Hsp70(ct)-HER2/neu_{TE}* immunisierten Mäusen gegen TYLPTNASL eine deutliche Immunantwort detektierbar war, konnte gegen PYVSRLGI weder in der Milz noch in den Lymphknoten eine zytotoxische T-Zellaktivität nach einer Primärimmunisierung bzw. zusätzlicher Restimulation gemessen werden (Abb. 28D und 28E).

Die Etablierung der Proteinimmunisierung in BALB/c zeigte, dass durch die Kombination des rekombinanten Hitzeschockfusionsproteins *m.tub.Hsp70(ct)-HER2/neu_{TE}* mit einem Adjuvans analog zur Peptidimmunisierung eine TYLPTNASL-spezifische Immunantwort induziert werden kann. Durch einen Vergleich verschiedener Adjuvanzen stellte sich heraus, dass CpG am potentesten wirkt und wurde daher in den weiteren Proteinimmunisierungen eingesetzt. Da Immunantwort nach einer Restimulation deutlich stärker war als die Primärantwort, wurden die Mäuse für die weiteren Untersuchungen jeweils zweimal im Abstand von sieben Tagen immunisiert, ehe die Analyse erfolgte. Das T-Zellepitop PYVSRLGI wirkte im Gegensatz zu TYLPTNASL weniger immunogen, wodurch keine spezifischen Immunantworten detektiert werden konnten.

6.3.3 Vergleich der Immunogenität der Hsp-HER2/neu_{TE}-Fusionsproteine in BALB/c

Nachdem eine Proteinimmunisierung in BALB/c-Mäusen etabliert werden konnte, sollte die Immunogenität aller vier LPS-abgereicherten Hitzeschockfusionsproteine, die die beiden K^d-restringierten CD8⁺ T-Zellepitope TYLPTNASL und PYVSRLGI enthielten, miteinander verglichen werden. Analog zu dem in **6.3.2** etablierten Protokoll wurden BALB/c-Mäuse mit 500 pmol des jeweiligen Proteins in Kombination mit 100 nmol des Helferepitops T_hOVA und 50 µg CpG an Tag 0 und Tag 7 subkutan immunisiert. Wiederum wurde die antigenspezifische Zytotoxizität der T-Zellen in Milzzellen und drainierenden Lymphknoten *in vivo* untersucht. Die restliche LPS Kontamination pro 500 pmol des verabreichten Proteins betrug 10 bis 50 pg LPS (0.005–0.027 EU/µg). Bei drei der vier hergestellten Fusionsproteine konnte in den Lymphknoten eine TYLPTNASL-spezifische Immunantwort induziert werden. Dabei löste das Protein Hsp70-HER2/neu_{TE} mit 43.5 % die höchste spezifische Zytotoxizität aus, gefolgt von Hsc70-HER2/neu_{TE} mit 42.7 % und *m.tub.Hsp70-HER2/neu_{TE}* mit 25.1 % (Abb. 29A). Das Protein Hsp70L1-HER2/neu_{TE} war im direkten Vergleich zu den anderen rekombinanten Proteinen nur schwach immunogen, da hier nur eine Zytotoxizität von 11.8 % erreicht wurde. Als Positivkontrolle wurde parallel mit 100 nmol TYLPTNASL immunisiert. Das Peptid in Kombination mit 50 µg CpG induzierte analog zu den vorigen Experimenten, in denen IFA als Adjuvans eingesetzt wurde, eine antigenspezifische Immunantwort. Der Vergleich mit den Hsp-HER2/neu_{TE}-Fusionsproteinen zeigte, dass die Proteine Hsp70-HER2/neu_{TE} und Hsc70-HER2/neu_{TE} eine stärkere antigenspezifische T-Zellaktivität auslösten als das Peptid. Das Protein *m.tub.Hsp70-*

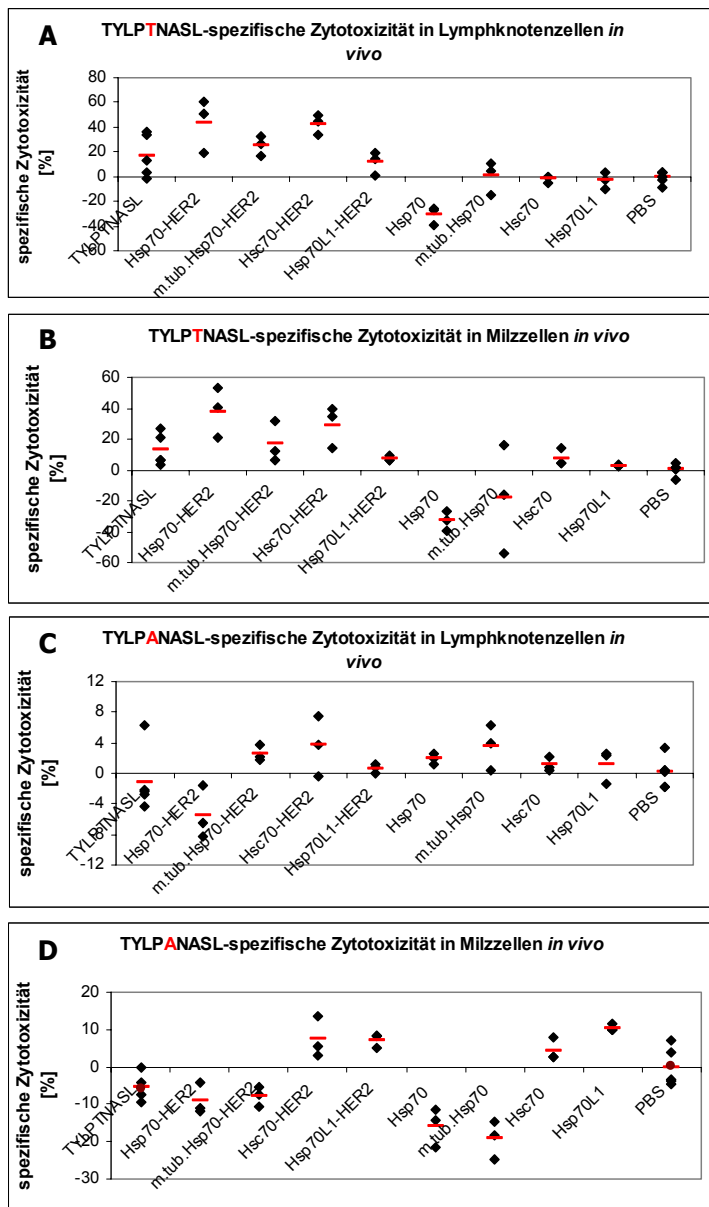


Abbildung 29: Etablierung der Proteinimmunisierung in BALB/c. BALB/c-Mäuse wurden mit 500 pmol der angegebenen rekombinanten Fusionsproteine Hsp-HER2/neu_{TE} bzw. 100 nmol TYLPTNASL-Peptid jeweils in Kombination mit 100 nmol T_rOVA und 50 µg CpG subkutan an Tag 0 und Tag 7 immunisiert. Eine Woche nach der letzten Applikation wurde die antigenspezifische T-Zellzytotoxizität *in vivo* in Milz und Lymphknoten untersucht. Die Detektion der TYLPTNASL-spezifischen Immunantwort zeigte, dass das Protein Hsp70-HER2/neu_{TE} mit 43.5 % in den Lymphknoten und 38 % in der Milz die höchste spezifische Zytotoxizität auslöste, gefolgt von Hsc70-HER2/neu mit 42.7 % in den Lymphknoten und 29.3 % in der Milz. Das Protein *m.tub.*Hsp70-HER2/neu_{TE} induzierte gegen TYLPTNASL in den Lymphknoten eine Immunantwort von 25.1 % und in der Milz 16.9 %. Das vierte Fusionsprotein (Hsp70L1-HER2/neu_{TE}) wirkte dagegen schwach immunogen, hier konnten keine Zytotoxizitäten detektiert werden. Das Peptid TYLPTNASL, das analog appliziert wurde, löste ebenfalls eine spezifische Immunantwort aus, die allerdings mit 16.9 % in den Lymphknoten und 12.9 % in der Milz schwächer war als die der Proteine. Eine Kreuzreaktivität gegen das murine Epitop TYLPANASL konnte durch keine Immunisierung erreicht werden.

HER2/neu_{TE} besaß in diesem Ansatz eine zum Peptid vergleichbare Immunogenität. Die Untersuchung der T-Zellantworten in Milzzellen ergab generell geringere Werte als in den Lymphknoten, wobei das Verhältnis der Immunogenität der einzelnen Proteine untereinander analog zu den in den Lymphknoten erhaltenen Werten war (Abb. 29B). Um die Immunogenität der Fusionsproteine eindeutig auf die im HER2/neu-Fusionsteil enthaltenen Epitope zurückzuführen, wurden die einzelnen Hitzeschockproteine ohne HER2/neu-Anteil ebenfalls analysiert. Die Abbildungen 29A und 29B zeigen, dass wie erwartet keines der Hitzeschockproteine eine TYLPTNASL-spezifische Immunantwort auslösen konnte.

Für die Klonierung der Hitzeschockfusionsproteine wurde die humane HER2/neu-Sequenz verwendet. Da sich das humane TYLPTNASL-Peptid in nur einer Aminosäure von der murinen Sequenz unterscheidet (TYLPANASL), sollte untersucht werden, ob durch eine Immunisierung mit humanem Protein auch eine Kreuzreaktivität gegen das murine CD8⁺ T-Zellepitop induziert werden konnte. Daher wurde parallel die zytotoxische T-Zellaktivität gegen TYLPANASL-beladene Zielzellen bestimmt

(Abb. 29D und 29E). In allen Ansätzen wurden antigenspezifische Zytotoxizitäten von unter 10 % detektiert, was nicht als signifikante Immunantwort gewertet wurde. Daher muss davon ausgegangen werden, dass durch die Immunisierung mit den TYLPTNASL enthaltenden Fusionsproteinen bzw. mit dem TYLPTNASL-Peptid keine Kreuzreaktivität gegen das murine Selbstpeptid TYLPANASL ausgelöst werden konnte.

Der Vergleich der einzelnen Hsp-HER2/neu_{TE}-Fusionsproteine verdeutlichte, dass in Kombination mit CpG als Adjuvanz drei der vier getesteten Proteine eine TYLPTNASL-spezifische Immunität in BALB/c-Mäusen auslösten. Hsp70-HER2/neu_{TE} und Hsc70-HER2/neu_{TE} besaßen dabei eine stärkere Immunogenität als *m.tub.*Hsp70-HER2/neu_{TE} und Hsp70L1-HER2/neu_{TE}, welches keine antigenspezifische T-Zellreaktivität induzierte. Im Vergleich zu 100 nmol Peptid konnte durch die Immunisierung der Tiere mit 500 pmol Hsp70-HER2/neu_{TE} und Hsc70-HER2/neu_{TE} eine stärkere Immunantwort hervorgerufen werden. Allerdings gelang es weder durch eine Peptid-, noch eine Proteinimmunisierung eine Kreuzreaktivität gegen das murine Epitop TYLPANASL zu induzieren.

6.3.4 Titration des Adjuvans CpG

Die rekombinanten Hitzeschockfusionsproteine *m.tub.*Hsp70-HER2/neu_{TE}, Hsp70-HER2/neu_{TE} und Hsc70-HER2/neu_{TE} induzierten wie in **6.3.3** gezeigt in Kombination mit 50 µg CpG eine TYLPTNASL-spezifische Immunantwort in BALB/c. Um die Immunogenität auf die Fusionsproteine zurückzuführen, wurde die Menge des Adjuvans CpG variiert. Dazu wurden die Tiere mit 500 pmol des jeweiligen Proteins alleine bzw. in Kombination mit 0,5, 5 oder 50 µg CpG subkutan immunisiert. Zusätzlich wurde wie in den vorigen Ansätzen 100 nmol des Helferepitops T_hOVA zugefügt. Der Restgehalt an LPS in den applizierten Proteinlösungen lag bei 22,5 pg für *m.tub.*Hsp70-HER2/neu (0,02 EU/µg), bei 33,1 pg für Hsp70-HER2/neu (0,013 EU/µg) und bei 26,0 pg für Hsc70-HER2/neu (0,01 EU/µg) pro Injektion. Nach zwei Immunisierungen wurde wiederum die TYLPTNASL-spezifische Immunantwort in Form einer T-Zellzytotoxizität *in vivo* gemessen. In Abbildung 30A sind die antigenspezifischen Immunantworten in den drainierenden Lymphknoten nach Immunisierung mit den einzelnen Proteinen gegenübergestellt. Es fällt auf, dass die TYLPTNASL-spezifische zytotoxische T-Zellantwort, die durch die Proteinimmunisierung mit einer hohen CpG-Dosis erreicht wurde, durch eine mittlere Dosis von 5 µg weiter gesteigert werden konnte. Diese Tendenz konnte bei allen Proteinen beobachtet werden. Das Protein Hsp70-HER2/neu_{TE} induzierte auch in Kombination mit geringen Adjuvansmengen (0,5 µg) eine messbare Immunantwort von 26,1 %, wohingegen *m.tub.*Hsp70-HER2/neu_{TE} und Hsc70-HER2/neu_{TE} hier nicht mehr immunogen wirkten. Es zeigte sich, dass die Proteine ohne zusätzliches CpG keinen immunostimulatorischen Effekt besitzen und daher keine antigenspezifische Zytotoxizität messbar war.

Der Effekt des CpG wurde auch in Kombination mit 100 nmol bzw. 500 pmol des synthetischen Peptids untersucht. Die Mäuse wurden dazu analog mit dem CD8⁺ T-Zellepitop TYLPTNASL, 100 nmol T_hOVA und unterschiedlichen Mengen an CpG immunisiert. Während bei der Proteinimmunisierung die

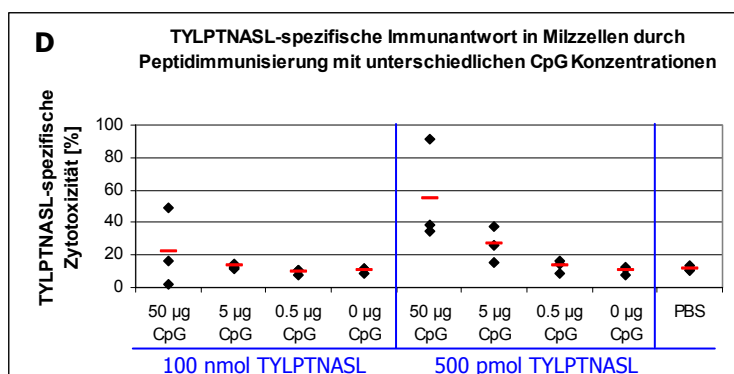
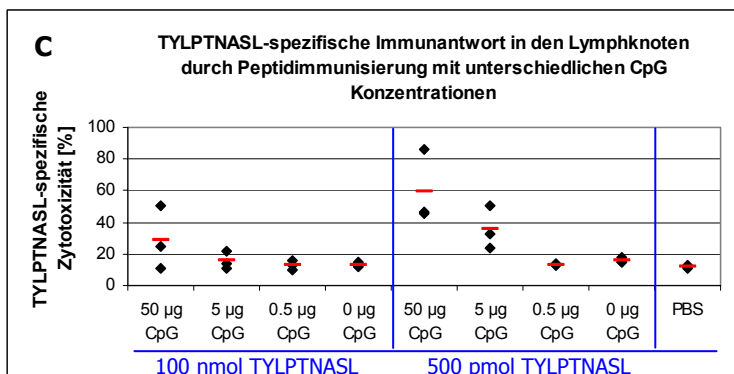
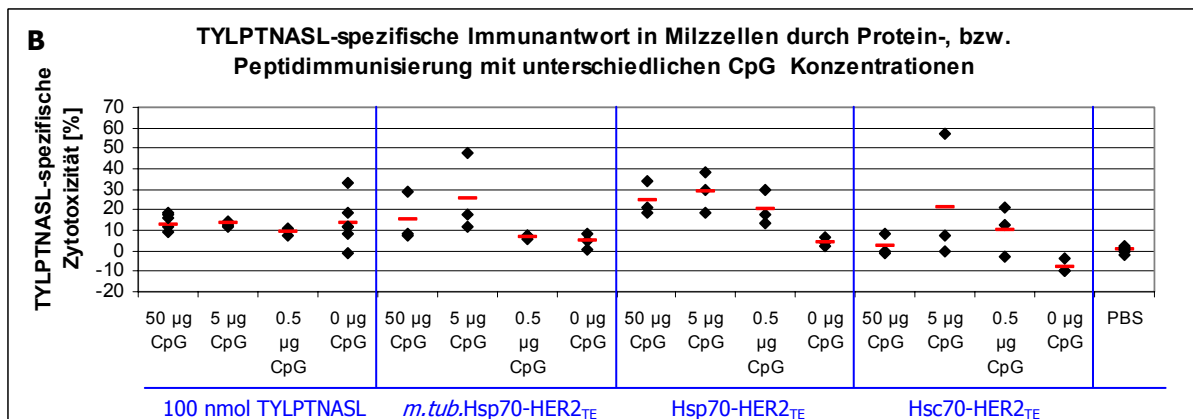
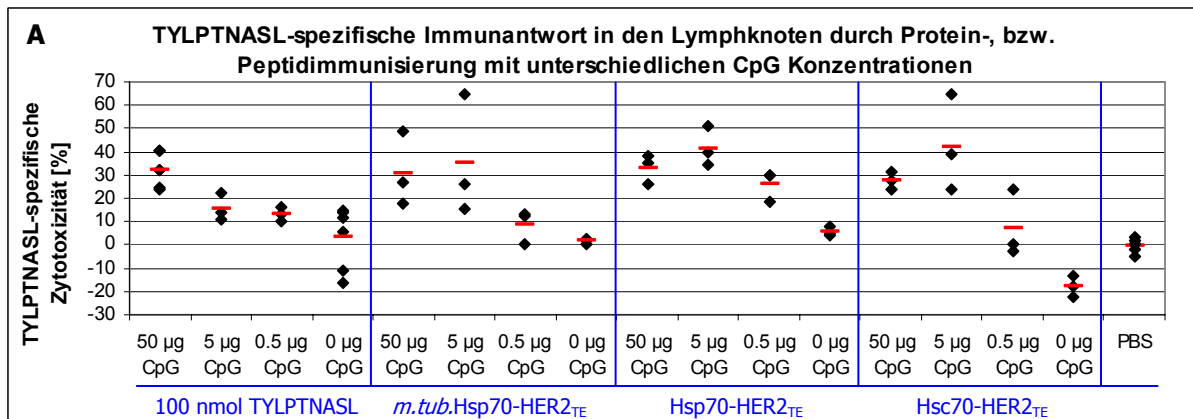


Abbildung 30: Titration des Adjuvans CpG. BALB/c-Mäuse wurden mit 500 pmol der angegebenen Fusionsproteine bzw. dem TYLPTNASL-Peptid in Kombination mit T_hOVA und unterschiedlichen Mengen an Adjuvans (50, 5, 0.5, 0 µg CpG) subkutan an Tag 0 und Tag 7 immunisiert. Die antigen-spezifische T-Zellzytotoxizität wurde an Tag 14 *in vivo* in Milz und Lymphknoten untersucht. Die Proteinimmunisierung induzierte in den Lymphknoten in Kombination mit 50 µg CpG eine mit 100 nmol Peptid vergleichbare Immunantwort (A). 500 pmol des Peptids induzierten mit 50 µg CpG eine wesentlich stärkere Immunantwort als 100 nmol Peptid bzw. 500 pmol der Proteine (C), wobei der immunogene Effekt von TYLPTNASL bei mittleren Adjuvans-

mengen (5 µg) schwächer ist als der der Proteine ist (A und C). Bei niedrigen CpG Konzentrationen besaß Hsp70-HER2/neu_{TE} noch eine Immunogenität, während sowohl das Peptid als auch die anderen Fusionsproteine keine T-Zellantworten mehr auslösen konnten (A). In der Milz war ein analoger Trend zu beobachten, wobei die prozentualen T-Zellzytotoxizitäten geringer waren als in den Lymphknoten (B und D).

höchste Immunantwort mit 5 µg CpG erhalten wurde, konnte bei der Peptidimmunisierung eine Korrelation von abnehmender Adjuvansmenge mit einer schwächer werdenden TYLPTNASL-spezifischen Immunantwort beobachtet werden. Es fällt auf, dass die geringere Peptidmenge (500 mol) eine bessere Immunogenität besaß als 100 nmol des Peptids (Abb. 30C und 308D). Die mittlere Zytotoxizität von 32.2 % in den Lymphknoten, die durch 100 nmol Peptid und 50 µg CpG erreicht werden konnte, war mit der Immunogenität der Proteine unter denselben Bedingungen (50 µg CpG) vergleichbar. Äquimolare Peptidmengen (500 pmol) induzierten im Vergleich zu den Proteinen in Kombination mit 50 µg CpG eine stärkere Immunantwort (54.6 % in der Milz und 59.6 % den Lymphknoten, Abb. 30C und 30D).

Es wurde aber auch deutlich, dass bei 5 µg CpG die erhaltene TYLPTNASL-spezifische Immunantwort durch die Proteine mit 35.2 % für *m.tub.*Hsp70-HER2/neu_{TE}, 41.6 % für Hsp70-HER2/neu_{TE} und 42.4 % für Hsc70-HER2/neu_{TE} höher war, als die des Peptids, wenn es bei 100 nmol und zusammen mit 5 bzw. 50 µg CpG eingesetzt wird. Verglichen mit der geringeren Peptidmenge zeigte sich, dass die Proteine in Kombination mit 5 µg CpG eine leicht erhöhte bzw. im Fall von *m.tub.*Hsp70-HER2/neu_{TE} eine analoge Immunogenität aufwiesen.

Parallel wurden auch die Immunantworten in Milzzellen untersucht. Generell wurden hier wiederum schwächere T-Zellantworten gemessen. Der in Lymphknoten beobachtete Effekt der CpG-Mengen auf die Immunogenität der Proteine zeigte sich aber auch in Milzzellen (Abb. 30B).

Anhand dieser Daten kann analog zu den in **6.3.3** erhaltenen Ergebnissen festgestellt werden, dass die Hitzeschockfusionsproteine Hsp70-HER2/neu_{TE} und Hsc70-HER2/neu_{TE} in BALB/c-Mäusen stärker immunogen wirkten als *m.tub.*Hsp70-HER2/neu_{TE}. Die Stärke der HER2/neu-spezifischen Immunantwort der Fusionsproteine war CpG-abhängig und zeigte in Kombination mit mittleren CpG-Dosen (5 µg) höhere Werte als bei hohen CpG-Mengen (50 µg). Ohne das Adjuvans allerdings konnten die Fusionsproteine keine Immunantwort induzieren. Es stellte sich heraus, dass die Fusionsproteine in Abhängigkeit von der applizierten Antigen- und Adjuvansmenge eine stärkere Immunogenität besaßen als das analog verabreichte Peptid, was in Tabelle 1 veranschaulicht wird.

Tabelle 1: Vergleich der Immunogenität der Hsp-Fusionsproteine mit TYLPTNASL in Abhängigkeit der CpG- und Antigenmenge

| | TYLPTNASL | | Hsp-Fusionsproteine |
|-----------|-----------|---|---------------------|
| 50 µg CpG | 100 nmol | = | 500 pmol |
| | 500 pmol | > | 500 pmol |
| 5 µg CpG | 100 nmol | < | 500 pmol |
| | 500 pmol | ≤ | 500 pmol |

6.3.5 Titration der Hitzeschockfusionsproteine

In **6.3.4** wurde festgestellt, dass die Menge des applizierten Peptids TYLPTNASL Einfluss auf die Immunogenität hatte. Um eine Dosisabhängigkeit der Proteinimmunisierungen zu überprüfen, wurden BALB/c-Mäuse mit unterschiedlichen Proteinmengen zusammen mit dem Helferepitop T_hOVA und CpG

zweimal im Abstand von sieben Tagen subkutan immunisiert. Der Restgehalt an Endotoxin in den Proteinlösungen lag zwischen 2.5 und 28.0 pg pro Injektion (0.012-0.027 EU/ μ g). Da die Kombination mit 5 μ g im CpG Titrationsexperiment die stärkste Immunantwort auslöste, wurde diese mittlere Adjuvansmenge für die Immunisierungen gewählt. Die in Abbildung 31 dargestellten Daten zeigten außer für das Protein Hsp70-HER2/neu keine eindeutige Dosisabhängigkeit. Hier nahm sowohl in den Lymphknoten als auch in der Milz die TYLPTNASL-spezifische Zytotoxizität mit steigender Proteinmenge zu. Im Falle von Hsc70-HER2/neu_{TE} zeigte die Immunisierung mit 500 pmol die schwächste Immunantwort, wohingegen mit 100 pmol und noch verstärkt mit 250 pmol Protein eine höhere Zytotoxizität erreicht wurde. Bei *m.tub.*Hsp70-HER2/neu_{TE} ließ sich eine tendenzielle Dosisabhängigkeit erkennen, da mit 500 pmol eine höhere Immunantwort erreicht wurde als vergleichsweise mit geringeren Proteinmengen. Das Protein Hsp70L1-HER2/neu_{TE} zeigte wiederum

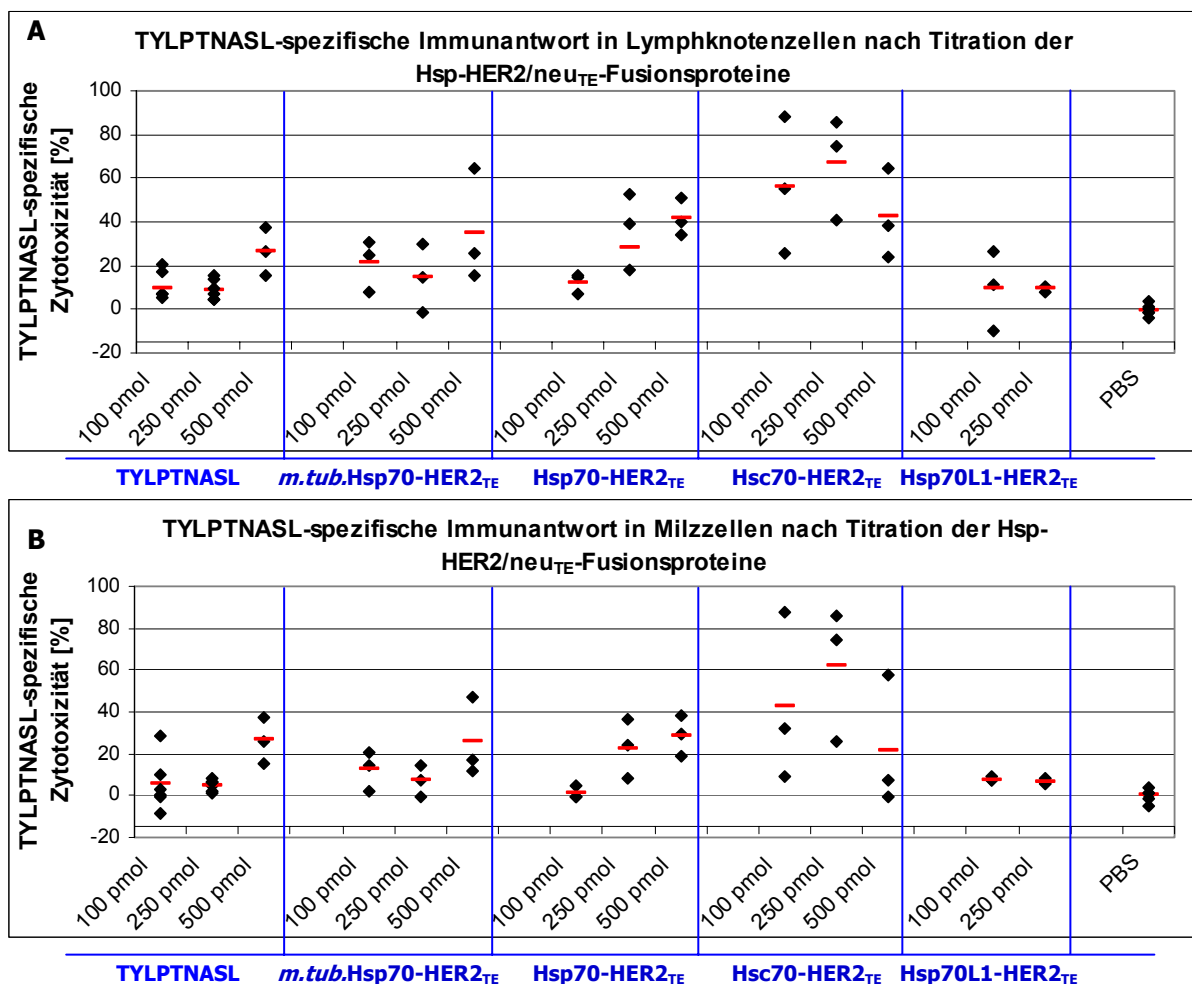


Abbildung 31: Titration der Hsp-HER2/neu_{TE}-Fusionsproteine in BALB/c-Mäusen. Die Mäuse wurden mit unterschiedlichen Mengen an Protein bzw. Peptid in Kombination mit 100 nmol T_HOVA und 5 μ g CpG subkutan immunisiert. Die antigenspezifische T-Zellzytotoxizität wurde an Tag 14 nach zweimaliger Immunisierung *in vivo* in Lymphknoten (A) und in der Milz (B) untersucht. Während bei Hsp70-HER2/neu_{TE} eine klare Dosisabhängigkeit zu erkennen war, zeigte die Immunisierung mit Hsc70-HER2/neu_{TE} bei niedrigen Proteinmengen die stärkste Immunantwort. Sowohl bei *m.tub.*Hsp70-HER2/neu_{TE} als auch beim Peptid TYLPTNASL zeigte sich eine tendenzielle Dosisabhängigkeit, da mit 500 pmol die stärkste Zytotoxizität erreicht wird. Das Protein Hsp70L1-HER2/neu_{TE} besaß keine Immunogenität.

keinerlei Immunogenität, was die Ergebnisse aus **6.3.3** bestätigt. Ähnlich konnte auch bei der Peptidimmunisierung mit Peptidmengen unter 500 pmol keine Immunantwort induziert werden. Ein Vergleich der TYLPTNASL-spezifischen T-Zellaktivitäten nach der Protein- bzw. Peptidimmunisierung machte deutlich, dass in Kombination mit 5 µg des Adjuvans CpG die Proteine *m.tub*.Hsp70-HER2/neu_{TE}, Hsp70-HER2/neu_{TE} und Hsc70-HER2/neu_{TE} immunogener waren als äquimolare Mengen des Peptids, was bereits in **6.3.4** gezeigt werden konnte. Bei der Immunisierung mit geringen Mengen (100 pmol und 250 pmol) zeigte sich, dass Hsc70-HER2/neu_{TE} im Vergleich zu den übrigen Fusionsproteinen immunogener wirkte.

6.3.6 Vergleich der Immunogenität der Hsp-HER2/neu₂₆₋₁₃₆-Fusionsproteine

Analog zu den bisher untersuchten Hitzeschockfusionsproteinen mit zwei hintereinander gestellten K^d-T-Zellepitopen (HER2/neu_{TE}) wurden auch Proteine hergestellt, die ein längeres Fragment aus der humanen HER2/neu-Sequenz enthielten (HER2/neu₂₆₋₁₃₆). Ausgehend von dem etablierten Immunisierungsprotokoll wurden BALB/c-Mäuse zweimal im Abstand von einer Woche mit 500 pmol der Proteine in Kombination von 5 µg CpG und 100 nmol des T-Helferepitops T_hOVA subkutan immunisiert. Unter diesen Bedingungen zeigten die zuvor untersuchten Fusionsproteine die höchste Immunogenität. Die noch verbleibende Kontamination durch Endotoxin betrug bei den Proteinen HER2/neu₁₋₁₃₆ und tat-HER2/neu₂₆₋₁₃₆ 0.89 bzw. 0.58 ng LPS pro appliziertem Protein (1.37 bzw. 0.9 EU/µg) und lag damit höher als bei den restlichen Proteinen, die einen Restgehalt von 3.1 bis 84.0 pg pro Immunisierung aufwiesen (0.005-0.057 EU/µg).

Die Analyse der Milzzellen bzw. der drainierenden Lymphknoten zeigte, dass ähnlich zu den vorigen Ergebnissen das Protein Hsc70-HER2/neu₂₆₋₁₃₆ mit 30.8 % die höchste T-Zellantwort induzierte im Vergleich zu den anderen Fusionsproteinen und eine stärkere Immunogenität besaß als 500 pmol des Peptids, das als Kontrolle eingesetzt und analog appliziert wurde (Abb. 32A). Auch *m.tub*.Hsp70-HER2/neu₂₆₋₁₃₆ wirkte immunogen, während das Protein Hsp70-HER2/neu₂₆₋₁₃₆ mit 16.3 % eine schlechtere Immunantwort auslöste als das äquivalente Konstrukt mit den beiden K^d-Epitopen wie in **6.3.4** beschrieben. Wiederum konnte das Fusionsprotein Hsp70L1-HER2/neu₂₆₋₁₃₆ im Vergleich zu den anderen Proteinen keine TYLPTNASL-spezifische T-Zellantwort induzieren. Die Kontrollproteine HER2/neu₂₆₋₁₃₆ bzw. HER2/neu₁₋₁₃₆, die keinen Hitzeschockfusionsanteil besitzen, konnten weder in der Milz noch in den drainierenden Lymphknoten der immunisierten BALB/c-Mäuse eine TYLPTNASL-spezifische Immunantwort auslösen.

Als weitere Kontrolle wurde das HER2/neu₂₆₋₁₃₆ Protein mit zusätzlichem N-terminalen Zellpenetrierungspeptid tat analysiert (tat-HER2/neu₂₆₋₁₃₆). Das tat-Peptid sollte zur verbesserten Proteinaufnahme beitragen. Abbildung 32 zeigt, dass eine TYLPTNASL-spezifische Immunität von 17.7 % in den Lymphknoten und 17.8 % in der Milz erreicht werden konnte (Abb. 32). Parallel zur TYLPTNASL-spezifischen Immunantwort wurde auch eine TYLPANASL-spezifische T-Zellaktivität

analysiert. In keinem der Ansätze jedoch war eine Kreuzreaktivität gegen TYLPANASL detektierbar (nicht gezeigt).

Die Hsp-HER2/neu₂₆₋₁₃₆-Fusionsproteine induzierten also grundsätzlich eine TYLPTNASL-spezifische Immunogenität in BALB/c-Mäusen, wengleich diese schwächer war als die der Hsp-HER2/neu_{TE}-Fusionsproteine.

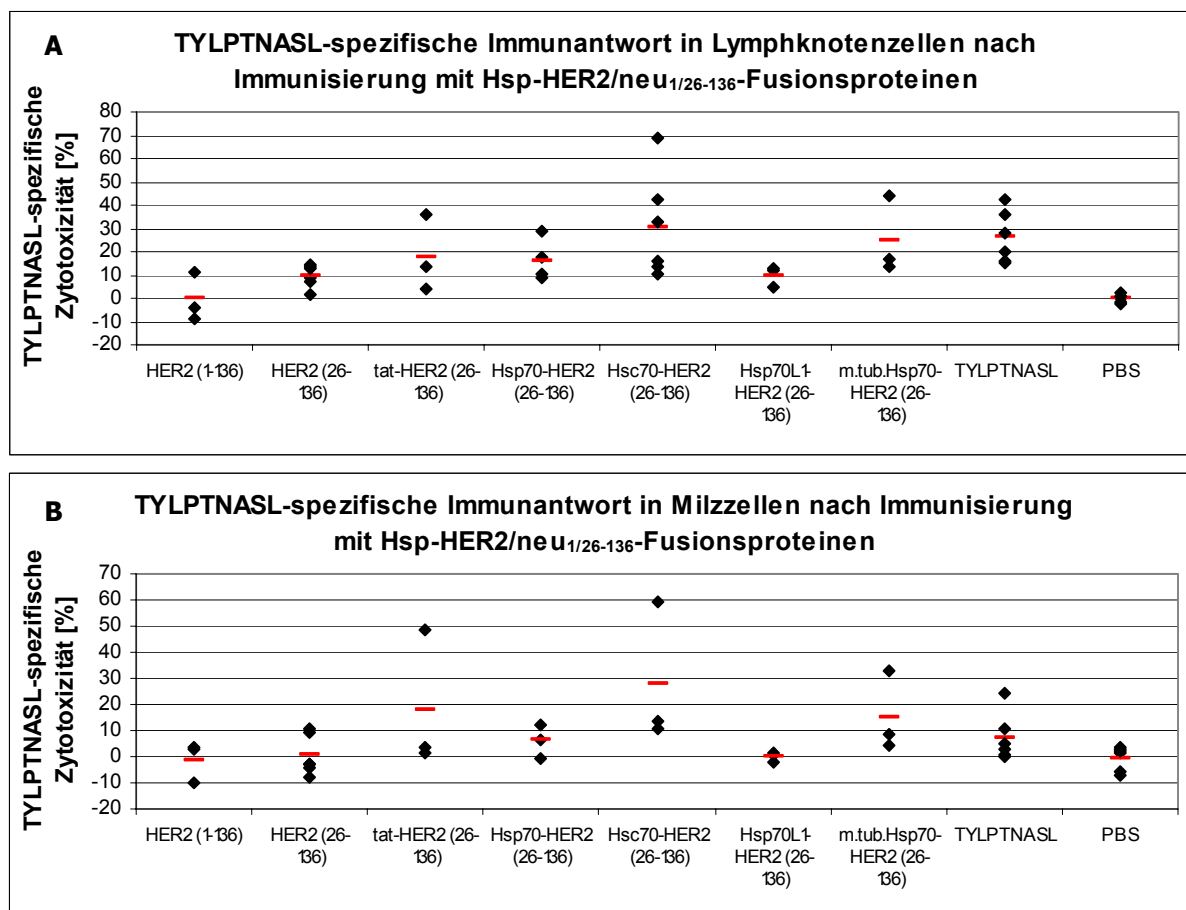


Abbildung 32: Immunisierung von BALB/c-Mäusen mit Hsp-HER2/neu₂₆₋₁₃₆-Fusionsproteinen. BALB/c-Mäuse wurden mit 500 pmol der Proteine bzw. 500 pmol TYLPTNASL-Peptid in Kombination mit 100 nmol T_hOVA und 5 µg CpG subkutan an Tag 0 und Tag 7 immunisiert. Die TYLPTNASL-spezifische T-Zellzytotoxizität wurde an Tag 14 *in vivo* in Lymphknoten (A) und Milz (B) untersucht. Das Protein Hsc70-HER2/neu₂₆₋₁₃₆ induzierte im Vergleich zu den übrigen Proteinen die stärkste Immunantwort, gefolgt von *m.tub.*Hsp70-HER2/neu₂₆₋₁₃₆. Hsp70-HER2/neu₂₆₋₁₃₆ und Hsp70L1-HER2/neu₂₆₋₁₃₆ waren deutlich weniger immunogen. Auch die HER2/neu-Proteine ohne den Hsp-Fusionsanteil konnten keine TYLPTNASL-spezifische Immunantwort induzieren. Im Gegensatz dazu löste tat-HER2/neu₂₆₋₁₃₆ eine mit *m.tub.*Hsp70-HER2/neu₂₆₋₁₃₆ vergleichbare Immunantwort aus.

6.3.7 Etablierung der HER2/neu-spezifischen Immunantwort in HHD-Mäusen

Parallel zum BALB/c-Modell sollte auch in HHD-Mäusen eine HER2/neu-spezifische Immunantwort durch eine Peptidimmunisierung etabliert werden. Als Peptid wurde hier das in den Hsp-HER2/neu-

Fusionsproteinen enthaltene HLA-A2-restringierte CD8⁺ T-Zellepitop KIFGSLAFL (HER2/neu₃₆₉₋₃₇₇) verwendet. Die Strategie sah vor, die Mäuse subkutan mit 100 nmol KIFGSLAFL zu immunisieren und die Milzzellen nach 10 Tagen für 5 weitere Tage *in vitro* zu restimulieren. Analog zum BALB/c-Modell wurde auch hier das Peptid in Kombination mit 100 nmol des T-Helferepitops aus dem Hepatitis-B-Virus (T_hHBV_{core}) und inkomplettem Freund-Adjuvans injiziert. Ein ebenfalls HLA-A2-restringiertes CD8⁺ T-Zellepitop aus der Reversen Transkriptase des *Human Immunodeficiency Virus* (HIV-RT) wurde als Kontrollpeptid verwendet und analog zu je 100 nmol in HHD-Mäuse injiziert. Abbildung 33A zeigt, dass in Mäusen, die mit KIFGSLAFL bzw. HIV-RT immunisiert wurden, peptidspezifische Immunantworten induziert werden konnten. In Kontrolltieren, die mit PBS immunisiert wurden, konnte diese T-Zell-spezifische IFN γ -Produktion nicht detektiert werden. Nach fünftägiger Restimulation *in vitro* mit 1 μ M KIFGSLAFL bzw. mit 1 μ M des Kontrollpeptids HIV-RT konnte die Frequenz der

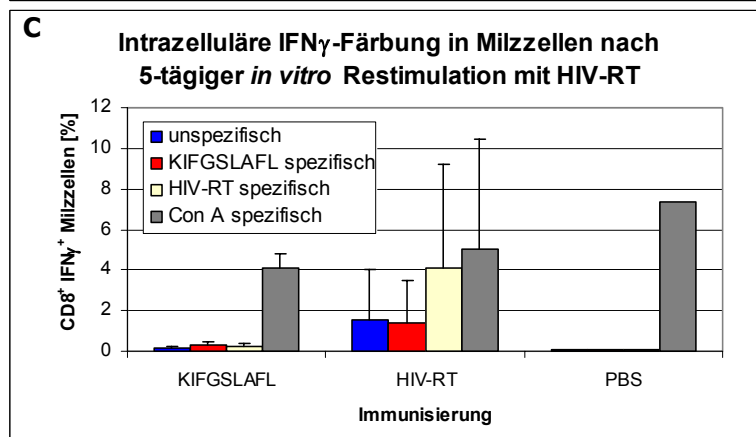
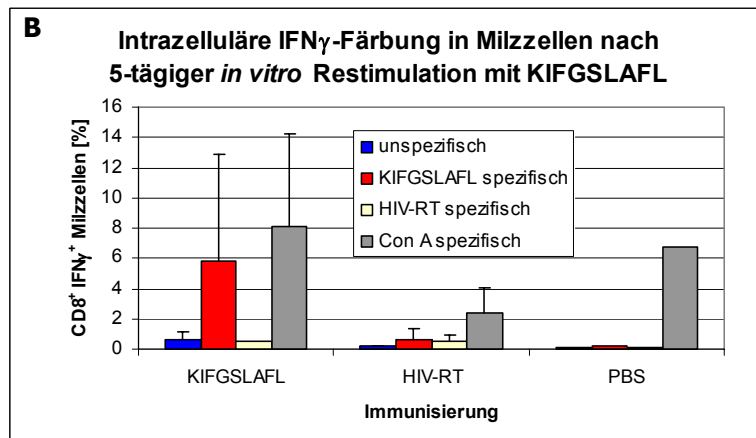
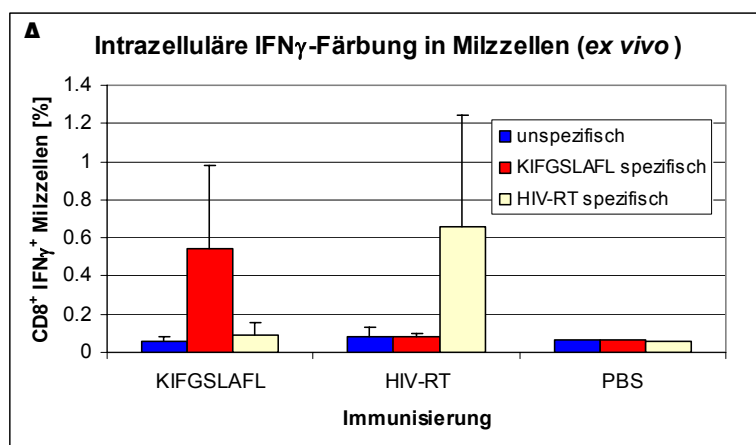


Abbildung 33: Etablierung der HER2/neu-spezifischen T-Zellantworten in HHD-Mäusen.

HHD-Mäuse wurden mit 100 nmol des CD8⁺ T-Zellepitops KIFGSLAFL subkutan in Kombination mit 100 nmol des T-Helferepitops T_hHBV_{core} 1:1 in IFA immunisiert. Als Kontrollpeptid wurde HIV-RT analog immunisiert. Die Peptidimmunisierung induzierte eine antigenspezifische Immunantwort *ex vivo* (A), die nach 5-tägiger *in vitro* Restimulation weiter verstärkt wurde. Während der Restimulation fand keine *in vitro* priming statt, da keine HIV-RT-spezifische IFN γ -Produktion in KIFGSLAFL restimulierten T-Zellen detektiert werden konnte, sondern nur eine KIFGSLAFL-spezifische (B). Umgekehrt zeigten Milzzellen aus HIV-RT immunisierten Mäusen nach einer Restimulation mit HIV-RT eine antigenspezifische Immunantwort, aber keine gegen KIFGSLAFL (C).

antigenspezifischen T-Zellen um das 6 bis 10fache gesteigert werden (Abb. 33B und 33C). Umgekehrt wurde keine Immunantwort gegen das zweite Peptid induziert, es trat also kein *in vitro priming* ein. Die kurzzeitige Restimulation der Milzzellen mit dem Antigen Concanavalin A (Con A) diente der Funktionalitätskontrolle der T-Zellen. In allen Restimulationsansätzen mit Con A war eine IFN γ -Produktion der T-Zellen zu beobachten, was zeigt, dass diese funktionell waren.

Analog zum BALB/c-Mausmodell gelang es somit auch in HHD-Mäusen eine HER2/neu-spezifische Immunantwort durch eine Peptidimmunisierung zu induzieren.

6.3.8 Vergleich der Immunogenität der Hsp-HER2/neu₂₉₉₋₅₇₉-Fusionsproteine in HHD-Mäusen

Parallel zu den Immunisierungen in BALB/c wurden auch Hitzeschockfusionsproteine für das Mausmodell HHD hergestellt. Diese Fusionsproteine enthielten eine HER2/neu-Teilsequenz (HER2/neu₂₉₉₋₅₇₉), die das HLA-A2-restringierte CD8⁺ T-Zellepitop KIFGSLAFL beinhaltet. Das Protein Hsc70-HER2/neu₂₉₉₋₅₇₉ konnte in einer für die Immunisierung nur unzureichenden Konzentration hergestellt werden, so dass auf die Untersuchung dieses Proteins im HHD-System verzichtet wurde. Um die Immunogenität der Proteine *m.tub.*Hsp70-HER2/neu₂₉₉₋₅₇₉ und Hsp70-HER2/neu₂₉₉₋₅₇₉ zu überprüfen, wurde das in BALB/c-Mäusen etablierte Immunisierungsprotokoll angewandt und die Mäuse mit 500 pmol Protein in Kombination mit 50 μ g CpG und 100 nmol CD4⁺ T-Helferepitop zweimal im Abstand von einer Woche subkutan immunisiert. Als Helferepitop wurde hier eine Sequenz aus dem Hepatitis-B-Virus (T_HHBV_{core}) eingesetzt. Die Bestimmung des Restgehalts an LPS in den applizierten Proteinlösungen ergab Werte von 9.4 bis 96.0 pg LPS pro Injektion (0.002-0.019 EU/ μ g). Wie in Abbildung 33 gezeigt, konnte durch eine Immunisierung mit dem KIFGSLAFL-Peptid eine spezifische Immunantwort induziert werden. Daher wurde als Kontrolle 100 nmol des Peptids analog appliziert. Die Zellen aus der Milz bzw. den drainierenden Lymphknoten wurden 7 Tage nach der letzten Immunisierung anhand der intrazellulären IFN γ -Färbung bzw. über einen Zytotoxizitätstest auf antigenspezifische T-Zellaktivität überprüft.

Während nach der Peptidimmunisierung wie erwartet in den Lymphknoten mit 1.9 % und in der Milz mit 1 % eine KIFGSLAFL-spezifische IFN γ -Sekretion detektierbar war, zeigten weder die Fusionsproteine *m.tub.*Hsp70-HER2/neu₂₉₉₋₅₇₉ und Hsp70-HER2/neu₂₉₉₋₅₇₉, noch die unfusionierten Hitzeschockproteine oder HER2/neu₂₉₉₋₅₇₉ alleine eine erkennbare spezifische Immunantwort (Abb. 34A und 34B). Verglichen wurde die antigenspezifische T-Zellantwort mit unbeladenen Zellen (unspezifisch) bzw. mit Zellen, die mit einem irrelevanten Peptid mit identischer HLA-Restriktion kurzzeitig stimuliert worden waren (HIV-RT-spezifisch). Die Untersuchung der KIFGSLAFL-spezifischen T-Zellzytotoxizitäten in der Milz zeigte wiederum keinerlei Reaktivität der T-Zellen nach einer Immunisierung mit den Fusionsproteinen, HER2/neu oder den Hitzeschockproteinen alleine, während nach der Applikation des Peptids eine T-Zellantwort von 19.5 % zu messen war (Abb. 34D). In den Lymphknoten dagegen

konnte für das Protein *m.tub.Hsp70-HER2/neu*₂₉₉₋₅₇₉ eine mit dem Peptid vergleichbare Zytotoxizität von 21.5 % gemessen werden, was nicht mit den Daten der IFN γ -Färbung in Übereinstimmung ist. Eine Reproduktion der durch *m.tub.Hsp70-HER2/neu*₂₉₉₋₅₇₉ induzierten KIFGSLAFL-spezifischen Immunantwort gelang nicht, ebenso konnten die antigenspezifischen T-Zellantworten der beiden getesteten Fusionsproteine durch andere Adjuvantien wie Titermax oder komplettes Freund-Adjuvans nicht gesteigert bzw. induziert werden (nicht gezeigt). Daher stellte sich im HHD-Modell anders als im

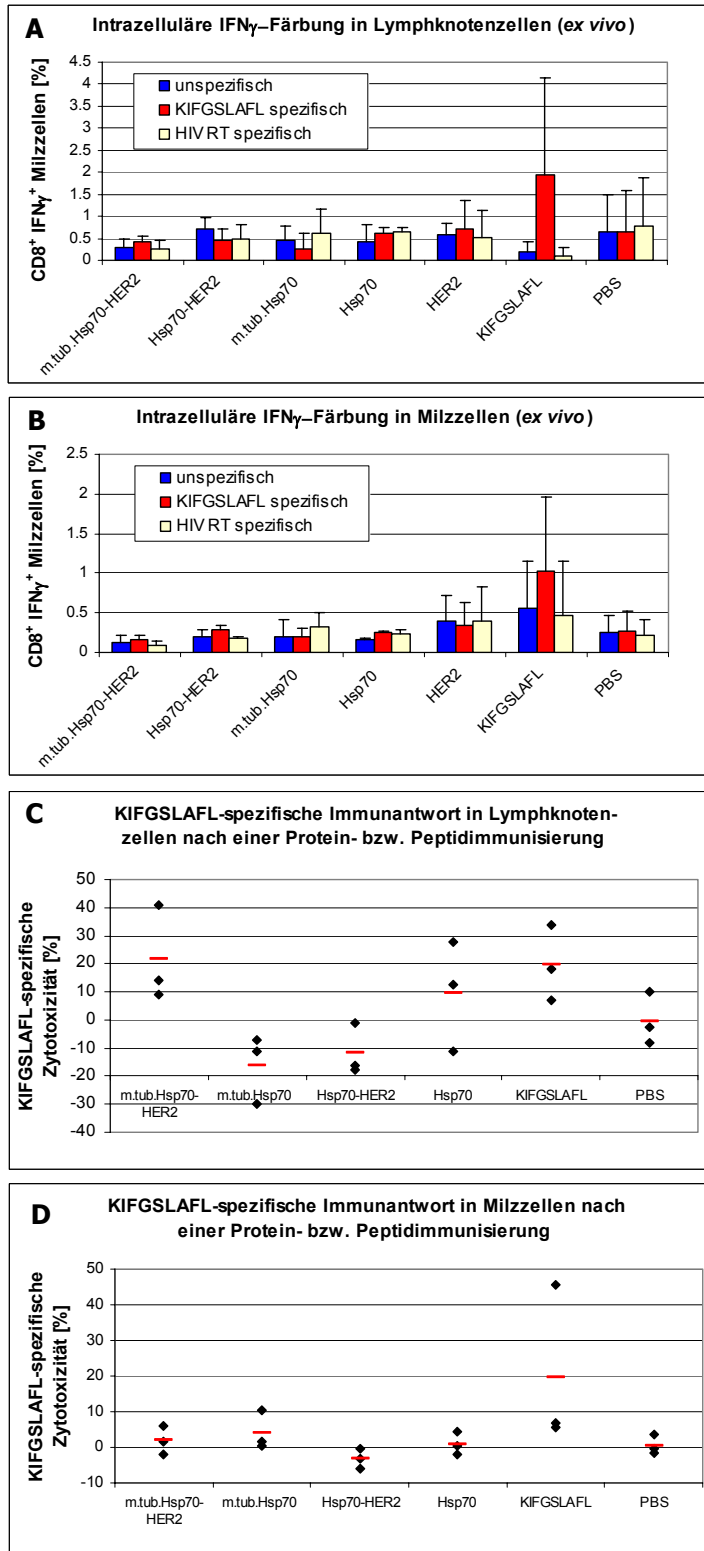


Abbildung 34: Immunisierung von HHD-Mäusen mit Hsp-HER2/*neu*₂₉₉₋₅₇₉-Fusionsproteinen. HHD-Mäuse wurden mit 500 pmol der Proteine bzw. 100 nmol KIFGSLAFL-Peptid in Kombination mit 100 nmol T_hHBV_{core} und 50 μ g CpG subkutan an Tag 0 und Tag 7 immunisiert. Die antigenspezifische IFN γ -Sekretion wurde *ex vivo* und die T-Zellzytotoxizität *in vivo* an Tag 14 in Lymphknoten und Milz untersucht. Durch die IFN γ -Färbung konnte nur nach der Peptidimmunisierung eine KIFGSLAFL-spezifische Immunantwort detektiert werden. Weder *m.tub.Hsp70-HER2/neu*₂₉₉₋₅₇₉, noch *Hsp70-HER2/neu*₂₉₉₋₅₇₉ induzierten eine spezifische Immunität (A und B). Auch die Untersuchung der T-Zellzytotoxizität zeigte kein Signal nach der Immunisierung mit *Hsp70-HER2/neu*₂₉₉₋₅₇₉, während wie erwartet das Peptid eine spezifische Antwort auslöste. Im Fall von *m.tub.Hsp70-HER2/neu*₂₉₉₋₅₇₉ konnte zwar in den Lymphknoten ein KIFGSLAFL-spezifisches Signal detektiert werden, nicht aber in Milzzellen (C und D).

BALB/c-Modell heraus, dass die Hitzeschockfusionsproteine keine ausreichende Immunogenität besaßen, um eine messbare HER2/neu-spezifische Immunantwort auszulösen.

Da von dem Peptid KIFGSLAFL 100 nmol und damit die 200fache Menge im Vergleich zum Protein eingesetzt wurde, sollte in einem neuen Ansatz die Peptid-, sowie die Proteinmenge variiert werden. Damit konnte überprüft werden, ob die Menge der Proteine in den vorigen Experimenten zu gering war und daher keine T-Zellaktivität ausgelöst wurde. HHD-Mäuse wurden mit 500 pmol bzw. 5 nmol des Proteins *m.tub.Hsp70-HER2/neu*₂₉₉₋₅₇₉ bzw. mit 500 pmol und 100 nmol KIFGSLAFL in Kombination mit 100 nmol T_hHBV_{core} und 50 µg CpG im Falle des Peptids bzw. 5 µg CpG im Falle der Proteine subkutan immunisiert. Der Endotoxinrestgehalt betrug 21 pg pro 500 pmol des Proteins *m.tub.Hsp70-HER2/neu*₂₉₉₋₅₇₉ (0.01 EU/µg). Am Tag 10 nach der Immunisierung wurden die drainierenden Lymphknoten und die Milz entnommen, um die Zellen über fünf Tage *in vitro* mit 1 µM KIFGSLAFL zu restimulieren. Die antigenspezifische IFN γ -Sekretion dieser Zellen ist in Abbildung 35 dargestellt. Es zeigte sich, dass sowohl 500 pmol des Peptids als auch dieselbe Menge an Protein keine Immunogenität besitzen. Auch die 10fache Menge an *m.tub.Hsp70-HER2/neu*₂₉₉₋₅₇₉ (5 nmol) konnte keine KIFGSLAFL-spezifische Immunantwort auslösen. 100 nmol des Peptids dagegen induzierten wie erwartet eine spezifische IFN γ -Sekretion in den CD8⁺ T-Zellen der Milz und der Lymphknoten.

Somit gelang es im HHD-Modell nicht, durch die Hsp-Fusionsproteine eine HER2/neu-spezifische Immunogenität zu induzieren, während im BALB/c-Modell unter äquivalenten Immunisierungsbedingungen antigenspezifische Immunantworten gemessen werden konnten.

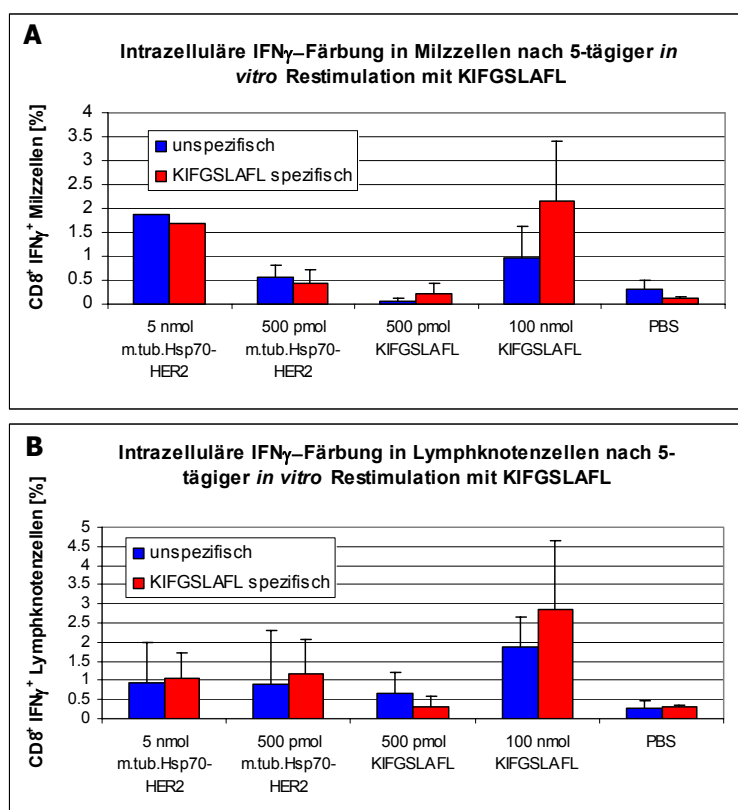


Abbildung 35: Vergleich unterschiedlicher Protein- und Peptidmengen in HHD-Mäusen. Die antigenspezifische Aktivität der CD8⁺ T-Zellen aus der Milz und den Lymphknoten wurde nach einmaliger Immunisierung mit *m.tub.Hsp70-HER2/neu*₂₉₉₋₅₇₉ in Kombination mit 5 µg CpG bzw. mit KIFGSLAFL in Kombination mit 50 µg CpG und 100 nmol T_hHBV_{core} und fünftägiger *in vitro* Restimulation mit 1 µM Peptid mittels intrazellulärer IFN γ -Färbung untersucht. Es zeigte sich, dass das Peptid bei einer Dosis von 100 nmol sowohl in der Milz (A) als auch in den Lymphknoten (B) eine KIFGSLAFL-spezifische Immunantwort induzierte, diese Immunogenität aber verlor, wurde es in geringerer Dosis appliziert. Für das Protein dagegen konnte weder bei 500 pmol noch bei 5 nmol eine antigenspezifische IFN γ -Sekretion beobachtet werden.

6.3.9 Erhöhung der HER2/neu-spezifischen Immunität in HHD-Mäusen durch Peptidmodifikationen

Die bisherigen Ergebnisse zeigten, dass im HHD-Mausmodell mit den Hsp-HER2/neu₂₉₉₋₅₇₉-Fusionsproteinen keine messbare KIFGSLAFL-spezifische Immunantwort induziert werden konnte. Die Immunisierung der Mäuse mit dem Peptid selbst dagegen ergab sowohl in Milzzellen als auch in den drainierenden Lymphknoten eine spezifische T-Zellantwort. Neben der im Vergleich zum Peptid geringeren Proteindosis könnte ein weiterer Grund für die Ineffizienz der Proteine die homologe Sequenz des Antigens sein. Analog zum K^d-restringierten CD8⁺ T-Zellepitop PYVSRLLGI, das neben TYLPTNASL als HER2/neu-spezifisches Antigen in den Fusionsproteinen für das BALB/c-Modell eingesetzt wurde, war auch das aus der humanen Sequenz verwendete HLA-A2 Epitop KIFGSLAFL homolog zur murinen Sequenz.

Zur Untersuchung, in wie weit die Sequenzhomologie die Immunogenität der Peptide beeinflusste, wurden HHD-Mäuse mit KIFGSLAFL (HER2/neu₃₆₉₋₃₇₇) und zwei weiteren HLA-A2-restringierten CD8⁺ T-Zellepitopen aus der humanen HER2/neu-Sequenz immunisiert (ILHNGAYSL, HER2/neu₄₃₅₋₄₄₂ und ALCRWGLLL, HER2/neu₅₋₁₃). Die murinen Sequenzen dieser Peptide zeichnen sich durch einen Aminosäureaustausch an einer bzw. zwei Positionen in den Epitopen aus (IHLDGAYSL bzw. AWCRWGELL). 100 nmol der humanen bzw. murinen CD8⁺ T-Zellepitope wurden zusammen mit 100 nmol T_HHBV_{core} und 50 µg CpG subkutan appliziert (Abb. 36). Zellen aus der Milz und den Lymphknoten wurden an Tag 10 nach der Immunisierung für 5 Tage *in vitro* mit 1 µM des jeweiligen Peptids restimuliert und auf antigenspezifische IFN γ -Sekretion überprüft. Es zeigte sich, bezüglich des Peptids IHLNGAYSL, dass sowohl mit der humanen als auch mit der murinen Sequenz in HHD-Mäusen eine antigenspezifische Immunantwort induziert werden konnte (Abb. 36A). Im Gegensatz dazu trat bei der Immunisierung mit ALCRWGLLL eine peptidspezifische T-Zellantwort auf, während das murine Peptid AWCRWGELL diese nicht induzieren konnte.

Der Vergleich der Immunantworten dieser Peptide mit KIFGSLAFL machte deutlich, dass die HER2/neu-spezifische IFN γ -Sekretion, die durch ILHNGAYSL bzw. ALCRWGLLL ausgelöst wurde, geringer als die durch KIFGSLAFL induzierte Immunantwort war, was zeigt, dass KIFGSLAFL trotz der Homologie zur murinen Sequenz die stärkste Immunogenität besitzt. Um eine mögliche Steigerung der KIFGSLAFL-spezifischen Immunantwort zu erreichen, wurde ein modifiziertes Epitop eingesetzt, das an Position 2 und 9 statt Isoleucin bzw. Leucin ein Valin enthält (Vertuani *et al.*, 2004). Die Abbildungen 36B und 36C zeigen, dass durch diese Peptidmodifikation nicht nur eine starke KIFGSLAFL-spezifische T-Zellantwort, sondern auch eine starke Immunantwort zur murinen Sequenz KIFGSLAFL erzielt werden konnte. Diese KIFGSLAFL-spezifische Immunität wurde auch nach der Immunisierung mit einem verlängerten KIFGSLAFL-Peptid erreicht, welches N-terminal zusätzlich die tat-Translokationssequenz enthielt. Es zeigte sich, dass diese Peptidmodifikation einerseits eine hohe KIFGSLAFL-spezifische Immunantwort induzierte, aber auch umgekehrt KIFGSLAFL-spezifische T-Zellen aktivierte. Der Vergleich mit der durch das homologe Peptid induzierten Immunantwort machte deutlich, dass die KIFGSLAFL-spezifische T-Zellantwort in HHD-Mäusen durch modifizierte Peptide in

der Milz um das 16fache (KVFGSLAFV) bzw. um das 30-fache (tat-KIFGSLAFL) und in den Lymphknoten um das 6 bis 8fache gesteigert werden konnte.

Analog zu den Ergebnissen im HHD-Mausmodell sollte auch im BALB/c-System die Modifikation des CD8⁺ T-Zellepitops TYLPTNASL durch eine N-terminale vorangestellte tat-Translokationssequenz in Bezug auf die Peptid-induzierte Immunantwort untersucht werden. Dazu wurden die Tiere mit 100 nmol bzw. 500 pmol des jeweiligen Peptids in Kombination mit 100 nmol T_hOVA und 50 µg CpG im Abstand von 7 Tagen zweimal subkutan immunisiert und die spezifische T-Zellzytotoxizität eine Woche nach der letzten Immunisierung *in vivo* untersucht. Die in Abbildung 37 gegenübergestellten antigenspezifischen T-Zellantworten zeigen, dass wie bereits in 6.3.4 dargestellt, die Immunisierung mit 500 pmol TYLPTNASL im Gegensatz zu 100 nmol des Peptids eine stärkere T-Zellzytotoxizität induzierte (Abb. 37A). Die zusätzliche tat-Translokationssequenz am Peptid steigerte diese Immunantwort entgegen der Beobachtungen im HHD-Mausmodell nicht. In den Lymphknoten konnte mit einer T-Zellzytotoxizität von 18.7 % bei einer Menge von 100 nmol zwar eine TYLPTNASL-spezifische T-Zellaktivität detektiert werden, diese war aber deutlich geringer als die des Peptids

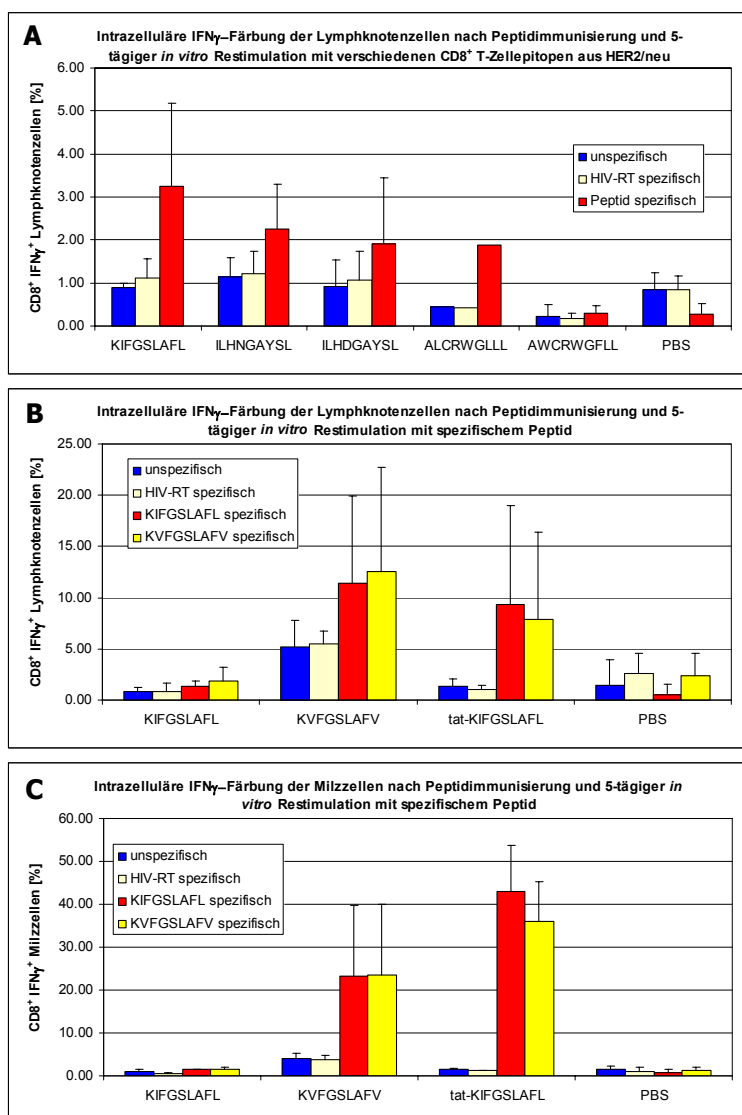


Abbildung 36: Immunisierung von HHD-Mäusen mit modifizierten Peptiden. Zur Untersuchung der Auswirkung der Sequenzhomologie bzw. von Peptidmodifikationen auf die Immunogenität der Peptide wurden HHD-Mäuse mit 100 nmol des CD8⁺ T-Zellepitops in Kombination mit 100 nmol T_hHBV_{core} und 50 µg CpG subkutan immunisiert. An Tag 10 wurden die Zellen aus Milz und Lymphknoten für 5 weitere Tage mit 1 µM des spezifischen Peptids *in vitro* restimuliert. Die Untersuchung der antigenspezifischen IFN_γ-Sekretion zeigte eine peptidspezifische Immunantwort durch KIFGSLAFL sowie durch die humanen Peptide IHLNGAYS L und ALCRWG LLL (A). Auch die murine Sequenz IHLDGAYS L konnte eine peptidspezifische T-Zellantwort auslösen. Modifikationen des Peptids KIFGSLAFL ermöglichten zusätzlich zur Immunantwort gegen das modifizierte Peptid auch die Induktion einer KIFGSLAFL-spezifischen Immunität. Dabei stieg die spezifische T-Zellantwort im Vergleich zur Immunisierung mit dem homologen Peptid in der Milz um das 16 bzw. 30fache (B) und in den Lymphknoten um das 6 bis 8fache (C).

alleine, wenn es mit 500 pmol eingesetzt wurde (37.7 %). In der Milz zeigte sich, dass 100 nmol des tat-Peptids mit 16.7 % eine vergleichbare Immunität induzierte wie 500 pmol TYLPTNASL (Abb. 37B). 500 pmol des tat-modifizierten Peptids lösten keine antigenspezifische Immunantwort aus. Ebenso wenig konnten die tat-modifizierten Peptide eine Immunität gegen das murine Epitop TYLPANASL induzieren (nicht gezeigt).

Somit wurde deutlich, dass die in HHD-Mäusen induzierte HER2/neu-spezifische Immunogenität durch Peptidmodifikationen deutlich erhöht werden konnte, während dies im BALB/c-System nicht gelang.

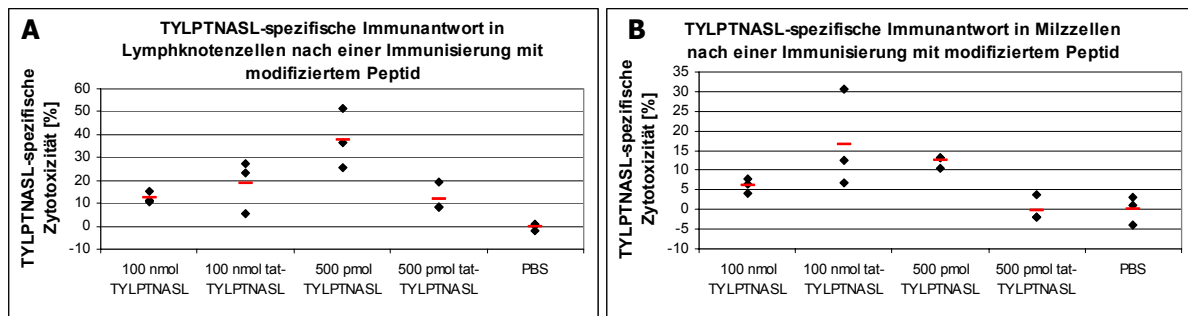


Abbildung 37: Immunisierung von BALB/c-Mäusen mit modifizierten Peptiden. BALB/c-Mäuse wurden mit 100 nmol bzw. 500 pmol des CD8⁺ T-Zellepitops TYLPTNASL mit oder ohne die zusätzliche N-terminale tat-Translokationssequenz in Kombination mit 100 nmol T_hOVA und 50 µg CpG subkutan an Tag 0 und Tag 7 immunisiert. Eine Woche nach der letzten Immunisierung wurde die antigenspezifische T-Zellzytotoxizität *in vivo* in der Milz und den drainierenden Lymphknoten untersucht. Die durch 500 pmol TYLPTNASL in den Lymphknoten induzierte spezifische T-Zellantwort von 37.7 % konnte durch die Modifikation des Peptids nicht gesteigert werden (A). In der Milz zeigte eine Immunisierung mit 100 nmol des tat-modifizierten Peptids eine mit 500 pmol TYLPTNASL vergleichbare T-Zellantwort von 16.7 % (B).

In Abschnitt 6.3 wurde gezeigt, dass sowohl im BALB/c-Mausmodell als auch in HHD-Mäusen HER2/neu-spezifische Immunantworten gegen die humanen Epitope TYLPTNASL bzw. KIFGSLAFL induzierbar sind. Für eine erfolgreiche Peptidimmunisierung wurde neben dem CD8⁺ T-Zellepitop ein CD4⁺ T-Helferepitop benötigt und ein zusätzliches Adjuvans wie IFA oder CpG. Zur Evaluierung der verschiedenen Hitzeschockproteine hinsichtlich ihres Adjuvanzeffektes wurden Fusionsproteine untersucht, die zwei in Reihe klonierte K^d-restringierten CD8⁺ T-Zellepitope aus der humanen HER2/neu-Sequenz enthielten. Drei der vier untersuchten Hsp-HER2/neu_{TE}-Fusionsproteine induzierten eine antigenspezifische Immunantwort gegen das Modellantigen TYLPTNASL, wenn sie in Kombination mit dem Helferepitop und CpG verabreicht wurden. Die unfusionierten Hitzeschockproteine hatten keinen immunogenen Effekt. Die Adjuvansmenge spielte bei der Immunogenität der Proteine eine entscheidende Rolle, da die T-Zellantwort bei einer mittleren CpG-Menge (5 µg) stärker war als bei hohen Dosen (50 µg). Umgekehrt korrelierte beim synthetischen Peptid die Immunogenität mit der CpG-Menge. Der direkte Vergleich zeigte, dass die Proteine Hsp70-HER2/neu_{TE} und Hsc70-HER2/neu_{TE} immunogener waren als *m.tub*.Hsp70-HER2/neu_{TE}, während durch Hsp70L1-HER2/neu_{TE} keine T-Zellaktivität induziert werden konnte. Alle drei immunogenen Proteine zeigten

bei 500 pmol eingesetzter Proteinmenge eine stärkere antigenspezifische Immunantwort als 100 nmol des Peptids. In Kombination mit 5 µg CpG besaßen Hsc70-HER2/neu_{TE} und Hsp70-HER2/neu_{TE} wiederum eine stärkere Immunogenität verglichen mit 500 pmol des Peptids, während *m.tub.Hsp70-HER2/neu_{TE}* eine mit dem Peptid vergleichbare Immunantwort induzierte. Bei geringen Adjuvansmengen (0.5 µg) zeigte das Protein Hsp70-HER2/neu_{TE} den besten stimulatorischen Effekt. Die effektive Induktion einer TYLPTNASL-spezifischen Immunantwort durch Hsc70-HER2/neu konnte auch mit einem analogen Fusionsprotein, das die HER2/neu-Sequenz 26-136 enthält, bestätigt werden. In HHD-Mäusen gelang die Induktion einer spezifischen T-Zellantwort gegen das Selbstepitop KIFGSLAFL, dessen Sequenz im humanen und murinen System identisch ist, durch die Immunisierung mit Peptid, jedoch nicht durch die Hitzeschockfusionsproteine. Die Applikation von sequenzmodifizierten Peptiden ermöglichte eine Steigerung der antigenspezifischen Immunantwort. Die Induktion einer gegen das Selbstpeptid (TYLPANASL) gerichteten Immunantwort gelang im BALB/c-Modell weder durch eine Immunisierung mit Peptid oder den Hsp-Fusionsproteinen, noch durch Peptidmodifikationen.

6.4 Induktion einer Hsp-HER2/neu-Fusionsprotein vermittelten anti-tumoralen Immunantwort in BALB/c-Mäusen

Im vorigen Abschnitt konnte gezeigt werden, dass die Hitzeschockfusionsproteine Hsp70-HER2/neu_{TE}, Hsc70-HER2/neu_{TE} und *m.tub.Hsp70-HER2/neu_{TE}* eine HER2/neu-spezifische Immunantwort in BALB/c-Mäusen auslösten. *In vivo* bzw. *ex vivo* wurde eine antigenspezifische T-Zellzytotoxizität und IFN γ -Produktion in CD8⁺ T-Zellen detektiert. Im Folgenden wurde untersucht, ob diese durch die Proteine induzierte Immunität ausreicht, um in BALB/c-Mäusen das Wachstum von HER2/neu exprimierenden Tumoren zu verhindern.

6.4.1 Überprüfung der Tumorzelllinie D2F2/E2 auf HER2/neu-Expression

Die Zelllinie D2F2/E2 ist eine murine Mammakarzinomzelllinie aus BALB/c, die mit humanem HER2/neu transfiziert wurde und inzwischen als etabliertes Transplantationstumormodell in BALB/c-Mäusen eingesetzt wird (Piechocki *et al.*, 2001). Um zu überprüfen, ob die Zelllinie das Membranmolekül HER2/neu überexprimiert, wurden durchflusszytometrische Analysen durchgeführt. Die spezifische Färbung der Oberflächenmoleküle zeigte, dass die Transfektante D2F2/E2 im Vergleich zur parentalen Zelllinie D2F2 HER2/neu deutlich überexprimiert (Abb. 38B). Auch das MHC-Klasse-I-Molekül H-2K^d wird in diesen Zellen stärker exprimiert als in D2F2 (Abb. 38A). Als Kontrolle wurden

die Zellen jeweils mit den Sekundärantikörpern alleine angefärbt, dabei zeigten sich keine Hintergrundsignale.

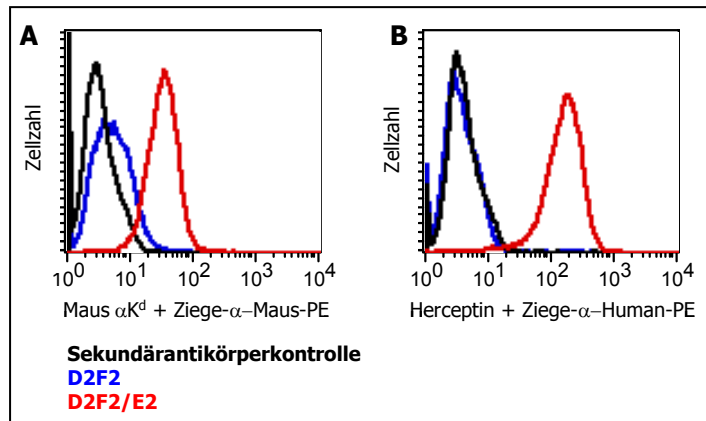


Abbildung 38: Zelloberflächenanalyse der Transfektante D2F2/E2. Zur Überprüfung der HER2/neu-Überexpression in der Mammakarzinomzelllinie D2F2/E2 wurde die Oberflächenexpression durchflusszytometrisch nachgewiesen. Während auf der parentalen Zelllinie D2F2 das Protein HER2/neu nicht detektiert werden konnte, wurde es in D2F2/E2 stark exprimiert. Das MHC-Klasse-I-Molekül H-2K^d wurde auch in D2F2/E2 stärker exprimiert als in D2F2.

6.4.2 Inhibition des Tumorwachstums in BALB/c durch prophylaktische Immunisierung mit den Hsp-HER2/neu-Fusionsproteinen

A) Antitumorale Wirkung der Hsp-HER2/neu_{TE}-Fusionsproteine

Die Fragestellung, ob durch prophylaktische Immunisierung der BALB/c-Mäuse mit den Hitzeschockfusionsproteinen das Wachstum der D2F2/E2-Tumoren verhindert bzw. verzögert werden kann, wurde zunächst am Protein *m.tub.Hsp70-HER2/neu_{TE}* bearbeitet. Die Tiere wurden mit 500 pmol dieses Proteins bzw. 100 nmol des Peptids TYLPTNASL in Kombination mit 100 nmol des CD4⁺ T-Helferepitops T_HOVA zweimal im Abstand von 7 Tagen subkutan immunisiert. Der Restgehalt an LPS in der Proteinprobe betrug 28 pg Endotoxin pro 500 pmol appliziertes Protein (0.038 EU/μg). Fünf Tage nach der letzten Immunisierung wurden die Tumorzellen D2F2/E2 bzw. der parentale Tumor D2F2 ebenfalls subkutan appliziert und das Tumorwachstum über 43 Tage verfolgt. Während, wie erwartet, die mit PBS injizierten Mäuse nach zirka 7 Tagen einen messbaren Tumor ausbildeten, der nach 23 Tagen auf ein maximales Volumen von 600 mm³ auswuchs, zeigten über die gesamte Beobachtungsdauer keine der mit *m.tub.Hsp70-HER2/neu* immunisierten Mäuse einen Tumor (Abb. 39A). In der Mausgruppe, der das Peptid verabreicht wurde, zeigte eine von fünf Mäusen ein Tumorwachstum. Die parentale Tumorzelllinie D2F2 dagegen konnte im Wachstum nicht behindert werden, weder durch die Protein- noch durch die Peptidimmunisierung. Abbildung 39B zeigt, dass die Tumoren in allen drei Gruppen ein vergleichbares Wachstum aufwiesen.

In Abschnitt 6.3.4 konnte gezeigt werden, dass die Fusionsproteine in Kombination mit 5 μg des Adjuvans CpG einen stärkeren immunstimulatorischen Effekt besaßen als in Zusammenhang mit 50 μg. Daher wurde für die Untersuchung aller vier Hitzeschockfusionsproteine in Bezug auf ihre antitumorale Wirkung jeweils 500 pmol des Proteins kombiniert mit 5 μg des Adjuvans eingesetzt. Das restliche LPS in den Proteinlösungen lag bei einem Wert zwischen 4.4 und 19.0 pg pro Injektion (0.005-0.038 EU/μg). Da, wie in 6.3.4 beschrieben, auch festgestellt wurde, dass 500 pmol des Peptids effektiver

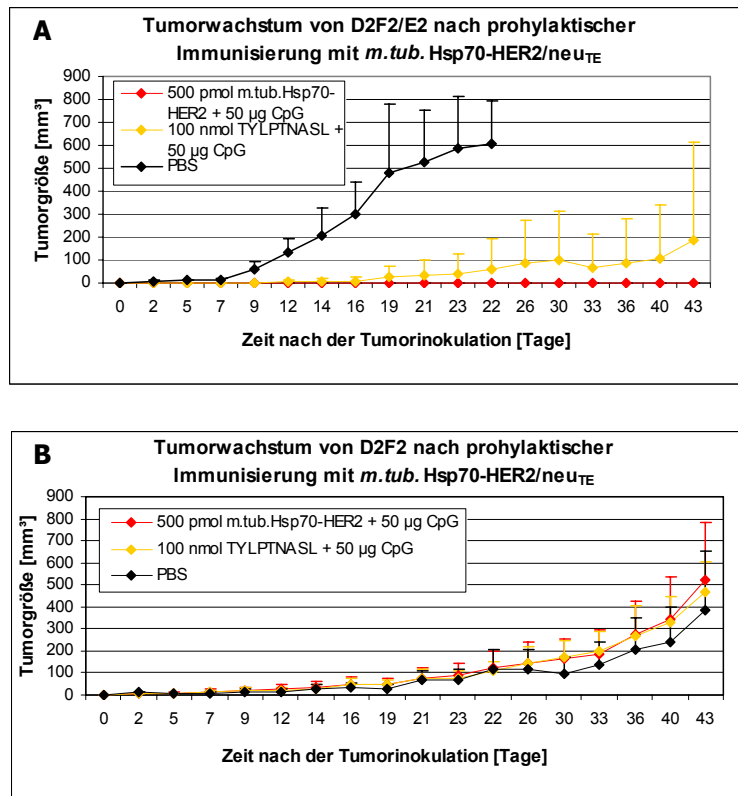


Abbildung 39: *M.tub.*Hsp70-HER2/neu_{TE} induzierte Inhibition des Tumorwachstums von D2F2/E2 in BALB/c-Mäusen. Die Tiere wurden mit 500 pmol Protein bzw. 100 nmol TYLPTNASL in Kombination mit 100 nmol T_hOVA und 50 µg CpG zweimal im Abstand von 7 Tagen subkutan immunisiert. 5 Tage nach der letzten Immunisierung erfolgte die Applikation von 5×10^5 Tumorzellen. Mäuse, die nur PBS erhalten hatten, entwickelten wie erwartet nach ungefähr einer Woche einen tastbaren Tumor, der nach 22 Tagen auf eine Größe von zirka 600 mm³ angewachsen war. Alle Mäuse, die mit *m.tub.*Hsp70-HER2_{TE} immunisiert wurden, waren vor einem Tumorwachstum über einen Zeitraum von 43 Tagen geschützt. Bei den Peptid-immunisierten Mäusen zeigte ein Tier eine Tumorentwicklung (A). Weder TYLPTNASL noch *m.tub.*Hsp70-HER2_{TE} verhinderten das Wachstum des parentalen Tumors D2F2 (B).

als 100 nmol waren, sollte dieser Mengenvergleich auch hier untersucht werden. Die Proteine bzw. Peptide wurden zusammen mit 100 nmol des Helferepitops T_hOVA und 5 µg CpG bzw. ohne Adjuvans an Tag 0 und 7 subkutan appliziert. Wiederum 5 Tage nach der letzten Immunisierung wurden die Tumorzellen D2F2/E2 ebenfalls subkutan injiziert und das Tumorwachstum verfolgt. Abbildung 40A zeigt, dass die Proteine Hsp70-HER2/neu_{TE} und Hsc70-HER2/neu_{TE} ohne zusätzliches Adjuvans eine deutliche antitumorale Wirkung besaßen. Im Vergleich zu 100 nmol Peptid wurde durch die prophylaktische Immunisierung mit den Proteinen das Wachstum des Tumors D2F2/E2 über einen Zeitraum von 41 Tagen signifikant verlangsamt ($P = 0.017$ für Hsp70-HER2/neu_{TE}; $P = 0.016$ für Hsc70-HER2/neu_{TE}). In Kombination mit 5 µg CpG konnte durch Hsc70-HER2/neu_{TE} das reprimierte Tumorwachstum nochmals gesteigert werden, so dass eine Signifikanz von $P = 0.0003$ erreicht wurde. Der antitumorale Effekt des Proteins Hsp70-HER2/neu_{TE} konnte mit CpG nicht verbessert werden. Das Protein ohne zusätzliches Adjuvans induzierte bereits ein deutlich verlangsamtes Tumorwachstum ($P = 0.02$). Die Kombination von 100 nmol TYLPTNASL mit 5 µg CpG konnte das Wachstum des Tumors D2F2/E2 in BALB/c nicht verhindern oder verlangsamen (Abb. 40B). Im Unterschied dazu konnten 500 pmol des Peptids, wenn es mit Adjuvans verabreicht wurde, ähnlich zu *m.tub.*Hsp70-HER2/neu_{TE} das Tumorwachstum bis Tag 22 deutlich inhibieren ($P = 0.002$ für TYLPTNASL; $P = 0.003$ für *m.tub.*Hsp70-HER2/neu_{TE}) (Abb. 40D). Interessanterweise zeigte auch Hsp70L1-HER2/neu_{TE} einen signifikanten antitumoralen Effekt, wobei analog zu Hsc70-HER2/neu_{TE} der antitumorale Effekt des Proteins durch zusätzliches CpG weiter erhöht wurde ($P = 0.004$ ohne CpG; $P = 0.0001$ mit CpG). Für *m.tub.*Hsp70-HER2/neu_{TE} ohne CpG konnte keine Verlangsamung des Tumorwachstums beobachtet werden, ebenso wenig wie für 500 pmol TYLPTNASL (Abb. 40C). Der antitumorale Effekt des Peptids

in Kombination mit 5 µg CpG verlief in den ersten 24 Tagen der Wachstumskontrolle analog zu den Proteinen *m.tub.Hsp70-HER2/neu_{TE}* bzw. *Hsp70L1-HER2/neu_{TE}*. Nach weiteren 13 Tagen (an Tag 37) konnte aber in den Peptid behandelten Mäusen ein mittleres Tumolvolumen von ungefähr 2000 mm³ gemessen werden, was mehr als doppelt so groß war, als das der Protein behandelten Tiere (Abb. 40 D).

B) Antitumorale Wirkung der Hsp-HER2/neu₂₆₋₁₃₆-Fusionsproteine

Der antitumorale Effekt der Hitzeschockfusionsproteine sollte auch mit den HER2/neu₂₆₋₁₃₆-fusionierten Konstrukten analysiert werden. Analog zu den vorigen Experimenten wurden die Tiere zunächst zu zwei Zeitpunkten im Abstand von 7 Tagen mit jeweils 500 pmol des Proteins bzw. 500 pmol TYLPTNASL-Peptid in Kombination mit 100 nmol T_hOVA entweder ohne Adjuvans oder mit 5 µg CpG subkutan immunisiert. Der Restgehalt des Endotoxins in den Proteinlösungen lag bei einem LPS-Wert zwischen 3.1 und 63.0 pg (0.005-0.9 EU/µg) pro Injektion. 5 Tage nach dieser prophylaktischen Immunisierung wurden die Tumorzellen ebenfalls subkutan appliziert und das Tumorstadium verfolgt. In Verbindung mit dem Adjuvans CpG zeigten alle Hsp-HER2/neu₂₆₋₁₃₆-Fusionsproteine im Vergleich zu den PBS injizierten Mäusen eine signifikante Verlangsamung des Tumorstadiums ($P < 0.001$) und damit ein damit längeres Überleben (Abb. 41A und 41B). In diesem Zusammenhang wurde als Kontrolle nicht das Peptid TYLPTNASL, sondern das unfusionierte Protein HER2/neu₂₆₋₁₃₆ verwendet. Ebenso wie die Hitzeschockfusionsproteine zeigte auch HER2/neu₂₆₋₁₃₆ in Kombination mit CpG einen signifikanten antitumoralen Effekt nach prophylaktischer Immunisierung. Dieser Effekt trat ebenfalls nach einer Immunisierung dieses Proteins ohne das Adjuvans CpG auf, wenn auch weniger deutlich ($P = 0.0037$). Sowohl Hsp70-HER2/neu₂₆₋₁₃₆ als auch Hsc70-HER2/neu₂₆₋₁₃₆ zeigten auch ohne CpG noch ein verlangsamtes Tumorstadium, welches aber nicht signifikant war (Abb. 41C).

C) Antitumorale Wirkung der tat-Hsp-HER2/neu₂₆₋₁₃₆-Fusionsproteine

In Abschnitt 6.3.6 konnte bereits gezeigt werden, dass die N-terminale Translokationssequenz (tat) eine stärkere HER2/neu-spezifische T-Zellzytotoxizität hervorrief als das gleiche Protein ohne diese zusätzliche Sequenz (Abb. 32). Zur Untersuchung, ob die tat-Sequenz auch Einfluss auf den antitumoralen Effekt der HER2/neu-Fusionsproteine nimmt, wurden wiederum BALB/c-Mäuse mit je 500 pmol Protein bzw. Peptid wie oben beschrieben prophylaktisch immunisiert. Dabei wurde auf die zusätzliche Injektion des CpG verzichtet. Die Messung des LPS-Gehalts in den Proteinlösungen ergab einen Wert von 48 pg pro 500 pmol tat-Hsc70-HER2/neu₂₆₋₁₃₆, was im Bereich der sonstigen Werte für die rekombinanten Proteine lag. Bei den Proteinen tat-Hsc70-HER2/neu₂₆₋₁₃₆ bzw. tat-HER2/neu₂₆₋₁₃₆ allerdings wurden mit 381 pg bzw. 547 pg weitaus höhere LPS-Kontaminationen gemessen. Der Vergleich der Tumorstadiumskurven in Abbildung 41D zeigt, dass im Gegensatz zum Peptid die Proteine tat-Hsp70-HER2/neu₂₆₋₁₃₆ und tat-Hsc70-HER2/neu₂₆₋₁₃₆ bis Tag 17 nach der Injektion der Zellen das Tumorstadium signifikant verzögerten ($P = 0.0015$ für tat-Hsp70-HER2/neu₂₆₋₁₃₆ bzw. $P = 0.0006$ für tat-Hsc70-HER2/neu₂₆₋₁₃₆). Auch bei tat-HER2/neu₂₆₋₁₃₆ konnte im Vergleich zu den PBS Mäusen eine deutliche Verlangsamung des Tumorstadiums festgestellt werden ($P = 0.0018$). Das

Peptid selbst konnte die Ausbildung des Tumors nicht signifikant verlangsamen, was mit den Daten aus Abbildung 41C korreliert.

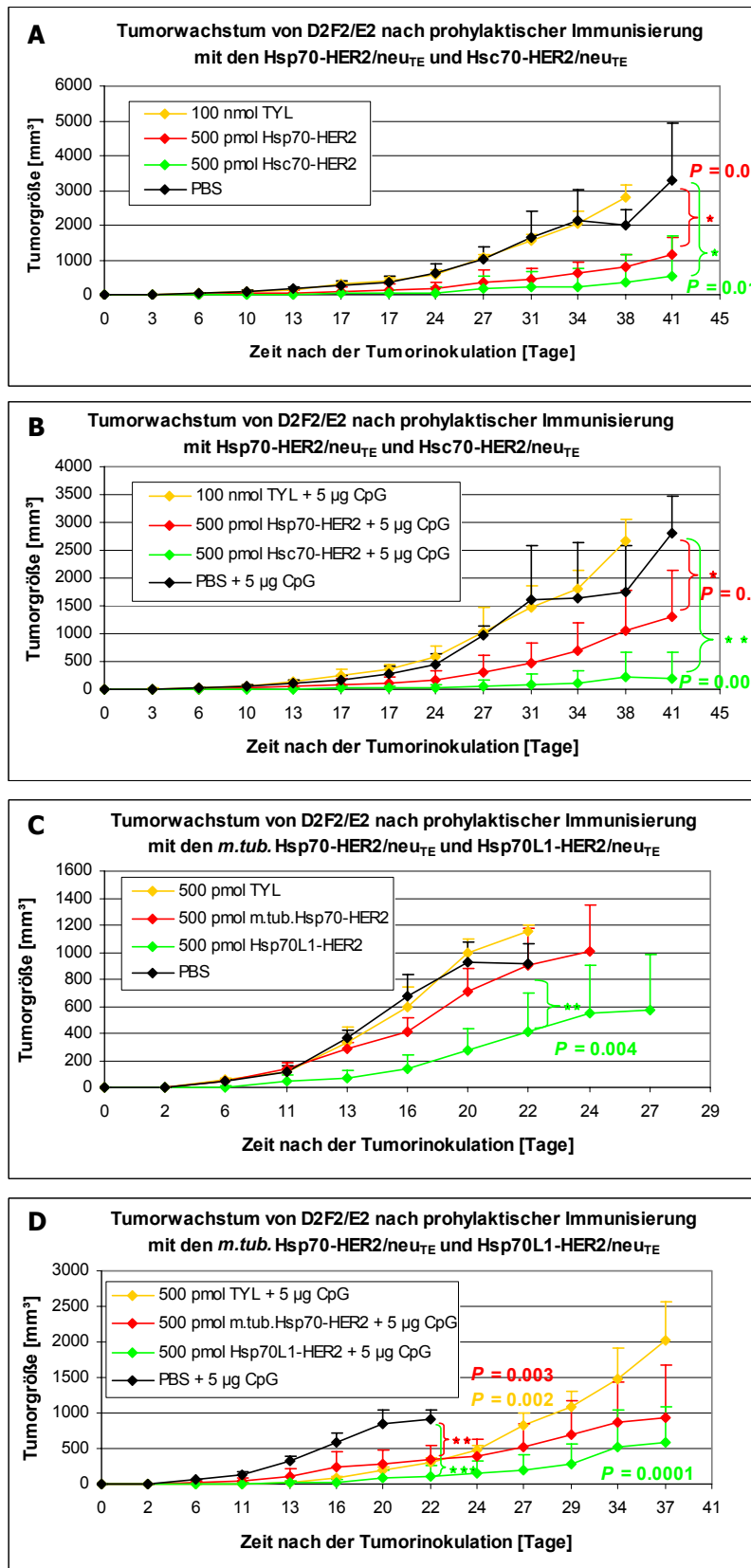


Abbildung 40: Vergleich der antitumoralen Wirkung der Hsp-HER2/neu_{TE}-Fusionsproteine nach prophylaktischer Immunisierung. Nach zweimaliger prophylaktischer subkutaner Immunisierung mit 500 pmol Protein bzw. TYLPTNASL in Kombination mit 100 nmol T_hOVA und 5 µg CpG bzw. ohne Adjuvans erfolgte die Applikation von 5 x 10⁵ Tumorzellen. Die Proteine Hsp70-HER2/neu_{TE} und Hsc70-HER2/neu_{TE} induzierten eine signifikante Verlangsamung des Tumorwachstums ($P = 0.017$ bzw. $P = 0.016$), die im Fall von Hsc70-HER2/neu_{TE} in Kombination mit 5 µg CpG gesteigert werden konnte ($P = 0.0003$) (A und B). 100 nmol Peptid besaß keinen antitumoralen Effekt. 500 pmol TYLPTNASL dagegen konnte in Kombination mit dem Adjuvans eine signifikante Verlangsamung des Tumorwachstums hervorrufen ($P = 0.002$), ebenso wie *m.tub.*Hsp70-HER2/neu_{TE} ($P = 0.003$) und Hsp70L1-HER2/neu_{TE} ($P = 0.0001$) (D). Während sowohl beim Peptid als auch bei *m.tub.*Hsp70-HER2/neu_{TE} für diesen antitumoralen Effekt zusätzlich CpG benötigt wurde, zeigte Hsp70L1-HER2/neu_{TE} eine signifikante Tumorreprimierung auf $P = 0.004$ (C).

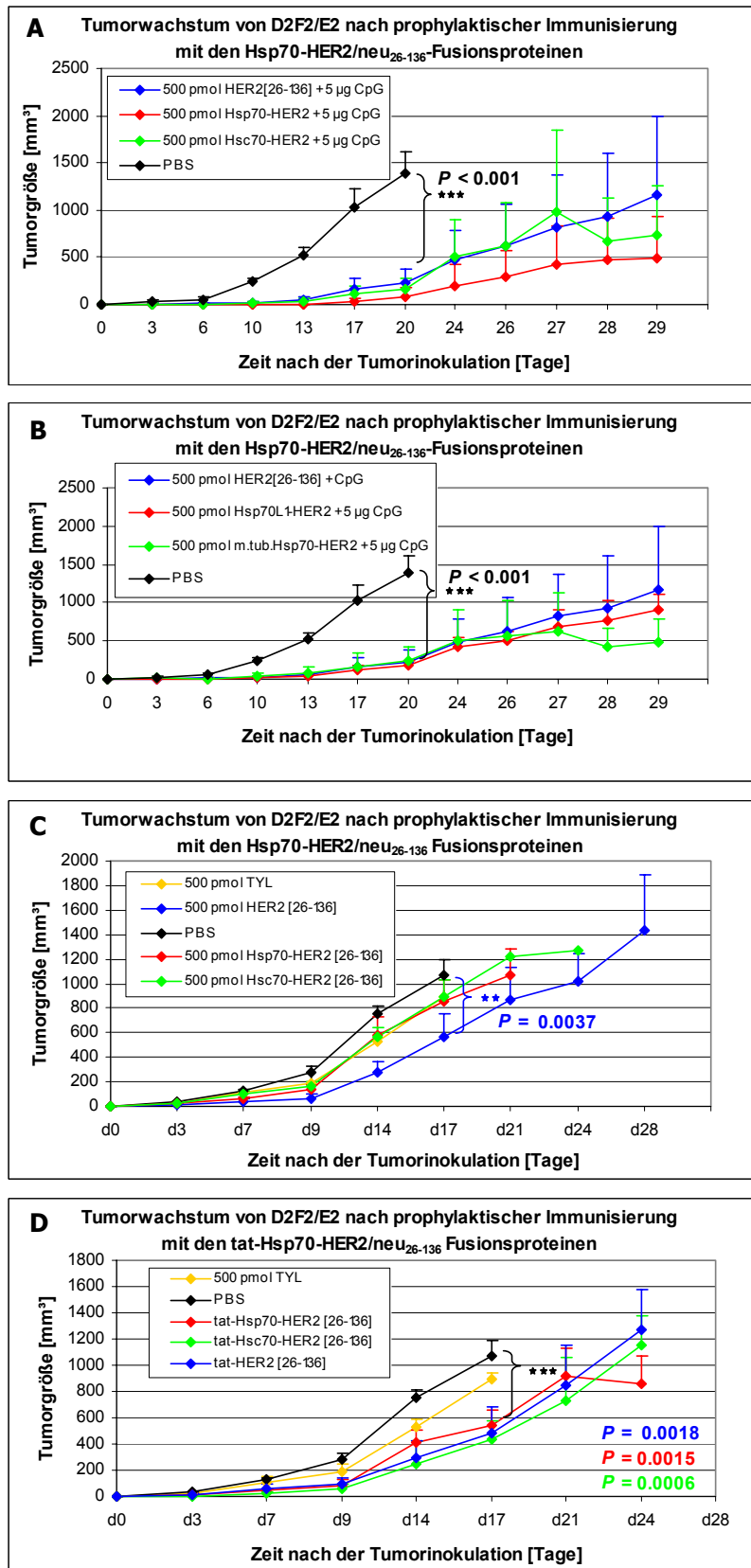


Abbildung 41: Vergleich der antitumoralen Wirkung der Hsp-HER2/neu₂₆₋₁₃₆-Fusionsproteine nach prophylaktischer Immunisierung. Nach zweimaliger prophylaktischer subkutaner Immunisierung mit 500 pmol Protein bzw. TYLPTNASL in Kombination mit 100 nmol T_HOVA und 5 µg CpG bzw. ohne Adjuvans erfolgte die Applikation von 5×10^5 Tumorzellen. Zusammen mit dem Adjuvans CpG induzierten die Proteine Hsp70-HER2/neu₂₆₋₁₃₆, Hsc70-HER2/neu₂₆₋₁₃₆, Hsp70L1-HER2/neu₂₆₋₁₃₆ und *m.tub.*Hsp70-HER2/neu₂₆₋₁₃₆ eine signifikante Verlangsamung des Tumorwachstums ($P < 0.001$) ebenso wie das unfusionierte Kontrollprotein HER2/neu₂₆₋₁₃₆. Ohne CpG dagegen konnte nur bei HER2/neu₂₆₋₁₃₆ eine signifikante Tumorverlangsamung detektiert werden ($P = 0.0037$) (C). Die Proteine tat-HER2/neu₂₆₋₁₃₆, tat-Hsp70-HER2/neu₂₆₋₁₃₆ und tat-Hsc70-HER2/neu₂₆₋₁₃₆ zeigten ohne zusätzliches Adjuvans im Vergleich zu 500 pmol Peptid ein signifikant langsames Wachstum des Tumors in BALB/c-Mäusen ($P = 0.0018$ für HER2/neu₂₆₋₁₃₆; $P = 0.0015$ für tat-Hsp70-HER2/neu₂₆₋₁₃₆ und $P = 0.0006$ für tat-Hsc70-HER2/neu₂₆₋₁₃₆) (D).

Diese Analysen zeigten, dass die verschiedenen Hsp-HER2/neu-Fusionsproteine neben ihrer Fähigkeit, antigenspezifische T-Zellzytotoxizität zu induzieren, auch eine prophylaktische antitumorale Wirkung in BALB/c-Mäusen aufwiesen. Während die Tiere nach einer Peptidimmunisierung einen Tumor entwickelten, konnte durch die Applikation der Proteine Hsp-HER2/neu_{TE} und Hsp-HER2/neu₂₆₋₁₃₆ in

Kombination mit CpG eine signifikante Tumorreprimierung erzielt werden. Auch ohne das zusätzliche Adjuvans war bei Hsp70-HER2/neu_{TE}, Hsc70-HER2/neu_{TE}, tat-Hsp70-HER2/neu₂₆₋₁₃₆, tat-Hsc70-HER2/neu₂₆₋₁₃₆ und auch bei Hsp70L1-HER2/neu_{TE}, das bisher keine HER2/neu-spezifische Immunogenität entwickelt hatte, eine deutliche Verlangsamung des Tumorwachstums zu beobachten. Allerdings zeigten auch die analogen HER2/neu-Proteine ohne den Hsp-Anteil einen mit den jeweiligen Fusionsproteinen vergleichbaren prophylaktischen antitumoralen Effekt.

6.4.3 *Rechallenge* der tumorfreien BALB/c-Mäuse nach prophylaktischer Immunisierung mit den Hsp-HER2/neu_{TE}-Fusionsproteinen

Die prophylaktische Immunisierung von BALB/c mit *m.tub.*Hsp70-HER2/neu_{TE} in Kombination mit 50 µg CpG verhinderte das Wachstum des Transplantationstumors D2F2/E2 in 5 von 5 Mäusen (Abb. 39A). Die Frage, ob durch diese Immunisierung neben der primären Immunantwort auch T-Zell-Gedächtnisantworten induziert werden, sollte anhand eines *Rechallenge* Experimentes geklärt werden. Dazu wurde den Tieren aus dem in Abbildung 39A dargestellten Experiment an Tag 27 nach der ersten Injektion eine zweite Dosis Tumorzellen appliziert. Sowohl in den Protein-immunisierten Mäusen als auch in den Tieren, die durch eine Immunisierung mit 100 nmol TYLPTNASL und 50 µg CpG zunächst keinen Tumor entwickelten, wurde eine Tumorentwicklung beobachtet (Abb. 42A). 4 von 5 Mäusen, die mit Hsc70-HER2/neu_{TE} immunisiert wurden, blieben bis Tag 41 nach der ersten Tumordinjektion tumorfrei (Abb. 40B). Nach einer wiederholten Applikation von HER2/neu-überexprimierenden Tumorzellen konnte allerdings kein Ausbleiben des Tumorwachstums festgestellt

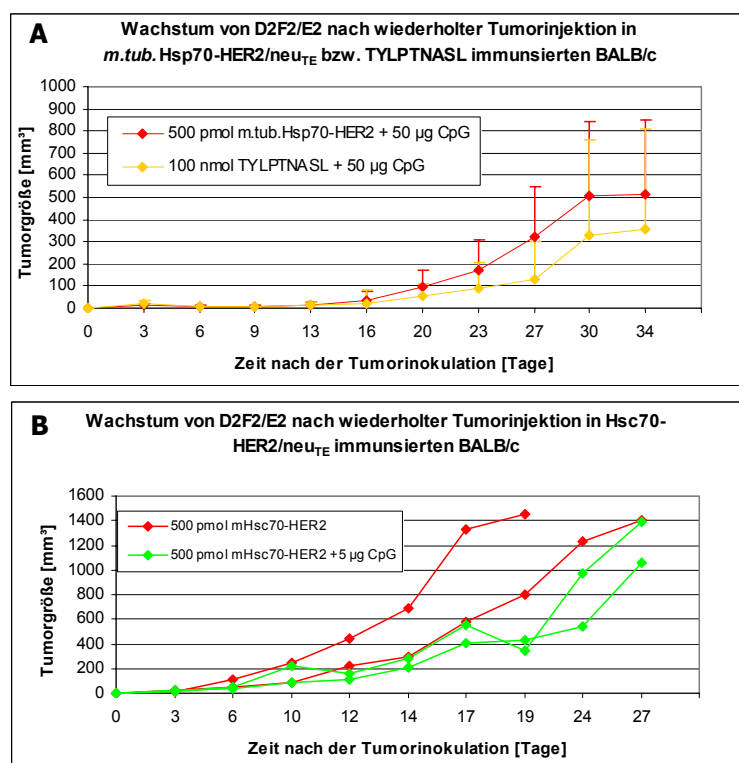


Abbildung 42: Wiederholte Tumordinjektion in tumorfreien BALB/c-Mäusen nach prophylaktischer Immunisierung. BALB/c-Mäuse wurden prophylaktisch mit *m.tub.*Hsp70-HER2/neu_{TE} oder Peptid in Kombination mit 50 µg CpG bzw. mit Hsc70-HER2/neu_{TE} zusammen mit 5 µg CpG oder ohne Adjuvans immunisiert. Nach einer ersten Injektion der Tumorzellen zeigten diese Mäuse kein Tumorwachstum und wurden daher im Falle von *m.tub.*Hsp70-HER2/neu_{TE} 27 Tage bzw. im Falle von Hsc70-HER2/neu_{TE} 41 Tage nach der ersten Tumordinjektion erneut mit D2F2/E2 injiziert. Weder in den Peptid-, noch in den Protein-immunisierten Mäusen konnte das Tumorwachstum verhindert werden.

werden (Abb. 42B). Somit wurde durch eine prophylaktische Immunisierung mit den Hitzeschockfusionsproteinen keine T-Zell-Gedächtnisantwort induziert.

6.4.4 Repression des Tumorwachstums durch therapeutische Immunisierung

Nachdem durch eine prophylaktische Immunisierung mit den Hsp-HER2/neu_{TE}-Fusionsproteinen eine signifikante Verlangsamung des Tumorwachstums D2F2/E2 in BALB/c zu beobachten war, sollte nun die Immunogenität der Proteine in einem therapeutischen Ansatz untersucht werden. Dazu wurden zunächst die Tumorzellen appliziert und nachdem der Tumor eine durchschnittliche Größe von 20 bis 30 mm³ erreicht hatte, wurden die Tiere alle 2 bis 3 Tage subkutan mit 100 pmol Protein in Kombination mit 20 nmol T_hOVA und 10 µg CpG therapeutisch immunisiert. Die Berechnung des Restgehalts an LPS pro 100 pmol Protein in den Proteinlösungen ergab Werte von 6.3 bis 18 pg für Hsp70-HER2/neu_{TE}, Hsc70-HER2/neu_{TE} (0.012-0.081 EU/µg) und *m.tub.*Hsp70-HER2/neu_{TE} bzw. 226 pg für Hsp70L1-HER2/neu_{TE} (0.56 EU/µg). In Abbildung 43A zeigt sich, dass weder die siebenmalige

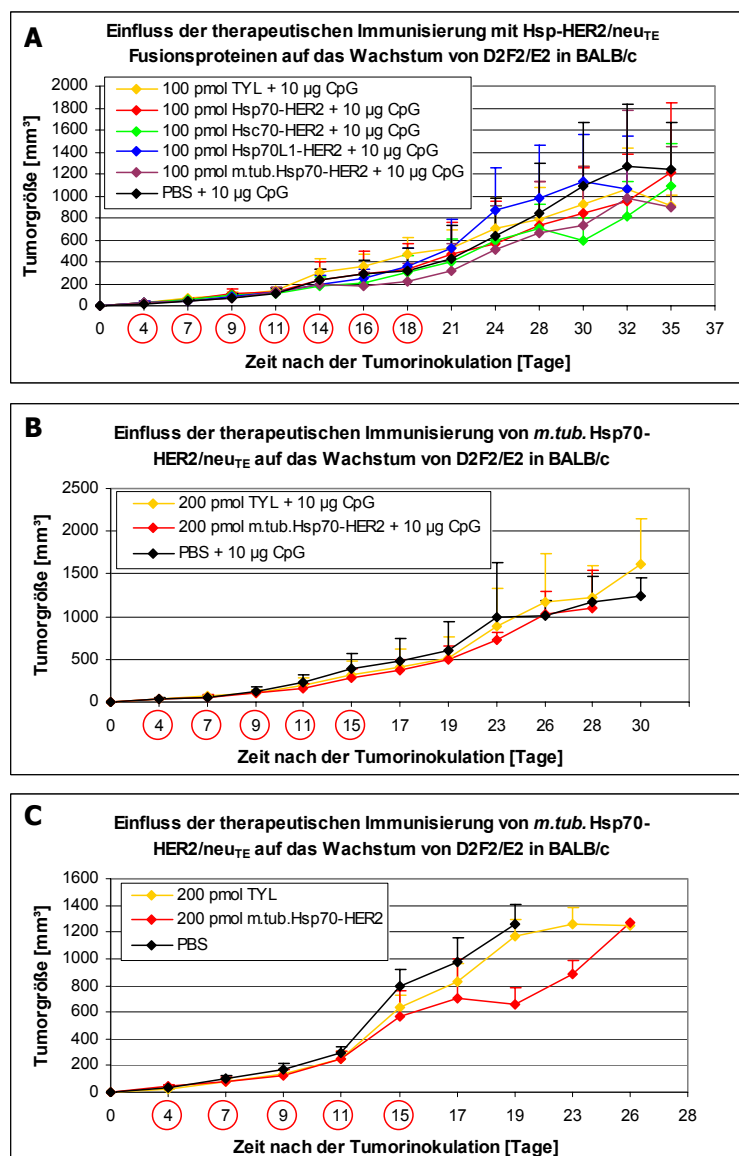


Abbildung 43: Therapeutische Immunisierung mit den Hsp-HER2/neu_{TE} Fusionsproteinen nach etabliertem D2F2/E2 Tumor in BALB/c. Nachdem ein subkutan injizierter Tumor eine durchschnittliche Größe von 20 – 30 mm³ erreicht hatte, wurden die Tiere mit 100 pmol Protein bzw. TYLPTNASL in Kombination mit 20 nmol T_hOVA und 10 µg CpG alle 2 bis 3 Tage peritumoral immunisiert (rote Kreise symbolisieren Injektionszeitpunkt). Keines der Hsp-HER2/neu_{TE} Fusionsproteine hat einen Einfluss auf das Tumorwachstum (A). Auch die Immunisierung mit Peptid reprimierte die Tumorbildung nicht. Eine Dosiserhöhung von *m.tub.*Hsp70-HER2/neu_{TE} auf 200 pmol pro Injektion mit oder ohne CpG kann das Tumorwachstum ebenso wenig verhindern (B und C).

Applikation der Hitzeschockfusionsproteine noch die Immunisierung mit TYLPTNASL im Vergleich zur Kontrollgruppe (PBS) eine Regression des etablierten Tumors bewirkte. In allen Tieren war ein zunehmendes Tumorwachstum zu beobachten. Auch die Immunisierung mit 200 pmol *m.tub*.Hsp70-HER2/neu in Kombination mit wiederum 10 µg CpG (Abb. 43B) bzw. ohne zusätzliches Adjuvans (Abb. 43C) nahm keinen Einfluss auf die Tumorausbildung. Somit konnte durch therapeutische Immunisierung mit den Hsp-HER2/neu_{TE}-Fusionsproteinen keine Zurückbildung eines etablierten D2F2/E2 Tumors in BALB/c bewirkt werden.

In Abschnitt 6.4 wurde wie bereits in 6.3 beschrieben der Adjuvanzeffekt der verschiedenen Hitzeschockproteinanteile in den Fusionsproteinen evaluiert, wobei hier nun der antitumorale Effekt der Proteine untersucht wurde. Es zeigte sich, dass die Hitzeschockfusionsproteine in BALB/c-Mäusen einen HER2/neu-spezifischen antitumoralen Effekt gegen einen Transplantationstumor entwickelten, welcher das humane HER2/neu überexprimiert, wenn sie prophylaktisch appliziert wurden. Im Falle der Fusionsproteine, die als HER2/neu-Anteil zwei K^d-restringierte Epitope enthalten, wurde beobachtet, dass die Proteine Hsp70-HER2/neu_{TE} und Hsc70-HER2/neu_{TE} ohne Zugabe eines weiteren Adjuvans das Tumorwachstum bis Tag 41 signifikant verlangsamen. Hsp70L1-HER2/neu_{TE} konnte das Wachstum des Tumors bis Tag 22 signifikant hemmen, ohne dass ein zusätzliches Adjuvans nötig war. *M.tub*.Hsp70-HER2/neu_{TE} besaß einen wachstumshemmenden Effekt in Kombination mit CpG. Das verabreichte Peptid erreichte einen zunächst tumorreprimierenden Effekt nur durch die zusätzliche Applikation von CpG.

Das Tumorwachstum eines bereits etablierten Tumors konnte durch therapeutische Immunisierung weder mit den Fusionsproteinen noch mit Peptid zurückgedrängt werden. Ebenso wenig wurde durch die prophylaktische Immunisierung ein HER2/neu-spezifisches immunologisches Gedächtnis entwickelt, das das Wachstum eines zweiten Tumors verlangsamt bzw. dessen Regression bewirkt.

Die prophylaktisch applizierten Hitzeschockfusionsproteine, die mit dem HER2/neu₂₆₋₁₃₆-Fragment fusioniert waren, bewirkten in Kombination mit einer mittleren Dosis CpG eine signifikante Verlangsamung des Tumorwachstums. Währenddessen zeigten Hsp70-HER2/neu₂₆₋₁₃₆ und Hsc70-HER2/neu₂₆₋₁₃₆, die eine zusätzliche N-terminale tat-Sequenz enthielten, einen vergleichbaren antitumoralen Effekt, auch wenn sie ohne das Adjuvans verabreicht wurden. Während das Peptid, wie beschrieben, stets nur in Kombination mit CpG tumorhemmend wirkte, konnten die Proteine HER2/neu₂₆₋₁₃₆ bzw. tat-HER2/neu₂₆₋₁₃₆ das Tumorwachstum nach prophylaktischer Immunisierung ohne Zugabe von CpG bis Tag 17 signifikant verlangsamen.

6.5 Induktion einer HER2/neu-spezifischen Immunantwort durch die Hsp-HER2/neu-Fusionsproteine *in vitro*

6.5.1 Maturierung von murinen dendritischen Zellen aus dem Knochenmark

Eine erfolgreiche Stimulation der antigenspezifischen T-Zellen setzt die Präsentation des Antigens durch dendritische Zellen (DC) und deren Reifung voraus. Um zu überprüfen, ob die Hitzeschockfusionsproteine einen maturierenden Effekt besitzen, wurden dendritische Zellen aus dem Knochenmark von BALB/c (BMDC) generiert und *in vitro* kultiviert. Die Beladung mit 0.5 μM der Fusionsproteine folgte an Tag 6 bis Tag 8 der Kultur. Um die Abhängigkeit der DC-Reifung von der Proteinmenge zu analysieren, wurden zusätzlich Zellen mit 1, 5 und 10 μM *m.tub.Hsp70-HER2/neu_{TE}* bzw. 1.25 μM Hsp70-HER2/neu_{TE} und Hsc70-HER2/neu_{TE} inkubiert. Der Restgehalt des Endotoxins LPS in den Proteinlösungen lag zwischen 11.3 pg und 5.9 ng pro 500 pmol der eingesetzten Proteinmenge (0.002-0.563 EU/ μg). In einem Kontrollansatz wurden die Zellen mit 1 $\mu\text{g/ml}$ LPS stimuliert.

Die Oberflächenanalyse der BMDC nach 48-stündiger Inkubation mit den Fusionsproteinen ist in Abbildung 44 dargestellt. Es wurde deutlich, dass die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) des kostimulatorischen Faktors CD80 durch Hsp70-HER2/neu_{TE} und *m.tub.Hsp70-HER2/neu_{TE}* signifikant gesteigert werden konnte, wenngleich auch die LPS-induzierte BMDC-Reifung in einer stärkeren CD80 Expression resultierte. Der Vergleich mit höheren Konzentrationen an *m.tub.Hsp70-HER2/neu* zeigte, dass hier keine Dosisabhängigkeit bestand.

CD86, ein weiteres kostimulatorisches Molekül, wurde ebenfalls durch die Stimulation mit den Proteinen *m.tub.Hsp70-HER2/neu_{TE}* und Hsp70-HER2/neu_{TE} verstärkt exprimiert. Im Gegensatz zu CD80 induzierten steigende Proteinkonzentrationen von *m.tub.Hsp70-HER2/neu_{TE}* eine Erhöhung der MFI um das Doppelte im Vergleich zur Mediumkontrolle. Die Inkubation der BMDC mit 5 μM *m.tub.Hsp70-HER2/neu_{TE}* erhöhte die Expression des Moleküls CD86 gleichermaßen wie 1 $\mu\text{g/ml}$ LPS im Kontrollansatz (Abb. 44A). Die Maturierung der BMDC mit 1.25 μM Hsp70-HER2/neu_{TE} führte zu einer signifikanten Expressionsverstärkung von CD86 (Abb. 44C).

Bezüglich des Moleküls CD40 induzierten hohe Konzentrationen des Proteins *m.tub.Hsp70-HER2/neu_{TE}* [5 μM], ähnlich wie die LPS-Kontrolle, eine signifikante Steigerung der MFI. Auch Hsp70-HER2/neu_{TE} konnte die Expression von CD40 erhöhen, wenngleich auch nicht signifikant (Abb. 44B). In einer Konzentration von 1.25 μM induzierten die Proteine Hsp70-HER2/neu_{TE} und Hsc70-HER2/neu_{TE} eine signifikante Erhöhung der CD40-Oberflächenexpression, ebenso wie 10 μM des Proteins *m.tub.Hsp70-HER2/neu_{TE}*, während 5 μM dieses Proteins hier keine vergleichbare Expression induzierte (Abb. 44C). Das Protein Hsp70L1-HER2/neu_{TE}, das in einer Konzentration von 0.5 μM eingesetzt wurde, schien keinen maturierenden Effekt zu besitzen.

Diese Analysen zeigten, dass die Fusionsproteine *m.tub.Hsp70-HER2/neu_{TE}*, Hsp70-HER2/neu_{TE} und Hsc70-HER2/neu_{TE} einen BMDC-maturierenden Effekt hinsichtlich einer erhöhten Expression der kostimulatorischen Moleküle CD40, CD80 und CD86 besitzen, wenn sie in hohen Proteinkonzentrationen eingesetzt werden. Hsp70L1-HER2/neu_{TE} dagegen besaß wie in den Zytotoxizitätsstudien keine immunstimulatorische Wirkung, da durch die Inkubation dieses Proteins

auf BMDC keine verstärkte Expression der kostimulatorischen Oberflächenmoleküle induziert werden konnte. Da der MFI insgesamt aber stets nur um knapp 100 % anstieg, bleibt es fraglich, ob die Fusionsproteine hier eine physiologisch relevante Maturation auslösten.

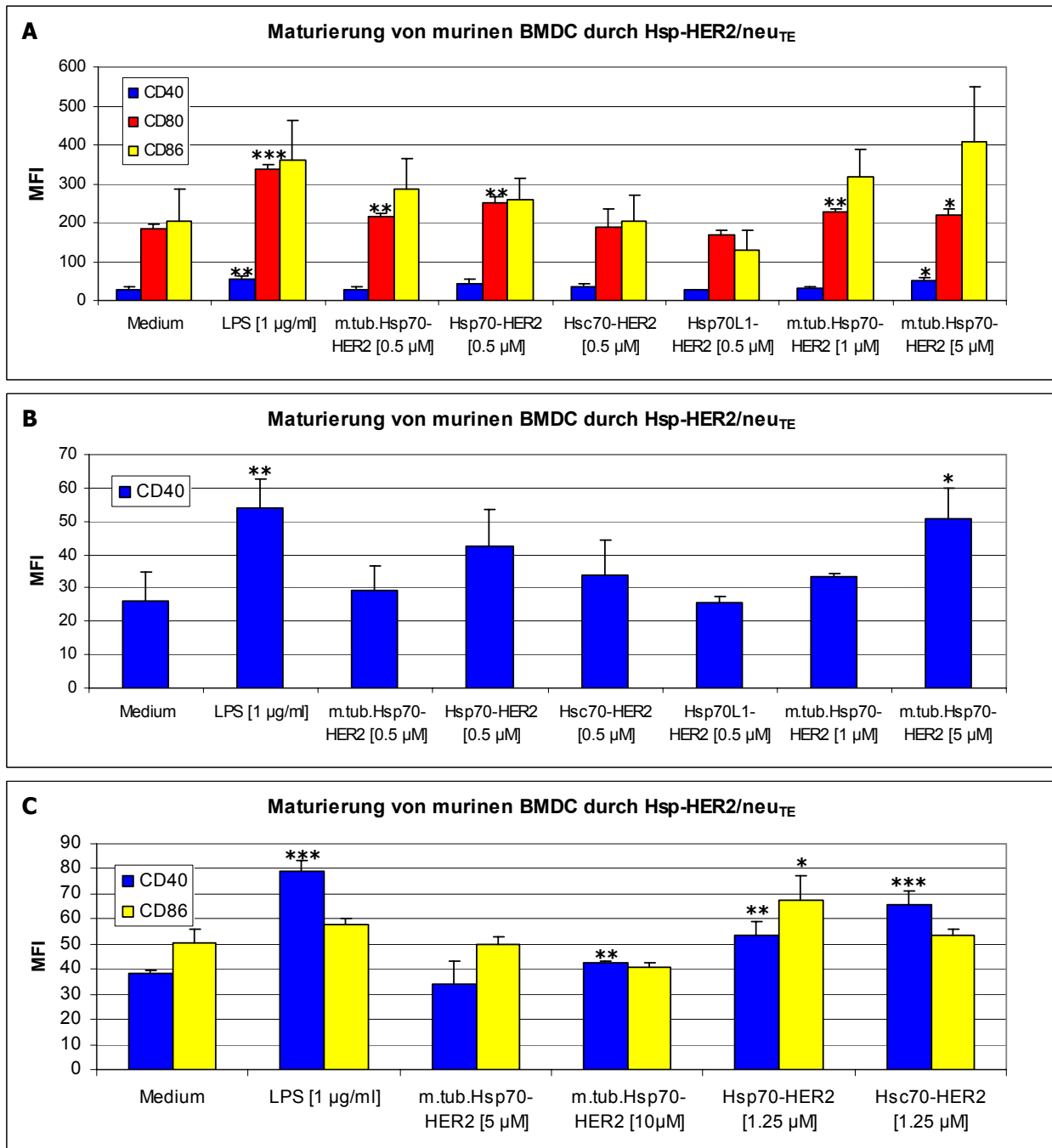


Abbildung 44: Zelloberflächenanalyse von BMDC nach Maturation durch die Hsp-HER2/neu_{TE}-Fusionsproteine. BMDC wurden aus dem Knochenmark von BALB/c gewonnen und *in vitro* mit unterschiedlichen Mengen an Hsp-HER2/neu_{TE}-Fusionsproteinen bzw. 1 µg/ml LPS für 48 Stunden stimuliert. Das kostimulatorische Molekül CD80 wurde durch die Proteine *m.tub.*Hsp70-HER2/neu_{TE} und Hsp70-HER2/neu_{TE} signifikant verstärkt exprimiert. Eine Dosisabhängigkeit im Fall von *m.tub.*Hsp70-HER2/neu_{TE} war dabei nicht zu erkennen (A). Das kostimulatorische Molekül CD86 wurde durch höhere Mengen an *m.tub.*Hsp70-HER2/neu_{TE} verstärkt exprimiert, diese Beobachtungen konnten allerdings nicht reproduziert werden (C). Eine Dosis von 1.25 µM des Proteins Hsp70-HER2/neu_{TE} induzierte dagegen eine signifikante Stimulation von CD86 (C). CD40 zeigte nach hohen Proteindosen (5 µM *m.tub.*Hsp70-HER2/neu_{TE} bzw. 1.25 µM Hsp70-HER2/neu_{TE} und Hsc70-HER2/neu_{TE}) eine signifikante Verstärkung der Oberflächenexpression.

6.5.2 *In vitro*-Restimulation der HER2/neu-spezifischen CD8⁺ T-Zellen durch Hsp-HER2/neu_{TE} beladene BMDC

In einem nächsten Schritt sollte die Kreuzpräsentation der Hsp-HER2/neu_{TE}-Fusionsproteine durch BMDC gezeigt werden. Dazu wurden BALB/c-Mäuse subkutan mit 500 pmol TYLPTNASL und 100 nmol T_HOVA in Kombination mit 5 µg CpG bzw. als Kontrolle mit PBS immunisiert. Sieben Tage nach der Immunisierung wurden die Milz und die drainierenden Lymphknoten entnommen und *in vitro* mit 1 µM TYLPTNASL restimuliert, um HER2/neu-spezifische T-Zellen anzureichern. Parallel wurden BMDC generiert und für 48 Stunden mit 5 µM *m.tub.*Hsp70-HER2/neu_{TE} inkubiert (4 pg LPS pro 500 pmol Protein; 0.002 EU/µg). Um eine Maturierung der BMDC zu garantieren, wurde den BMDC 24 Stunden nach der Proteinzugabe 1 µg/ml LPS zugefügt. Nach einem weiteren Tag wurden antigenspezifische T-Zellen und Protein-beladene maturierte BMDC im Verhältnis 5:1 (T-Zelle zu BMDC) für 40 Stunden inkubiert. Dabei sollte das durch die aktivierten T-Zellen sekretierte IFN_γ an spezifische Antikörper auf dem Plattenboden binden und über Sekundärantikörper mittels einer Farbreaktion nachgewiesen werden. Die Gegenüberstellung der Peptid-restimulierten Milzzellen aus immunisierten bzw. PBS-behandelten Mäusen in Abbildung 45 zeigte eine deutliche Aktivierung der TYLPTNASL-spezifischen T-Zellen durch die Kokultivierung mit Peptidbeladenen BMDC. Unbeladene BMDC induzierten aber ebenso eine Restimulation der antigenspezifischen T-Zellen, so dass keine Aussage über eine mögliche

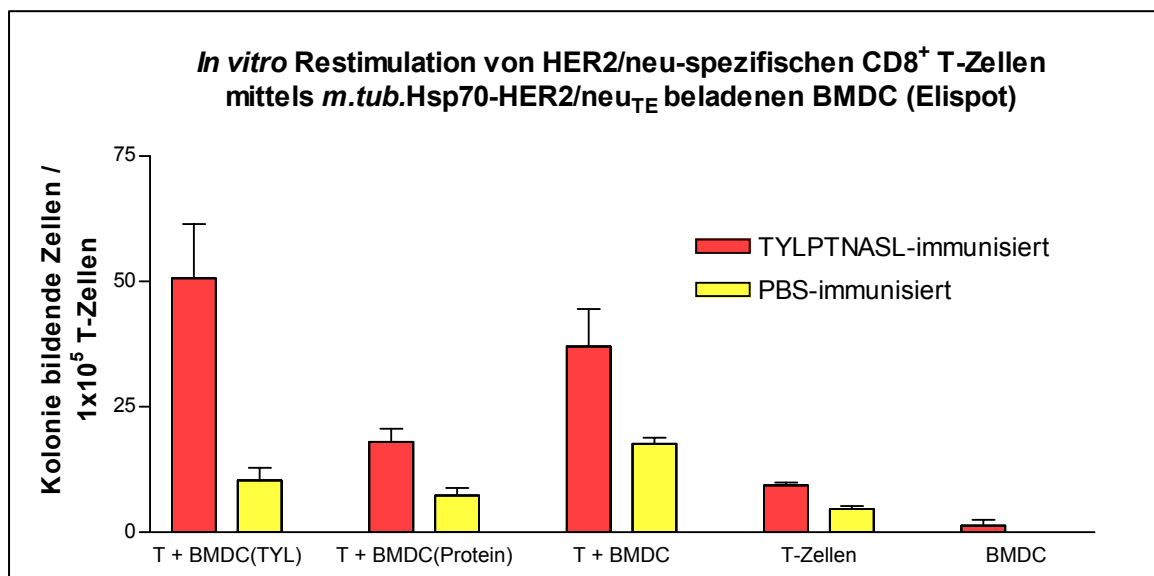


Abbildung 45: *In vitro* Restimulation TYLPTNASL-spezifischer CD8⁺ T-Zellen durch Fusionsprotein beladene BMDC. BALB/c-Mäuse wurden subkutan mit 500 pmol TYLPTNASL in Kombination mit 100 nmol T_HOVA und 5 µg CpG bzw. als Kontrolle mit PBS immunisiert. An Tag 7 wurden die Zellen aus der Milz und den drainierenden Lymphknoten *in vitro* mit 1 µM TYLPTNASL restimuliert. Parallel wurden BMDC aus BALB/c kultiviert und für 48 Stunden mit 5 µM *m.tub.*Hsp70-HER2/neu_{TE} und zusätzlich 1 µg/ml LPS beladen bzw. maturiert. Die Kokultivierung der BMDC und T-Zellen fand für 40 Stunden in einem Verhältnis von 5:1 (T-Zelle zu BMDC) statt. Im Vergleich zu den T-Zellen aus PBS-injizierten Kontrollmäusen zeigten T-Zellen, die mit Peptid-beladenen BMDC restimuliert wurden eine deutliche Aktivierung in Form einer IFN_γ-Sekretion. In Bezug auf die Restimulation mit Protein-beladenen BMDC zeigte sich zwar auch ein Unterschied zur PBS-Kontrolle Da aber ebenfalls eine hohe T-Zellstimulation von unbeladenen BMDC ausgeht, ist eine Aussage über die Restimulation antigenspezifischer T-Zellen durch Protein-beladene BMDC nicht möglich.

in vitro Restimulation der TYLPTNASL-spezifischen CD8⁺ T-Zellen durch *m.tub.*Hsp70-HER2/neu_{TE} beladene BMDC getroffen werden kann.

Die in Abschnitt 6.5 dargestellten Analysen zeigen, dass sowohl *m.tub.*Hsp70-HER2/neu_{TE} als auch Hsp70-HER2/neu_{TE} und Hsc70-HER2/neu_{TE} einen maturierenden Effekt besitzen, so dass kostimulatorische Moleküle wie CD80 und CD86 sowie CD40 auf murinen BMDC verstärkt exprimiert werden. Keines der Fusionsproteine konnte die BMDC-Reifung im Vergleich zum Kontrollansatz mit 1 µg/ml LPS verbessern und es wurde deutlich, dass hohe Mengen der rekombinanten Proteine nötig waren, um die Expression der Oberflächenmoleküle zu verstärken. Die Prozessierung der Hsp-HER2/neu_{TE}-Fusionsproteine und die Restimulation antigenspezifischer T-Zellen sollte *in vitro* durch eine Kokultivierung von Protein-beladenen BMDC mit Milzzellen aus immunisierten Mäusen gezeigt werden. Bereits unbehandelte BMDC konnten T-Zellen in Form einer IFN_γ-Sekretion aktivieren, so dass die *in vitro* Restimulation von TYLPTNASL-spezifischen T-Zellen durch Protein-beladene BMDC in diesem System nicht untersucht werden konnte.

6.6 Darstellung der HER2/neu-spezifischen T-Zellen durch die MHC:Peptid-Fc-Dimere

Die Herstellung der MHC:Peptid-Fc-Dimere hatte zum Ziel, antigenspezifische T-Zellen im Durchflusszytometer analog zu kommerziell erhältlichen Tetrameren bzw. Pentameren sichtbar zu machen. Nachdem die Generierung und Expression dieser Moleküle gelungen war, sollte in dieser Arbeit die Färbung HER2/neu-spezifischer T-Zellen überprüft werden, um so den Grundstein für die Detektion weiterer spezifischer T-Zellen mittels dieser Dimere zu legen.

Wie in **6.2.6** beschrieben wurden die Proteine in HEK293T-Zellen exprimiert und konnten über die konstante Region des IgG₁-Fusionsteils über Protein-A-Sepharose aufgereinigt werden. Zur Detektion der HER2/neu-spezifischen T-Zellen in BALB/c wurde ein K^d:TYLPTNASL-Fc-Dimer hergestellt. Parallel war ein HLA-A2:KIFGSLAFL-Fc-Dimer generiert worden, das dem Nachweis HER2/neu-spezifischer T-Zellen aus humanem Blut bzw. Knochenmark diene.

6.6.1 Detektion TYLPTNASL-spezifischer T-Zellen in BALB/c-Mäusen

Um in BALB/c-Mäusen HER2/neu-spezifische T-Zellen zu induzieren, wurden die Tiere mit 100 nmol TYLPTNASL und 100 nmol T_hOVA in Kombination mit 50 µg CpG bzw. als Kontrolle mit PBS subkutan immunisiert. Die Zellen aus der Milz und den drainierenden Lymphknoten wurden nach einer Woche für 5 Tage *in vitro* mit 1 µM TYLPTNASL restimuliert, bevor die spezifischen T-Zellen über die Bindung

des K^d:TYLPTNASL-Dimers und sekundäre fluoreszenzmarkierte Antikörper nachgewiesen wurden. Der Vergleich der Zellen aus der Peptid-immunisierten Maus mit T-Zellen aus der PBS-Kontrollmaus machte deutlich, dass über das Dimer K^d:TYLPTNASL-spezifische CD8⁺ T-Zellen vorrangig in vorbehandelten Mäusen detektierbar waren, während in nicht-immunisierten Tieren nur eine schwache Hintergrundfärbung auftrat (Abb. 46A). Die Titration des Dimers auf den murinen Zellen zeigte, dass mit Ausnahme von 1 µg die Prozentzahl der nachgewiesenen CD8⁺ TYLPTNASL-spezifischen T-Zellen mit zunehmender Menge des eingesetzten Dimers proportional stieg. Allerdings nahm durch höhere Dimerkonzentrationen auch die Hintergrundfärbung zu, so dass in der PBS-Kontrolle scheinbar verstärkt TYLPTNASL-spezifische T-Zellen detektiert wurden.

Nachdem die Spezifität des Dimers in einer Peptid-immunisierten Maus gezeigt werden konnte, sollte diese Detektionsmethode der antigenspezifischen T-Zellen auf mit Hsp-HER2/neu-Fusionsprotein immunisierte Mäuse übertragen werden. Da, wie in **6.3.3** gezeigt, das Protein Hsc70-HER2/neu_{TE} in BALB/c eine hohe TYLPTNASL-spezifische Immunantwort auslösen konnte, wurden BALB/c mit 500 pmol dieses Proteins und 100 nmol T_hOVA in Kombination von 5 µg CpG immunisiert und nach 7 Tagen einmal restimuliert. Der Nachweis der HER2/neu-spezifischen T-Zellen erfolgte 1 Woche nach der letzten Immunisierung *ex vivo* bzw. nach einer zusätzlichen *in vitro* Restimulation mit 1 µM Peptid. Während in den Milzzellen *ex vivo* keine Detektion TYLPTNASL-spezifischer T-Zellen im Vergleich zu den Zellen aus PBS-immunisierten Mäusen möglich war (nicht gezeigt), konnten in den Lymphknoten mit einer Dimermenge ab 0.1 µg antigenspezifische T-Zellen detektiert werden (Abb. 46B). Nach einer *in vitro* Restimulation mit Peptid ließen sich auch in den Milzzellen der Hsc70-HER2/neu_{TE} immunisierten Tiere über das Dimer TYLPTNASL-spezifische T-Zellen anfärben, während in Zellen der PBS-Maus nur Hintergrundsignal zu detektieren war (Abb. 46C). Abbildung 46D zeigt exemplarisch die durchflusszytometrische Anfärbung TYLPTNASL-spezifischer CD8⁺ T-Zellen aus den Lymphknoten einer PBS- bzw. Hsc70-HER2/neu_{TE}-immunisierten Maus. Um sicherzustellen, dass T-Zellen für die Analyse der Dimerspezifität untersucht wurden, wurde jeweils eine Region (R3) von lebenden CD3⁺ und CD8⁺ T-Zellen festgelegt und der Prozentsatz der TYLPTNASL-spezifischen CD8⁺ T-Zellen bestimmt.

6.6.2 Detektion KIFGSLAFL-spezifischer T-Zellen aus humanen Spendern

Das HLA-A2:KIFGSLAFL-Fc-Dimer sollte dem Nachweis HER2/neu-spezifischer T-Zellen aus dem Blut bzw. Knochenmark von HLA-A2-positiven Mammakarzinompatientinnen dienen, die einen HER2/neu-überexprimierenden Tumor entwickelt hatten. Aus dem Blut und Knochenmark wurden mononukleäre Zellen gewonnen (PBMC: *peripheral blood mononuclear cells*; BMMC: *bone marrow mononuclear cells*), die mit dem KIFGSLAFL-Dimer angefärbt wurden. Sowohl in den Zellen aus dem Blut als auch in Knochenmarkszellen konnten mit Hilfe des KIFGSLAFL-Dimers spezifische CD8⁺ T-Zellen detektiert werden, wohingegen in den Zellen des gesunden HLA-A2 positiven Spenders durch die Dimerfärbung nur ein schwaches Hintergrundsignal entstand (Abb. 47A und 47B). Eine Anhängigkeit der Detektion

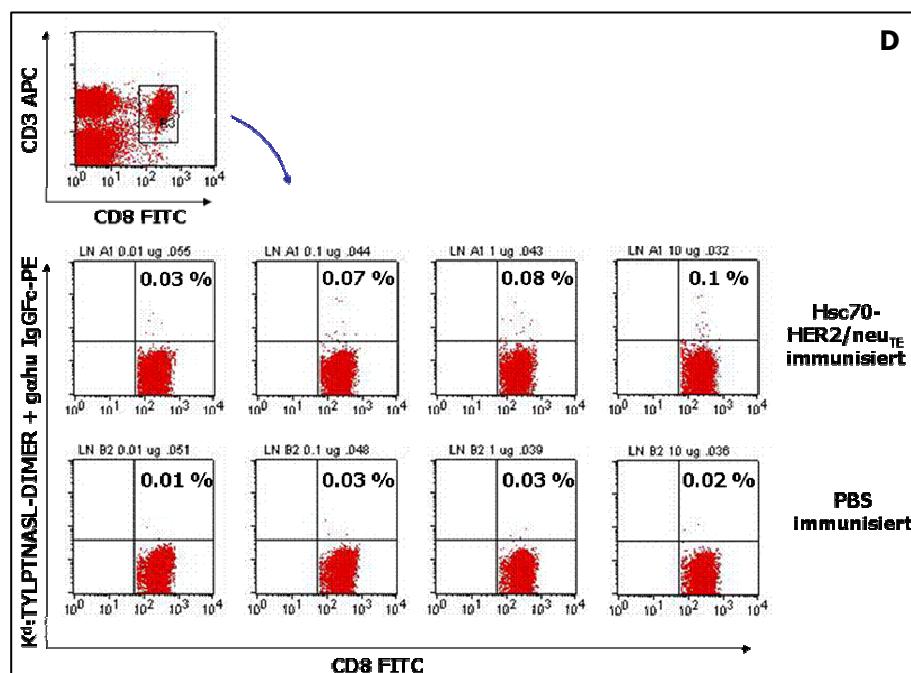
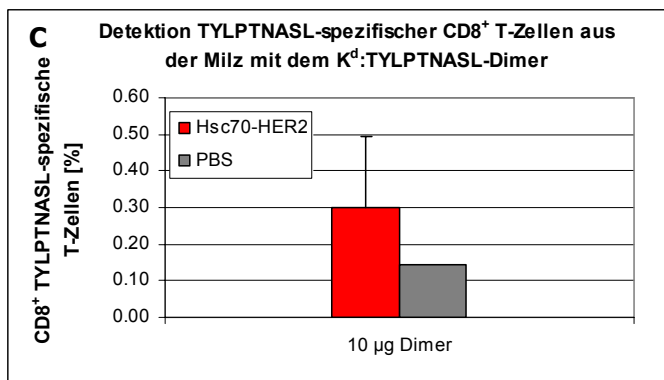
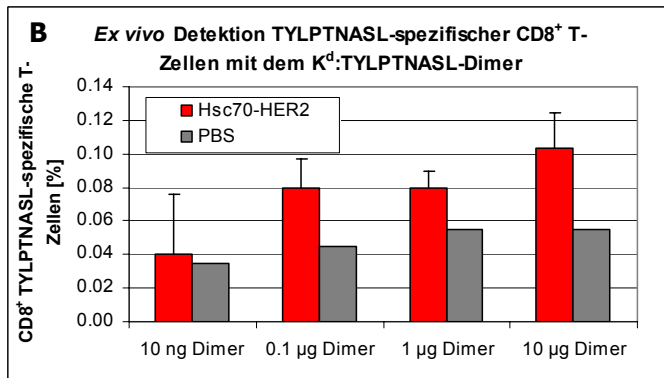
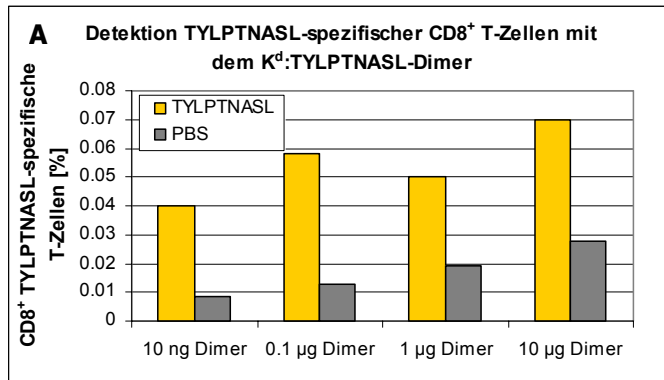


Abbildung 46: Detektion TYLPTNASL-spezifischer T-Zellen mittels K^d:TYLPTNASL-Fc-Dimer. Zellen aus der Milz und den drainierenden Lymphknoten einer Peptid-immunisierten Maus (500 pmol TYLPTNASL, 100 nmol T_HOVA, 5 µg CpG) bzw. einer PBS-Maus wurden an Tag 7 nach der Immunisierung für 5 Tage mit 1 µM Peptid *in vitro* restimuliert. Die Färbungen der antigenspezifischen T-Zellen mittels Dimer zeigten eine Detektion CD8⁺ TYLPTNASL-spezifischer T-Zellen in der immunisierten Maus, während in dem PBS-behandelten Tier eine schwächere Färbung auftrat (A). Eine tendenzielle Korrelation der verwendeten Menge des Dimers mit der Zahl der detektierten antigenspezifischen T-Zellen war zu erkennen. In den Lymphknoten der Hsp70-HER2/neu_{TE} immunisierten Mäuse (n=3) wurden *ex vivo* 7 Tage nach einer Restimulationsimmunisierung mit 500 pmol des Proteins in Kombination mit 100 nmol T_HOVA und 5 µg CpG im Vergleich zu PBS-behandelten Tieren (n=2) TYLPTNASL-spezifische aktivierte T-Zellen über das Dimer detektiert (B). Milzzellen zeigten ebenfalls antigenspezifische T-Zellen nach einer zusätzlichen *in vitro* Restimulation mit 1 µM Peptide über 5 Tage (C). Für die Durchflusszytometrie wurde jeweils eine Region von CD3⁺/CD8⁺ T-Zellen ausgewählt (R3), um den Prozentsatz der DIMER-spezifischen T-Zellen in PBS- bzw. Protein-immunisierten Mäusen bestimmen zu können.

antigenspezifischer T-Zellen von der verwendeten Dimermenge war nicht zu beobachten (Abb. 47A). Zur spezifischen Anfärbung der CD8⁺ KIFGSLAFL-spezifischen Gedächtnis-T-Zellen wurde das Oberflächenmolekül CD45RA in die Färbung integriert. Dieser Marker wird in zentralen Gedächtnis-T-Zellen verstärkt exprimiert. Da diese Zellen hauptsächlich im Knochenmark auftreten, zeigte die Färbung KIFGSLAFL-spezifische CD8⁺ T-Zellen mit hoher CD45RA Expression vorrangig im Knochenmark (Abb. 47B). Im Blut dagegen ist wie in der Kontrolle, den Zellen des gesunden Spenders, eine Vermehrung der antigenspezifischen CD45RA^{high} exprimierenden CD8⁺ T-Zellen nicht sicher auszumachen.

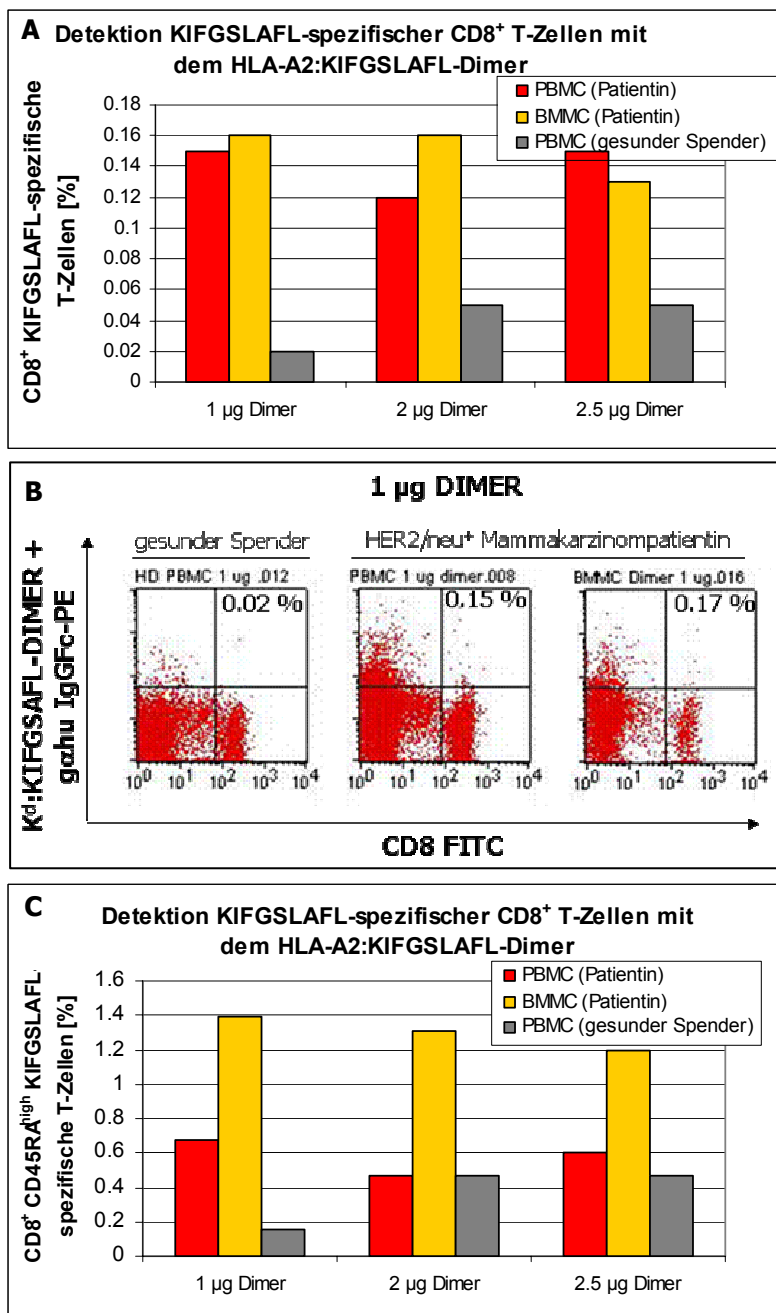


Abbildung 47: Detektion KIFGSLAFL-spezifischer T-Zellen mittels HLA-A2:KIFGSLAFL-Fc-Dimer. Aus den Blut- und Knochenmarkspuren einer HLA-A2-positiven HER2/neu überexprimierenden Mammakarzinompatientin wurden PBMC und BMMC gewonnen. Durch die Inkubation der CD8⁺ T-Zellen mit dem HLA-A2:KIFGSLAFL-Fc-Dimer konnten HER2/neu-spezifischen T-Zellen in den PBMC und BMMC der Patientin angefärbt werden, während in den PBMC des gesunden Spenders eine schwache Hintergrundfärbung auftrat (A, B). Eine Korrelation der Dimermenge mit der Zahl der detektierten spezifischen T-Zellen wurde nicht beobachtet. CD8⁺ Gedächtnis-T-zellen, die CD45RA in hohen Mengen exprimieren, traten hauptsächlich im Knochenmark der Patientin auf (C).

Im Abschnitt 6.6 wurde gezeigt, dass sowohl im BALB/c-Modell als auch in humanen Lymphozyten einer Patientin mit HER2/neu-überexprimierendem Mammakarzinom über

das K^d:TYLPTNASL- bzw. HLA-A2:KIFGSLAFL-Fc-Dimer HER2/neu-spezifische T-Zellen nachgewiesen werden können. Kontrollfärbungen in PBS-immunisierten BALB/c-Mäusen bzw. in gesundem humanem Spendermaterial lassen die Vermutung zu, dass die Spezifität des Dimers hoch genug ist, um antigenspezifische T-Zellen mittels dieser Moleküle nachzuweisen.

7 Diskussion

Einige Tumoren werden trotz ihrer Immunogenität vom Immunsystem nicht erkannt bzw. können ein immunsuppressives Umfeld schaffen, so dass proinflammatorische tumorspezifische Immunantworten unterdrückt werden. Verschiedene immuntherapeutische Studien zielen darauf ab, eine generell vorhandene antigenspezifische Immunität zu verstärken, um so eine Tumorabwehr zu bewirken. Die Umsetzung dieser Bemühungen, das Potential der körpereigenen Immunabwehr für die Regression des Tumors auszunutzen, fußt auf unterschiedlichen Strategien, wie z. B. Immunisierungen mit dem reinen Tumorantigen auf DNA-, Peptid- oder Proteinebene. Aber auch Vakzinierungsstudien mit Hitzeschockprotein-Antigen-Komplexen zeigten recht viel versprechende antitumorale Immunantworten, so dass dem Einsatz dieser Proteine eine große Bedeutung in der Immuntherapie beigemessen wird.

Das Ziel dieser Arbeit war es, den postulierten kostimulatorischen Effekt der Hitzeschockproteine für Vakzinierungen einzusetzen, die gegen das in Mammakarzinomen überexprimierte Tumorantigen HER2/neu gerichtet waren. Hitzeschockproteine können neben ihrer Fähigkeit, komplexe Antigene durch Mechanismen der Kreuzpräsentation effektiv in den MHC-Klasse-I-Präsentationsweg einzuschleusen, auch Immunantworten der angeborenen Immunität auslösen. Daher dienen sie gleichermaßen als Initiator der adaptiven antigenspezifischen Immunantwort und können durch ihren adjuvanten Effekt die zelluläre Immunität verstärken (Srivastava, 2002). Durch die rekombinante Fusion der zu untersuchenden Hitzeschockproteine mit unterschiedlichen Fragmenten des HER2/neu Proteins sollte einerseits der durch die verschiedenen Hitzeschockproteine vermittelte kostimulatorische Effekt der Fusionsproteine evaluiert werden. Andererseits wurde die Kapazität dieser Fusionsproteine untersucht, eine gegen das körpereigene Protoonkogen HER2/neu gerichtete Immunantwort zu induzieren und die Toleranz gegen das Selbstantigen zu brechen.

7.1 Generierung der Hsp-HER2/neu-Fusionsproteine

Für die Fusion des Tumorantigens HER2/neu wurden vier Mitglieder der Hsp70-Familie gewählt, nämlich die murinen Proteine mHsp70, mHsc70 und mHsp70L1 sowie das C-terminale Fragment des mycobakteriellen Hitzeschockproteins, *m.tub.Hsp70(ct)*. In früheren Studien konnte gezeigt werden, dass sowohl eukaryontisches stressinduziertes Hsp70, als auch mycobakterielles Hsp70 die Kreuzpräsentation komplexierter exogener Peptide erleichtern und durch die zusätzliche Maturierung dendritischer Zellen die Immunantwort gegen diese gebundenen Antigene verstärken kann (Udono und Srivastava, 1993; Tobian *et al.*, 2004). Udono und Mitarbeiter (2001) zeigten, dass auch das konstitutiv exprimierte Hitzeschockprotein Hsc70 diesen adjuvanten Effekt besitzt und als Fusionsprotein zytotoxische CD8⁺ T-Zellantworten gegen die fusionierten Antigene induziert. Das vierte Hitzeschockprotein, mHsp70L1, das hier untersucht werden sollte, war im Vergleich weniger gut charakterisiert. Durch frühere Studien wurde deutlich, dass dieses Hsp70-ähnliche Hitzeschockprotein analog zu den anderen Hitzeschockproteinen an DC binden kann und eine Maturierung bzw.

Stimulation dieser Zellen auslöst. Hsp70L1 induzierte im Vergleich zu Hsp70 in DC eine erhöhte Expression der proinflammatorischen Moleküle IL-12p70, MIP-1 α , MIP-1 β , RANTES und CCR7 und bewirkte außerdem eine Sekretion des T_H1-polarisierenden Zytokins IP-10. So wurde vermutet, dass Hsp70-L1 im Vergleich zu Hsp70 eine stärkere T_H1-Polarisierung der zellulären Immunität induzieren kann (Wan *et al.*, 2004).

7.1.1 Die Hsp-HER2/neu-Fusionsproteine mit C-terminalem Histidin-Tag können mit hoher Reinheit hergestellt werden

Es gelang über mehrere Klonierungsschritte, die verschiedenen Hitzeschockproteine N-terminal vor das HER2/neu-Fragment zu setzen und diese rekombinanten Proteine in *E. coli* (BL21) zu exprimieren. Erste Expressionsstudien ergaben, dass die Proteine vorrangig im unlöslichen Sediment zu finden waren (Abb. 16), was für eine Aggregation der neu synthetisierten Proteine sprach. Dieses Phänomen der so genannten Einschlusskörperchen (*inclusion bodies*) tritt häufig bei der Expression eukaryontischer Proteine in einem prokaryontischen Expressionssystem auf. Die exprimierten Proteine liegen in einem partiell gefalteten Zustand vor und gehen oftmals nur durch vollständige Denaturierung in Lösung. Da die Proteinausbeute aus den Bakterienüberständen zu gering war und aggregierte Protein-Einschlusskörperchen mit denaturierenden Reagenzien relativ einfach aufgeschlossen werden können, wurden die Bakterienpellets für die Aufreinigung der rekombinanten Proteine herangezogen.

Die Aufreinigung der Fusionsproteine sah eine Affinitätschromatographie über den Hexa-Histidin-Tag vor. Dieses häufig angewandte Chromatographieverfahren beruht auf der Interaktion eines auf einer Matrix immobilisierten Metallions mit den Seitenketten spezifischer Aminosäuren. Der Imidazolring der Aminosäure Histidin geht die stärkste Bindung mit dem hier verwendeten Nickelion (Ni²⁺) ein (Porath *et al.*, 1975). Dieses Chromatographieverfahren konnte erfolgreich zur Aufreinigung von Proteinen angewandt werden, die in sowohl in Bakterien (Chen und Hai, 1994) als auch in eukaryontischen Expressionssystemen wie in Hefe, Säugerzellen oder Baculovirus-infizierten Insektenzellen hergestellt wurden (Borsing *et al.*, 1997; Janknecht *et al.*, 1991; Kuusinen *et al.*, 1995). Berichte über Proteinaufreinigungen zeigen, dass in diesen rekombinanten Proteinen der His-Tag sowohl am N-terminalen Ende angehängt wurde, aber auch am C-Terminus zu finden war. Die optimale Positionierung des His-Tags ist daher pauschal nicht vorgegeben, sondern hängt vom jeweiligen Protein ab (Terpe, 2003). Untersuchungen zur Position des His-Tags bezüglich der Reinheit der erhaltenen rekombinanten Proteine zeigten, dass sowohl der N-terminale als auch der C-terminale His-Tag eine Aufreinigung der Proteine mittels Affinitätschromatographie ermöglichte, die Reinheit der Proteine durch eine C-terminale Position des His-Tags aber deutlich anstieg. Der Vergleich der C- und N-terminalen Abbauprodukte in Abbildung 18 und 20 machte deutlich, dass die Aufreinigung der Proteine über den N-Terminus neben den rekombinanten Proteinen auch viele kleinere Abbauprodukte bzw. unvollständig translatierte Proteinfragmente mit aufgereinigt wurden, während über den C-

Terminus nur das gewünschte rekombinante Protein detektiert werden konnte. So wurden Proteinreinheiten von 20 bis 60 % in den N-terminalen His-Fusionsproteinen erhalten, während die C-terminale Positionierung des His-Tags die Aufreinigung der Proteine mit einer Reinheit von 70 bis 90 % ermöglichte (Abb. 21).

Die Bindung rekombinanter, in *E. coli* exprimierter Proteine über ein C-terminales Streptavidin-bindendes Peptid (SBP) an immobilisiertes Streptavidin wurde erfolgreich von Keefe und Mitarbeitern beschrieben (2001). Ziel war es, die C-terminalen Abbauprodukte bzw. Translationsabbrucher in einem zweiten Aufreinigungsschritt über das C-terminale Streptavidin-bindende Peptid abzutrennen. Wir nehmen an, dass ein Großteil der rekombinanten Proteine mit N-terminalem His-Tag, die nach dem ersten Aufreinigungsschritt über die Nickel-Affinitätschromatographie erhalten wurden, nicht an die Streptavidin-Agarose gebunden hatte (Abb. 19). Messungen zeigten, dass die Proteinkonzentration nach der Aufreinigung über SBP nur einen Bruchteil der Proteinmenge darstellte, die direkt nach der Nickel-Affinitätschromatographie erhalten wurde (1.5 mg/ml versus 0.2 mg/ml).

Eine zweite Option, die Proteinreinheit zu erhöhen, war die Auftrennung der Proteine hinsichtlich ihrer Größe über die so genannte Gelfiltration. Die Gelfiltration oder Größen-Ausschlusschromatographie ist eine Säulenchromatographie, die ausnutzt, dass die Partikel der Säulenmatrix Poren definierten Durchmessers haben. Somit können größere Moleküle, wie die rekombinanten Proteine, nicht in die Poren eindringen und werden ausgeschlossen. Kleinere Moleküle, wie die Abbauprodukte, jedoch diffundieren in die Poren hinein. Sie brauchen für den Durchlauf der Säule wesentlich länger und können so von den vollständigen rekombinanten Proteinen abgetrennt werden. Es zeigte sich jedoch, dass sich die kontaminierenden Proteinfragmente durch diese Methode nicht abreichern ließen. Aufgrund der hohen Verluste der rekombinanten Proteine durch die Bindung des C-terminalen SBP einerseits und die starke Verdünnung der Proben nach der Gelfiltration andererseits wurden diese zusätzlichen Aufreinigungsschritte nicht weiter verfolgt.

Weitere Versuche, die Reinheit der Proteine mit N-terminalem His-Tag durch eine Erhöhung der Stringenz der Proteinbindung an die Nickel-Agarose zu verbessern, schlugen ebenfalls fehl. Auch durch die Expression der rekombinanten Proteine in Rosetta(DE3) konnte die Reinheit nicht entscheidend verbessert werden. Dieser Bakterienstamm verfügt über einen zusätzlichen Vektor, der für mehrere in Prokaryonten selten vorkommende tRNAs kodiert, so dass die Expression eukaryontischer Proteine verbessert wird. Es ist bekannt, dass in Prokaryonten aufgrund dieser seltenen Codons die Translation eukaryontischer Protein oftmals vorzeitig zum Ende kommt (Komar *et al.*, 1999). Da trotz der Verwendung dieser Bakterien nach der Nickel-Affinitätschromatographie viele Proteine mit einem kleineren Molekulargewicht im Vergleich zum vollständigen rekombinanten Protein auftraten, wird angenommen, dass es sich hierbei weniger um unvollständig translatierte Proteinfragmente handelt, sondern eher um C-terminale Abbauprodukte.

Diese Beobachtungen machen deutlich, dass alle hier getesteten zusätzlichen Verfahren, die Reinheit der nach der Nickel-Affinitätschromatographie erhaltenen Hitzeschockfusionsproteine mit N-terminalem His-Tag zu erhöhen, nicht Erfolg versprechend waren. Da der Positionswechsel des His-Tags vom N- an den C-Terminus jedoch eine deutliche Steigerung der Proteinreinheit erbrachte,

schließen wir, dass für die Herstellung dieser rekombinanten Hitzeschockfusionsproteine eine C-terminale Lokalisation des His-Tags von großem Vorteil ist.

7.1.2 Die Hsp-HER2/neu-Fusionsproteine sind Endotoxin-abgereichert

Die Herstellung der Fusionsproteine in *E. coli* machte eine Abreicherung des bakteriellen Lipopolysaccharids (LPS) nötig. Einige der etablierten Methoden zur Abreicherung des Endotoxins wie z. B. die Bindung an Polymixin B (Issekutz, 1983) oder die Phasentrennung über das nicht-ionische Detergenz Triton X-114 (Aida und Pabst, 1990) führten aufgrund des Verlusts der rekombinanten Proteine nicht zum Erfolg. Die direkte Behandlung der noch an die Nickelsäule gebundenen rekombinanten Proteine mit Triton X-114 mit anschließender Renaturierung konnte den Endotoxingehalt der eluierten Proteine auf 0.004 bis 0.07 EU/ μ g rekombinantes Protein reduzieren. Werte bis zu 0.005 EU/ μ g gelten als Endotoxin-frei, während Proben bis 0.05 EU/ μ g als leicht LPS-kontaminiert bezeichnet werden. Somit konnte durch die Expression der in *E. coli* hergestellten rekombinanten Proteine größtenteils LPS-freie bzw. leicht LPS-verunreinigte Proteine gewonnen werden. Die Proteinausbeuten lagen je nach Proteingröße zwischen 0.2 und 1 mg/ml.

7.1.3 Die Hsp-HER2/neu-Fusionsproteine können nicht in Eukaryonten hergestellt werden

Die Expression eukaryontischer Proteine in Bakterien birgt trotz der generell hohen Ausbeuten einige Nachteile. Die rekombinanten Proteine werden in *E. coli* oftmals nicht korrekt gefaltet, so dass diese in inaktiver Form vorliegen, oder es fehlen posttranslationale Modifikationen wie z. B. der Einbau prosthetischer Gruppen, Phosphorylierungen und Glykosylierungen. Außerdem akkumulieren die in Bakterien exprimierten Proteine häufig in Einschlusskörperchen, so dass ein denaturierendes Aufreinigungsverfahren mit anschließender Renaturierung der Proteine notwendig wird (Geisse *et al.*, 1996). Ein Hauptnachteil der Expression rekombinanter Proteine in Prokaryonten ist jedoch die Verunreinigung durch bakterielles Lipopolysaccharid (LPS). Diese negativen Aspekte der bakteriellen Expressionssysteme können durch die Verwendung von Eukaryonten umgangen werden. Zu den eukaryontischen Expressionssystemen mit breiter Anwendung gehören Zellkultursysteme von Säuger- oder Insektenzellen sowie eukaryontische Mikroorganismen wie Hefen oder filamentöse Pilze. Das in diesen Expressionssystemen exprimierte Protein wird in der Regel in löslicher und aktiver Form gebildet. Die Expression der Hitzeschockfusionsproteine in HEK293T-Zellen konnte zwar nachgewiesen werden, Bemühungen, diese rekombinanten Proteine aus dem Zellüberstand bzw. den lysierten Zellen aufzureinigen, scheiterten allerdings. Gründe hierfür waren wahrscheinlich einerseits die geringe Expressionsrate, eventuell stattfindende Degradation bzw. eine schlechte Bindung der Proteine an das Ni-NTA-Säulenmaterial. Die Proteinexpression in Insektenzellen hat gegenüber anderen eukaryontischen Expressionssystemen den Vorteil, relativ hohe Ausbeuten der rekombinanten Proteine zu liefern. Testexpressionen ergaben, dass die Fusionsproteine in SF9-Insektenzellen vorrangig

intrazellulär, aber auch extrazellulär nachweisbar waren (Abb. 23). Allerdings wurde deutlich, dass die getesteten Proteine sich deutlich in ihrer jeweiligen Expressionsmenge unterschieden. Analog zu den HEK293T-Zellen gelang es weder durch native noch denaturierende Aufreinigungsbedingungen, die Proteine nach der Nickel-Affinitätschromatographie zu eluieren (Abb. 24). Untersuchungen der Proteine über ihren C-terminalen His-Tag zeigten, dass sowohl während der Testexpression der Proteine Hsc70 und Hsp70 im Zellysate als auch nach einer Aufreinigung von Hsp70 neben der erwarteten Proteinbande eine weitere Bande kleineren Molekulargewichts auftrat, was auf N-terminalen Abbau schließen ließ (Abb. 23 und 24). Wie auch im HEK293T-System wird vermutet, dass diese proteolytische Proteindegradation zusammen mit einer eventuell nur geringen Menge an exprimiertem Protein ein Grund für das Scheitern der Proteinaufreinigung aus SF9-Insektenzellen gewesen sein könnte. Außerdem wird angenommen, dass die Bindungskapazität der gewählten Matrix zu gering war und eventuell durch die Wahl von Nickel-Sephrose anstatt der hier eingesetzten Nickel-Agarose eine Bindung der Proteine aus Insektenzellüberstand an die Matrix hätte verbessert werden können.

7.2 Evaluierung des adjuvanten Hitzeschockproteinanteils in den Fusionsproteinen

Ein Aspekt dieser Arbeit war der Vergleich der Immunogenität der vier verschiedenen Hitzeschockproteine hinsichtlich ihres Adjuvanseffektes in den Fusionsproteinen. Dazu wurden Fusionsproteine hergestellt, die unter anderem das K^d-restringierte, HER2/neu-spezifische, humane Epitop TYLPTNASL enthielten. Dieses Epitop wurde als dominantes K^d-restringiertes CD8⁺ T-Zellepitop beschrieben (Nagata *et al.*, 1997) und eignet sich daher für Untersuchungen in BALB/c-Mäusen. Das hier verwendete humane Epitop TYLPTNASL unterscheidet sich in einer Aminosäure von dem murinen Epitop TYLPANASL und ist somit für die Maus fremd. Daher kann durch die Analyse der Immunantworten gegen dieses Modellantigen in der Maus eindeutig der adjuvante Effekt der Hitzeschockproteinanteile in den Fusionsproteinen beurteilt werden.

7.2.1 BALB/c-Mäuse entwickeln nach einer Peptidimmunisierung eine HER2/neu-spezifische Immunantwort

In einem ersten Schritt wurde die Peptidimmunisierung in BALB/c-Mäusen etabliert, die als Referenz der durch die Fusionsproteine induzierten Immunantworten dienen sollte. Bisherige Immunisierungsstudien zeigten, dass nicht nur das Antigen von entscheidender Bedeutung ist, sondern auch die Art des verwendeten Adjuvans, die Route und die Dosis der Immunisierung eine wichtige Rolle bei der Ausprägung der Immunantwort spielt (Comoy *et al.* 1998; Leclerc und Ronco

1998). Durch den Einsatz von geeigneten Adjuvanzen ist es möglich, Immunantworten zu beeinflussen und in eine bestimmte T_h -Richtung zu polarisieren. Zusätzlich wurde gezeigt, dass oftmals die alleinige Gabe des $CD8^+$ T-Zellepitops mit dem Adjuvans nicht ausreicht, sondern ein zusätzliches $CD4^+$ T-Helferzelepitop enthalten sein muss, um antigenspezifische zytotoxische T-Zellen zu generieren (Zaks und Rosenberg, 1998). Durch die Immunisierung der BALB/c-Mäuse mit dem synthetischen Peptid TYLPTNASL in Kombination mit dem Adjuvans IFA und einem $CD4^+$ T-Helferzelepitop konnte eine HER2/neu-spezifische Immunantwort induziert werden (Abb. 26). Knutson und Mitarbeiter (2001) zeigten, dass eine Peptidimmunisierung mit einer HER2/neu-Sequenz, die sowohl ein $CD8^+$ T-Zellepitop als auch eine Helfersequenz enthält, die Frequenz und die Zytotoxizität der Peptid-spezifischen $CD8^+$ T-Zellen stark erhöht. Zwar konnte auch in dieser Arbeit die Beobachtung gemacht werden, dass durch die Integration des HER2/neu-generierten Helferepitops (HER2/neu₁₆₋₃₀) eine TYLPTNASL-spezifische Immunantwort detektierbar war, aber im direkten Vergleich war dieses Helferepitop weniger effektiv als ein fremdes T-Helferepitop aus Ovalbumin (OVA₃₂₃₋₃₃₉) (Abb. 26). Da Tumorzellen weitestgehend keine MHC-Klasse-II-Moleküle exprimieren, interagiert eine potentielle $CD4^+$ T-Helferzelle nicht direkt mit der Tumorzelle. Somit wird angenommen, dass eine antigenpräsentierende Zelle der T-Helferzelle nicht unbedingt ein Tumorgeneriertes Epitop präsentieren muss, sondern auch durch ein fremdes Antigen die notwendigen Helferantworten induzieren kann. Diese Beobachtungen konnten auch von Wang und Mitarbeitern (2003) gemacht werden. Sie zeigten ebenfalls, dass das hier verwendete aus OVA stammende T-Helferepitop (OVA₃₂₃₋₃₃₉) die Immunantwort gegen das HER2/neu Antigen TYLPTNASL deutlich erhöhen kann.

7.2.2 Zur Induktion einer HER2/neu-spezifischen Immunantwort durch die Hsp-Fusionsproteine wird zusätzliches Adjuvans benötigt

Nachdem durch die Peptidimmunisierungen gezeigt wurde, dass in BALB/c-Mäusen eine Immunantwort gegen das Modellepitop TYLPTNASL induziert werden kann, wurde in einem zweiten Schritt die Immunisierung der Tiere mit den Fusionsproteinen etabliert. Da von *m.tub.Hsp70(ct)-HER2/neu_{TE}* eine hohe Ausbeute erzielt worden war, wurde dieses Protein zur Etablierung der Proteinimmunisierung gewählt. Um eine stabile Immunantwort durch die Fusionsproteine zu induzieren, wurde das Protein in Kombination mit verschiedenen Adjuvanzen (LPS, CFA, CpG) verabreicht. Die Konstrukte der Fusionsproteine Hsp-HER2/neu_{TE} umfassten kurze HER2/neu-Sequenzen, welche die $CD8^+$ T-Zellepitope TYLPTNASL und PYVSRLGI, aber keine $CD4^+$ T-Helferepitope enthielten. Daher wurde der nötige Helfereffekt durch das synthetisch hergestellte T-Helferepitop T_h OVA₃₂₃₋₃₃₉, das in der Peptidimmunisierung zuvor etabliert worden war, in die Immunisierungsstrategie integriert. Abbildung 28 zeigt, dass nach einer Immunisierung und Restimulation der Tiere mit dem Fusionsprotein *m.tub.Hsp70(ct)-HER2/neu_{TE}* in Kombination mit CpG die Immunogenität des Proteins im Vergleich zu den anderen getesteten Adjuvanzen (LPS und CFA)

am stärksten war. Das CpG-reiche Oligonukleotid ist ein TLR-9 Ligand und induziert nach der Bindung an DC, B-Zellen oder Makrophagen die Sekretion vieler proinflammatorischer Zytokine wie z. B. IL-12. Durch die erhöhte Expression kostimulatorischer Moleküle und die Aktivierung dendritischer Zellen trägt CpG zur Induktion des adaptiven Immunsystems bei (Takeda *et al.*, 2003). Daher wird dieser TLR-Ligand heute erfolgreich als Adjuvans in verschiedenen Vakzinierungsstrategien eingesetzt (Klinman, 2004). Das bakterielle Lipopolysaccharid (LPS) gram-negativer Bakterien bindet an den TLR-4 und löst damit die Freisetzung verschiedener proinflammatorischer Zytokine wie IL-1, IL-6 und TNF α aus (Glauser *et al.*, 1991). Da LPS demnach ähnlich wie CpG die Reifung dendritischer Zellen und damit die Aktivierung spezifischer T-Zellen induziert, bleibt unklar, warum hier in diesem Vakzinierungsansatz die Kombination des Fusionsproteins mit LPS weniger immunogen war als die Immunisierung mit CpG. Wir vermuten, dass die verabreichte Dosis der Adjuvanzien eine Rolle spielte. Das komplette Freund-Adjuvans (CFA) gilt als besonders starkes Adjuvans, das durch die langsame Freisetzung des Antigens aus der mineralöhlhaltigen Emulsion sehr effizient T-Zellantworten stimulieren kann. Die enthaltenen abgetöteten Mycobakterien dienen der zusätzlichen Stimulation des Immunsystems über TLR. Trotz der Tatsache, dass CFA ein hohes Adjuvanspotential besitzt, ist der Einsatz dieses Reagenz aufgrund der Toxizität und der Gefahr einer chronischen Entzündung an der Eintrittsstelle eher umstritten. Da die Verabreichung des Hitzeschockfusionsproteins *m.tub.Hsp70(ct)-HER2/neu_{TE}* in Kombination mit CFA jedoch eine geringere Immunogenität aufwies als das zusammen mit CpG verabreichte Protein, wurde CpG als Adjuvans für weitere Vakzinierungsstudien mit den Hsp-Fusionsproteinen gewählt.

Die Gegenüberstellung der durch die vier verschiedenen Fusionsproteine bzw. der einzelnen Hitzeschockproteine induzierten TYLPTNASL-spezifischen Zytotoxizität in der Milz und den drainierenden Lymphknoten zeigte, dass, wie erwartet, keines der Hitzeschockproteine ohne T-Zellepitop eine Immunogenität besaß (Abb. 29). Durch den Vergleich der einzelnen Fusionsproteine nach einer Immunisierung in Kombination mit dem Adjuvans CpG wurde eine deutlich höhere Immunogenität der Proteine *mHsp70-HER2/neu_{TE}* und *mHsc70-HER2/neu_{TE}* gegenüber *m.tub.Hsp70(ct)-HER2/neu_{TE}* erkennbar. Das murine Hsp70L1-HER2/neu_{TE} Protein dagegen schien nicht immunogen genug zu sein, um antigenspezifische zytotoxische T-Zellen zu aktivieren. Diese Beobachtungen stehen im Gegensatz zu den Erkenntnissen von Wan und Mitarbeitern (2004). Sie konnten zeigen, dass dieses Hsp70-ähnliche Hitzeschockprotein komplexiert mit einem OVA-Peptid antigenspezifische IFN γ -sekretierende CD8⁺ T-Zellen induzieren kann. Auch als Fusionsprotein zeigte Hsp70L1 bereits einen immunogenen Effekt (Wu *et al.*, 2005). Jedoch muss berücksichtigt werden, dass die Vakzinierungsstrategie dieser Studie eine Beladung dendritischer Zellen mit dem Fusionsprotein vorsah, was einen direkten Vergleich der Arbeiten erschwert.

Um die induzierte Immunantwort gegen das Modellantigen TYLPTNASL eindeutig auf die Immunogenität der Fusionsproteine zurückführen zu können, wurde die Adjuvansmenge in den applizierten Proteinlösungen titriert (Abb. 30). Dabei stellte sich heraus, dass alle drei getesteten Fusionsproteine (*mHsp70-HER2/neu_{TE}*, *mHsc70-HER2/neu_{TE}* und *m.tub.Hsp70-HER2/neu_{TE}*) zwar eine deutliche Immunogenität besitzen, wenn sie mit 50 μ g CpG verabreicht werden, dass aber eine

stärkere Immunantwort in Kombination mit einer mittleren CpG-Dosis (5 µg) ausgelöst wurde. Das Fusionsprotein mHsp70-HER2/neu_{TE} zeigte außerdem bei einer sehr geringen Adjuvansmenge (0.5 µg) noch eine Immunogenität, während die restlichen Proteine in dieser Kombination keine HER2/neu-spezifische Immunantwort mehr induzieren konnten. Da CpG durch die Interaktion über TLR-9 Zellen des angeborenen Immunsystems aktiviert, würde man annehmen, dass eine hohe Adjuvansmenge eine starke Aktivierung des Immunsystems und damit eine hohe antigenspezifische T-Zellantwort bewirkt. Wurde das Antigen als Peptid dargeboten, war diese Proportionalität zwischen Adjuvansdosis und Stärke der Immunantwort zu beobachten (Abb. 30). Wie erwartet, zeigte das synthetische Peptid keinen immunogenen Effekt, wenn es ohne zusätzliches Adjuvans (CpG) verabreicht wurde. Bei der Proteinimmunisierung dagegen war diese Korrelation zwischen CpG-Menge und Immunstärke jedoch nicht zu beobachten. Daher wird vermutet, dass die Darreichungsform des Antigens eine Rolle spielt. Das synthetische Peptid bindet lediglich an die Zelloberfläche der antigenpräsentierenden Zellen, induziert aber keine weiteren Veränderungen hinsichtlich des Aktivierungszustandes der DC. Die Fusionsproteine dagegen werden von DC aufgenommen und prozessiert und induzieren dadurch, wahrscheinlich vermittelt durch den Hitzeschockproteinanteil, eine Reifung der DC. Somit werden kostimulatorische Moleküle exprimiert und proinflammatorische Zytokine sezerniert, die eine Aktivierung der adaptiven Immunantwort induzieren. Der zusätzliche Adjuvanzeffekt einer hohen CpG-Dosis könnte in diesem Zusammenhang kontraproduktiv sein und die Immunantwort eher hemmen. Wingender und Mitarbeiter (2006) konnten zeigen, dass hohe CpG-Mengen (50 µg) neben der bekannten immunstimulatorischen Wirkung auch suppressiv auf die T-Zellproliferation und der Aktivierung von T-Effektorzellen sein können.

Bei CpG-Mengen unterhalb von 5 µg war die Immunogenität der Fusionsproteine deutlich verringert und die Proteine konnten ohne zusätzliches Adjuvans keine HER2/neu-spezifischen Immunantworten induzieren. Entgegen der Erwartungen aus bisherigen Studien, stellte sich heraus, dass die Immunogenität der hier eingesetzten rekombinanten Hitzeschockfusionsproteine nicht ausreichte, um ohne Adjuvans eine adaptive Immunität auszulösen. Es muss allerdings berücksichtigt werden, dass in jenen Studien keine Fusionsproteine eingesetzt, sondern zur Immunisierung Hsp:Peptid-Komplexe verwendet wurden, die direkt aus dem Tumor gewonnen bzw. *in vitro* rekonstituiert wurden (Tamura *et al.*, 1997; Blachere *et al.*, 1997; Sato *et al.*, 2001). In anderen Studien wurden Hsp-Fusionsproteine vor der Immunisierung *in vitro* auf BMDC geladen, so dass auch hier der direkte Vergleich nicht möglich ist (Wu *et al.*, 2005). Ein weiterer Punkt für die Diskrepanz zwischen der Literatur und der hier beobachteten fehlenden Immunogenität der Hsp-Fusionsproteine ohne zusätzliches Adjuvans könnte die LPS-Verunreinigung sein. Während der Endotoxingehalt in den Proteinlösungen in dieser Studie zwischen 0.004 bis 0.07 EU pro µg rekombinantem Protein lag, wurde zuvor der LPS-Gehalt der applizierten Hsp-Komplexe nicht exakt bestimmt. Andere Autoren immunisierten mit Proteinen, deren restlicher Endotoxingehalt sich zwar auf vergleichbare Werte belief (Wan *et al.*, 2004; Wu *et al.*, 2005), die aber wie bereits erwähnt andere Vakzinierungsmethoden wählten. Daher fällt ein direkter Vergleich der hier untersuchten Proteine hinsichtlich ihrer Fähigkeit, eine Immunantwort zu induzieren, mit früheren Arbeiten schwer. Es wird vermutet, dass die Abreicherung des Endotoxins

eine Rolle bei dem Verlust der Immunogenität spielte. Dies wird untermauert durch die Ergebnisse einer weiteren Arbeit, die zeigte, dass Endotoxin-depletierte Hsp-OVA-Fusionsproteine nach einer Primärimmunisierung keine antigenspezifische T-Zellaktivität in Mäusen auslösen konnten. Erst durch wiederholte Restimulation konnte eine Immunantwort gegen das Modellantigen detektiert werden (Marincek, 2008).

7.2.3 Der Immunogenitätsvorteil der Hsp-Fusionsproteine gegenüber dem Peptid

ist CpG-abhängig

Ein weiterer Punkt, der in dieser Arbeit untersucht werden sollte, war der Vergleich der Fusionsproteine mit dem synthetischen Peptid. Die Peptidimmunisierung war zunächst mit einer Peptidmenge von 100 nmol etabliert worden. Da von den Fusionsproteinen jedoch eine 200fach geringere Menge eingesetzt wurde, musste auch diese Peptidmenge untersucht werden. Interessanterweise stellte sich dabei heraus, dass 500 pmol des synthetischen Peptids eine TYLPTNASL-spezifische zytotoxische Immunantwort wesentlich effektiver induzieren konnte als die hohe Peptidmenge (100 nmol) (Abb. 30C und 30 D). Offensichtlich tritt hier ab einer gewissen Antigenmenge eine Sättigung ein, bei der die Immunantwort nicht mehr gesteigert, sondern geschwächt wird. Die Abhängigkeit der Qualität der T-Zellantwort von der Antigendosis wurde in der Literatur mehrmals beschrieben. *In vitro* werden durch hohe Antigendosen eher CD8⁺ T-Zellen, die einen TCR mit einer niedrigen Avidität besitzen, aktiviert, während geringe Antigenmengen eine Stimulation hochaffiner CD8⁺ T-Zellen bewirken (Alexander-Miller *et al.*, 1996; Byers und Lindahl, 1999). Auch *in vivo* konnte dieser Zusammenhang zwischen Antigendosis und T-Zellavidität gezeigt werden (Kim *et al.*, 2006). Wir nehmen an, dass durch 100 nmol des verabreichten Peptids keine TYLPTNASL-spezifischen T-Zellen mit hoher Avidität induziert wurden und daher die Immunantwort gegen dieses Antigen schwächer ausfiel als bei der 200fach geringeren Peptiddosis. Bei den Protein-induzierten Immunantworten zeigte sich dagegen keine klare Dosisabhängigkeit zwischen den eingesetzten Mengen von 100, 250 und 500 pmol. Während bei mHsp70-HER2/neu_{TE} mit steigender Proteinmenge auch eine höhere Immunogenität beobachtet werden konnte, traf dies für *m.tub.*Hsp70-HER2/neu_{TE} und mHsc70-HER2/neu_{TE} nicht zu (Abb. 31). Ähnlich wie bei der Peptidimmunisierung induzierte mHsc70-HER2/neu_{TE} stärkere Immunantworten bei einer geringeren Antigendosis, was wiederum durch die Korrelation der Antigenmenge mit der T-Zellavidität erklärbar wäre.

Beim Vergleich der durch das Peptid bzw. die Fusionsproteine induzierten Immunantworten wurde wiederum eine Abhängigkeit von der Adjuvansmenge deutlich. Es zeigte sich, dass in Kombination mit hohen CpG-Mengen (50 µg) das Peptid, abhängig von der jeweils eingesetzten Menge, eine stärkere (500 pmol) bzw. eine zu den Fusionsproteinen vergleichbare (100 nmol) Immunität induzierte (Abb. 30). Bei einer mittleren CpG-Dosis (5 µg) dagegen erreichten die Hsp-Fusionsproteine eine stärkere Immunogenität als das Peptid. Der Herstellung der hier beschriebenen rekombinanten Proteine lag die

Idee zugrunde, durch die Integration des Hitzeschockproteins eine parallel zur Antigenaufnahme stattfindende Stimulation der DC auszulösen. Daher sollten die Fusionsproteine im Vergleich zu den Peptiden, die nur oberflächlich an die DC binden, aber keine Maturierung induzieren, eine stärkere Immunantwort auslösen können. Da nun das synthetische Peptid jedoch eine zum Teil stärkere Immunogenität als die Hsp-Fusionsproteine besaß und wie in **7.2.2** beschrieben die Proteine ohne zusätzliches Adjuvans keine Immunogenität besaßen, wird angenommen, dass der adjuvante Effekt der Hitzeschockproteinanteile in den hier eingesetzten Fusionsproteinen entgegen früherer Beobachtungen nicht sehr stark war. Wir vermuten, dass die CpG-induzierte Aktivierung des Immunsystems die adjuvante Wirkung der Hsp-Anteile in den Fusionsproteinen überdeckte, so dass bei hohen CpG-Dosen kein Vorteil der Proteinimmunisierung festgestellt werden konnte. Bei geringerer Adjuvansmenge dagegen kam anscheinend ein Adjuvanseffekt der Fusionsproteine gegenüber dem Peptid zum tragen. Die antigenpräsentierenden Zellen wurden weniger stark durch CpG stimuliert, so dass die durch das Peptid induzierte Immunantwort schwächer wurde. Die Fusionsproteine wirkten anscheinend immunstimulatorisch auf die DC und zeigten so im direkten Vergleich zu den Peptiden eine erhöhte Immunantwort.

7.2.4 Die Proteine Hsp70-HER2/neu_{TE}, Hsc70-HER2/neu_{TE} und Hsp70L1-HER2/neu_{TE} induzieren eine CpG-unabhängige Tumorreprimierung nach prophylaktischer Immunisierung

Neben der Evaluierung der Hsp-Fusionsproteine hinsichtlich ihrer Kapazität zytotoxische antigenspezifische T-Zellen zu aktivieren, wurde auch der tumorprotektive Effekt der Fusionsproteine untersucht. Dazu wurde das Wachstum der murinen Mammakarzinomzelllinie D2F2/E2 in BALB/c-Mäusen analysiert, in der das humane HER2/neu-Protein überexprimiert wird (Piechocki *et al.*, 2001). Um die antitumorale Immunogenität der Hsp-Fusionsproteine beurteilen zu können, wurden die Tiere zunächst prophylaktisch immunisiert, wobei jeweils die in den *In vivo*-Zytotoxizitätsstudien etablierte optimale Adjuvansmenge von 5 µg CpG eingesetzt wurde.

Analog zu den vorigen Beobachtungen zeigte sich, dass die höhere Peptidmenge von 100 nmol wiederum einen nachteiligen Effekt auf die Induktion einer antitumoralen Immunantwort hatte. Die Applikation der geringeren Peptidmenge (500 pmol) dagegen konnte das Tumorwachstum signifikant verlangsamen (Abb. 40). Dieses Ergebnis unterstützt die vorige Vermutung, dass aufgrund des Antigenüberschusses bei 100 nmol Peptid eher antigenspezifische T-Zellen mit einem TCR niedriger Avidität aktiviert werden, welche eine weniger starke Immunantwort auslösen. Analog zur Peptid-induzierten Tumorreprimierung konnte durch jedes der vier Hsp-Fusionsproteine nach prophylaktischer Immunisierung in Kombination mit dem Adjuvans CpG das Wachstum des Tumors D2F2/E2 signifikant verlangsamt werden (Abb. 40). Interessanterweise gelang dies auch durch die Behandlung der Mäuse mit dem Protein mHsp70L1-HER2/neu_{TE}, welches in den Zytotoxizitätsstudien keinen Effekt aufwies. Zudem gelang es auch, durch die Applikation einiger Proteine ohne das

zusätzliche Adjuvans CpG einen antitumoralen Effekt zu induzieren. Sowohl mHsp70-HER2/neu_{TE}, mHsc70-HER2/neu_{TE} als auch mHsp70L1-HER2/neu_{TE} verlangsamten das Tumorwachstum im Vergleich zur Peptidimmunisierung signifikant. Da das Protein *m.tub.Hsp70-HER2/neu_{TE}* in Kombination mit CpG das D2F2/E2-Wachstum zwar antitumoral wirkte, ohne das Adjuvans allerdings keinen Effekt zeigte (Abb. 40C und 40D), wird vermutet, dass dieses Protein im direkten Vergleich zu den restlichen Hsp-Fusionsproteinen eine geringere Immunogenität im HER2/neu-System besaß. In einem anderen Antigenesystem (OVA) jedoch konnte gezeigt werden, dass gerade *m.tub.Hsp70* im Vergleich zu Hsp70, Hsp70L1 und Hsc70 eine stärkere Immunantwort induziert, wenn es als Fusionsprotein in Immunisierungsstudien verwendet wird (Marincek, 2008). Somit ist keine allgemeine Aussage hinsichtlich des stärksten adjuvanten Hitzeschockproteins möglich und der Adjuvanzeffekt ist daher abhängig vom jeweiligen Antigenesystem.

Die in der hier vorliegenden Arbeit gemachte Beobachtung, dass drei der vier Hsp-Fusionsproteine ohne zusätzliches Adjuvans (CpG) BALB/c-Mäusen eine antitumorale Immunität verleihen, korreliert nicht mit den Daten der Zytotoxizitätsstudien, in denen keine antigenspezifische T-Zellaktivierung durch die Proteine ohne CpG nachgewiesen werden konnten. Es stellt sich hier daher die Frage, warum die Immunogenität der Fusionsproteine ausreichte, um einen HER2/neu-überexprimierenden Tumor zu hemmen, während die Aktivierung zytotoxischer antigenspezifischer T-Zellen nicht gelang. Dabei könnten zum einen der Applikationsweg der Proteine und der Zeitpunkt der Injektion eine Rolle spielen. In den Studien zur T-Zellzytotoxizität wurden nach subkutaner Injektion die drainierenden Lymphknoten und die Milz untersucht, während im Tumorexperiment die Immunisierung subkutan direkt an der Stelle erfolgte, wo später die Tumorzellen appliziert wurden. Die Inokulation der Tumorzellen erfolgte bereits fünf Tage nach der letzten prophylaktischen Immunisierung, wohingegen die antigenspezifische T-Zellaktivität im Abstand von einer Woche untersucht wurde. Es wird angenommen, dass durch die prophylaktische Applikation der Fusionsproteine am Ort der späteren Tumorinokulation eine Immunantwort induziert wurde, die zum Zeitpunkt der Tumoringjektion dort zum Teil noch vorherrschte. Dabei könnten zunächst vorrangig Zellen des angeborenen Immunsystems, wie z. B. die NK-Zellen, für die Tumorabstoßung verantwortlich sein. Es wurde gezeigt, dass die Proliferation und die zytotoxische Aktivität der NK-Zellen durch die Interaktion mit Hsp70 stimuliert wird (Multhoff *et al.*, 1999; Gross *et al.*, 2003). Antigenspezifische T-Zellen, die in den Zytotoxizitätsstudien ohne Adjuvans unter denselben Immunisierungsbedingungen nicht detektiert werden konnten, spielten möglicherweise eine untergeordnete Rolle. Die Tumorabwehr könnte also eher durch antigenunspezifische Immunantworten vermittelt werden, welche durch die prophylaktisch verabreichten Fusionsproteine aktiviert wurden. Diese Hypothese könnte auch erklären, warum das Protein mHsp70L1-HER2/neu einen antitumoralen Effekt besaß, aber keine antigenspezifische Zytotoxizität induzierte. Allerdings müssen auch HER2/neu-spezifische Immunantworten bei der Tumorabwehr eine Rolle gespielt haben, da wir zeigen konnten, dass ein Tumor, der HER2/neu nicht überexprimiert, unter denselben Bedingungen nicht abgewehrt wird (Abb. 39B).

Im Hinblick auf die verabreichte Adjuvansmenge zeigte sich, dass, entgegen der Beobachtungen aus den Zytotoxizitätsstudien, das Protein *m.tub.Hsp70-HER2/neu_{TE}* in Kombination mit einer hohen CpG-Dosis (50 µg) einen stärkeren antitumoralen Effekt besaß als in Kombination mit einer mittleren CpG-Menge (5 µg) (Abb. 39A). In allen Versuchstieren konnte über einen Zeitraum von 40 Tagen das Tumorwachstum verhindert werden. Da aber auch die Peptid-immunisierten Kontrolltiere ein deutlich verlangsamtes Tumorwachstum aufwiesen, wird vermutet, dass der hier beobachtete antitumorale Effekt auf die hohe Adjuvansmenge zurückzuführen ist. Es ist bekannt, dass die Injektion von CpG NK-Zellen, DC und Makrophagen an den Injektionsort lockt, diese aktiviert und die Induktion von T_H1-stimulierenden Zytokinen wie IL-12 stimuliert (Carpentier *et al.*, 1999). Zellen des angeborenen Immunsystems zerstören Tumorzellen und deren Antigene induzieren die Aktivierung spezifischer T-Zellen. Da CpG zusätzlich auch den aktivierungsinduzierten Zelltod (AICD, *activation induced cell death*) in T-Zellen durch eine erhöhte Expression von antiapoptotischen Faktoren wie Bcl-X_L und c-FLIP verhindert, wird durch dieses Adjuvans neben der Aktivierung der angeborenen Immunität außerdem die Proliferation der antigenspezifischen T-Zellen unterstützt (Davila und Celis, 2000; Davila *et al.*, 2002). Dieser antitumorale Effekt des CpG, der keine zusätzliche Gabe des Tumorantigens fordert, konnte bereits in mehreren Studien gezeigt werden (Kawarada *et al.*, 2001; Baines und Celis, 2003; Krieg, 2004). Die durch CpG induzierte Tumorregression war zwar NK-Zellabhängig, aber unabhängig von T- oder B-Zellen (Krepler *et al.*, 2004).

Eine prophylaktische Immunisierung spiegelt jedoch nicht die Begebenheiten vieler humaner Tumoren wieder, bei denen eine Therapie erst nach der Tumorentstehung erfolgt. Daher sollte nach der erfolgreichen Tumorreprimierung durch die prophylaktische Immunisierung einerseits der therapeutische Effekt der Hsp-Fusionsproteine in einem bereits etablierten Tumor untersucht werden. Andererseits wurde die T-Gedächtnis-Zellantwort in den prophylaktisch immunisierten Tieren analysiert, die über mehrere Wochen keinen Tumor entwickelten. Eine lang anhaltende Immunität ist neben einer starken primären tumorspezifischen Immunantwort essentiell, um die dauerhafte Abwehr des Tumors zu garantieren. Die Untersuchungen ergaben allerdings, dass in keinem der primär geschützten Tiere ein sekundärer Tumor abgewehrt werden konnte. Daher ist davon auszugehen, dass die durch die Fusionsproteine induzierte Immunität nicht stark genug war, eine T-Zell-Gedächtnisantwort zu bewirken.

In verschiedenen Studien konnte in Tiermodellen mit Transplantationstumoren oder auch in autochthonen Tumormodellen ein Tumorrückgang bzw. verlangsamtes Tumorwachstum nach einer therapeutischen Immunisierung beobachtet werden. In diesen Arbeiten wurden die Tiere einerseits mit CD8⁺ T-Zellepitopen in Kombination mit mehreren Adjuvanzen (GM-CSF, IFA, CpG) mehrmals immunisiert (Gritzapis *et al.*, 2006; Nava-Parada *et al.*, 2007) bzw. es wurde eine Vakzine auf DNA-Ebene in Kombination mit systemisch verabreichtem IL-12 injiziert (Pannelini *et al.* 2006). Die mehrmalige Applikation der Hsp-Fusionsproteine zusammen mit 10 µg des Adjuvans CpG in BALB/c-Mäusen mit einem bereits etablierten D2F2/E2 Tumor konnte das Tumorwachstum allerdings nicht beeinflussen. Auch durch das Peptid oder höhere Proteinmengen konnte keine Tumorregression hervorgerufen werden (Abb. 43). Es wird angenommen, dass die durch die Hsp-Fusionsproteine

induzierte HER2/neu-spezifische Immunogenität hier nicht ausreichte, um den etablierten Tumor zu bekämpfen. Grundsätzlich ist eine erfolgreiche therapeutische Therapie schwerer zu erreichen als ein prophylaktischer Schutz, da das Tumorgewebe durch ein suppressives Milieu bereits einen ersten Schutz gegen infiltrierende Immunzellen entwickelt. Außerdem können Tumoren durch Mutationen und dem Verlust der Antigene dem Angriff durch das Immunsystem entgehen. Das Protoonkogen HER2/neu wird hauptsächlich in den ersten Phasen der Tumorentstehung benötigt. Demnach ist denkbar, dass eine geringere Expression dieses Antigens in späteren Phasen eine HER2/neu-vermittelte Tumorabwehr verschlechtert (Lollini *et al.*, 2006). Der Grund, dass in dieser Arbeit die Reprimierung des Tumorwachstums nach therapeutischer Immunisierung nicht gelang, könnte auch mit der eingesetzten Adjuvansmenge erklärt werden. Andere Studien zeigten einen deutlichen Rückgang des Tumors wenn einerseits wie oben erwähnt mehrere Adjuvanzen kombiniert wurden und von CpG 100 µg eingesetzt wurden, was dem zehnfachen der hier verwendeten Adjuvansmenge entspricht (Nava-Parada *et al.*, 2007).

7.2.5 Der Hsp-Anteil der Hsp-HER2/neu₂₆₋₁₃₆-Fusionsproteine zeigt keinen Adjuvanseffekt

Zusätzlich zu den Hsp-HER2/neu_{TE}-Fusionsproteinen mit den zwei K^d-restringierten CD8⁺ T-Zellepitopen wurden auch Fusionsproteine hergestellt, die das TYLPNASL-Epitop in einem längeren Kontext enthalten (Hsp-HER2/neu₂₆₋₁₃₆). Diese Proteine wurden ebenfalls hinsichtlich ihres Hsp-vermittelten Adjuvanseffektes untersucht. Dabei zeigte sich, dass diese längeren Fusionsproteine in den Zytotoxizitätsstudien zwar eine T-Zellaktivierung auslösten, aber im Vergleich zum Peptid und den kürzeren Fusionsproteinen eine deutlich geringere Immunogenität besaßen (Abb. 32). Es fiel weiterhin auf, dass das Protein mHsp70L1-HER2/neu₂₆₋₁₃₆ keine Immunantwort auslöste. Da dies mit den vorigen Beobachtungen korreliert, liegt die Schlussfolgerung nahe, dass Hsp70L1 im direkten Vergleich zu den übrigen Hitzeschockproteinen die schwächste adjuvante Wirkung besitzt. Wiederum zeigte sich bei diesem Fusionsprotein die Diskrepanz zwischen Zytotoxizitätsstudie und Tumorstudie, welches wie die übrigen Proteine nach prophylaktischer Immunisierung das Tumorwachstum signifikant verlangsamt (Abb. 41a und 41B). Es wird, wie bereits diskutiert, angenommen, dass mHsp70L1-HER2/neu₂₆₋₁₃₆ nicht immunogen genug war, um antigenspezifische T-Zellen zu aktivieren, die im Zytotoxizitätstest detektiert werden sollten. Nach der prophylaktischen Immunisierung jedoch wird neben der adaptiven Immunität auch das angeborene Immunsystem stimuliert, das zum Zeitpunkt der Tumorinokulation noch vorherrscht, so dass die antitumorale Wirkung von Immunzellen der angeborenen Immunität ausgehen könnte, die möglicherweise durch mHsp70L1-HER2/neu₂₆₋₁₃₆ primär induziert wurden. Der antitumorale Effekt aller Hsp-HER2/neu₂₆₋₁₃₆-Fusionsproteine ging nach einer prophylaktischen Immunisierung ohne die zusätzliche Gabe des Adjuvans CpG allerdings verloren. Dies untermauert die in den Zytotoxizitätsstudien getroffene Schlussfolgerung, dass diese Proteine im Vergleich zu den kürzeren Fusionsproteinen, die ohne zusätzliches Adjuvans das

Tumorstadium reprimieren konnten, deutlich weniger immunogen waren. Es bleibt unklar, ob die Prozessierung der Proteine aufgrund unterschiedlicher Sequenzkontexte in den Hsp-HER2/neu₂₆₋₁₃₆-Fusionsproteinen weniger effektiv war als in den Fusionsproteinen Hsp-HER2/neu_{TE} mit nachgestelltem Tandemepitop.

Eine wichtige Beobachtung war in diesem Antigen-System, dass das HER2/neu₂₆₋₁₃₆-Kontrollprotein, obgleich es keine zytotoxische antigenspezifische Immunität auslöste (Abb. 32), in den Tumorexperimenten denselben antitumoralen Effekt aufwies wie die entsprechenden Hsp-Fusionsproteine (Abb. 41). Dies untermauert die Befunde einer anderen Arbeit, in der ein m.tub.Hsp70-OVA Fusionsprotein mit rekombinantem Ovalbumin verglichen wurde und ebenfalls kein Immunogenitätsvorteil des Fusionsproteins festgestellt werden konnte (Marincek, 2008). Dieses Ergebnis stellt den Adjuvaneffekt der Hitzeschockproteine eindeutig in Frage und steht im Widerspruch zu veröffentlichten Daten, die zeigen, dass das Fusionsprotein einen deutlichen Immunogenitätsvorteil gegenüber dem äquivalenten Protein ohne den adjuvanten Hsp-Teil besitzt (Wu *et al.*, 2005).

Analog zu den Hsp-HER2/neu₂₆₋₁₃₆ Proteinen wurden in BALB/c-Mäusen auch Fusionsproteine getestet, die eine zusätzliche N-terminale Zellpenetrationssequenz (tat) enthielten. Die aus dem tat-Protein des humanen Immundefizienz-Virus (HIV) stammende Sequenz ist für verschiedene Proteinfunktionen des Proteins tat verantwortlich, aber hauptsächlich wegen der über diese Sequenz vermittelten zellulären Aufnahme bekannt (Fawell *et al.*, 1994). Da in früheren Studien gezeigt werden konnte, dass dieses Peptid die Aufnahme von extrazellulären Proteinen erleichtert (Cao *et al.*, 2002), sollte hier untersucht werden, ob die rekombinanten Proteine mit der tat-Sequenz eine stärkere HER2/neu-spezifische Immunantwort auslösen können. Durch das identische Tumorstadium der tat-Hsp-HER2/neu₂₆₋₁₃₆-Fusionsproteine im Vergleich zu dem Protein tat-HER2/neu₂₆₋₁₃₆ (Abb. 41D) zeigte sich, dass analog zu den Beobachtungen bei den Hsp-HER2/neu₂₆₋₁₃₆-Fusionsproteinen, der Hsp-Anteil den Proteinen keine höhere Immunogenität verlieh. Da die Fusion der tat-Sequenz die antitumorale Immunantwort der rekombinanten Fusionsproteine im Vergleich zu den Hsp-HER2/neu₂₆₋₁₃₆-Proteinen ohne das zellpenetrierende Peptid deutlich verstärkte (Abb. 41C und Abb. 41D), wird angenommen, dass die tat-Sequenz die zytoplasmatische Aufnahme der Proteine in DC verbessert. Die durch die tat-Translokationssequenz erhöhte Immunantwort wird ausführlicher in **7.3.2** diskutiert.

Im Hinblick darauf, dass zwar einerseits die kurzen Hsp-TYLPTNASL-Fusionsproteine einen stärkeren immunogenen Effekt als das synthetische Peptid besaßen, andererseits die (tat)-Hsp-HER2/neu₂₆₋₁₃₆-Fusionsproteine aber keinen Vorteil gegenüber dem unfusionierten (tat)-HER2/neu₂₆₋₁₃₆-Protein darstellten, wird nun spekuliert, dass der immunologische Vorteil nicht auf den Hsp-Anteil, sondern auf den Vorteil einer Proteinimmunisierung zurückzuführen ist. Andere Studien zeigten, dass eine Immunisierung mit dem Modellantigen Ovalbumin, das als Fusionsprotein mit dem anti-DEC205 Antikörper vorliegt, eine starke lang anhaltende OVA-spezifische CD8⁺ T-Zellantwort auslöste (Bonifaz *et al.*, 2004). Dieser durch das Protein verursachte Depoteffekt und die damit verknüpfte längere Präsentation des Antigens könnte auch hier den Proteinen gegenüber den Peptiden stärkere Immunogenität verliehen haben.

Da rekombinant hergestellte Proteine mit synthetischem Peptid verglichen wurden, muss der LPS-Restgehalt in den Proteinlösungen mitberücksichtigt werden. Zwar wurde das Endotoxin stets abgereichert, so dass die Proteine als LPS-frei bzw. leicht LPS-kontaminiert angesehen werden konnten, die verbliebene Konzentration könnte aber dennoch Einfluss auf die Immunogenität des Proteins nehmen. Die Tatsache, dass die Rezeptoren TLR-4 und TLR-2 für die Hsp-induzierte DC Maturierung vorgeschlagen wurden, ließen erste Zweifel aufkommen, ob wirklich die Hitzeschockproteine oder eher kontaminierende Endotoxine für die beobachteten adjuvanten Effekte verantwortlich sind (Wallin *et al.*, 2002). Auch wenn in vielen der bisherigen Studien einige LPS-bindende Reagenzien wie Polymixin B eingesetzt wurden, um das LPS zu neutralisieren, muss dennoch von einem geringen Restgehalt ausgegangen werden. Es konnte außerdem gezeigt werden, dass stark Endotoxin abgereicherte Hitzeschockproteine ihren Adjuvanseffekt verlieren (Reed *et al.*, 2003; Marincek, 2008). Da das abgereicherte LPS alleine allerdings ebenfalls keine DC-Maturierung induzieren konnte (Radsak *et al.*, 2003), kam die Vermutung auf, dass die Hitzeschockproteine und LPS einen synergetischen Effekt besitzen. Der von Warger und Mitarbeitern (2006) postulierte Effekt, dass gp96 die Immunogenität geringer Mengen des Endotoxin LPS und anderer TLR Liganden verstärkt, könnte sich auch auf andere Hitzeschockproteine übertragen lassen. Daher wäre denkbar, dass die Fusionsproteine durch die immer noch vorhandenen geringen LPS-Mengen einen immunologischen Vorteil gegenüber dem synthetisch hergestellten Peptid besitzen.

7.2.6 Die Hsp-HER2/neu_{TE}-Fusionsproteine zeigen einen maturierenden Effekt auf dendritische Zellen

Zur Untersuchung des Adjuvanseffektes der rekombinanten Hsp-HER2/neu_{TE}-Fusionsproteine wurden murine BMDC mit den Proteinen inkubiert und die Zellen hinsichtlich ihrer Oberflächenexpression untersucht. Verschiedene Studien zeigten, dass die Beladung unreifer DC mit Hitzeschockproteinen zur Reifung und Stimulation dieser Zellen führt (Asea *et al.*, 2000; Kuppner *et al.*, 2001). Analog zu diesen Daten induzierten die Proteine mHsp70-HER2/neu_{TE}, mHsc70-HER2/neu_{TE} und *m.tub.*Hsp70-HER2/neu_{TE} eine verstärkte Expression der kostimulatorischen Moleküle CD80, CD86 und CD40 (Abb. 42). Diese Protein-induzierte BMDC-Maturierung war konzentrationsabhängig. Ähnlich wie bei Kuppner und Mitarbeitern (2001) wurde deutlich, dass hohe Mengen des Proteins *m.tub.*Hsp70-HER2/neu_{TE} einen LPS-ähnlichen stimulatorischen Effekt auf BMDC haben. Allerdings konnten nur von dem Protein *m.tub.*Hsp70-HER2/neu_{TE} ausreichend hohe Ausbeuten erzielt werden, so dass die restlichen Hsp-Fusionsproteine nicht in äquivalent hohen Konzentrationen getestet werden konnten. Das Protein mHsp70L1-HER2/neu_{TE} zeigte keinen BMDC-maturierenden Effekt *in vitro*, was wiederum auf eine geringere Immunogenität dieses Proteins im Vergleich zu den restlichen untersuchten Hsp-Fusionsproteinen schließen lässt. Andere Studien dagegen konnten zeigen, dass dieses Hitzeschockprotein einen DC-maturierenden Effekt besitzt (Wan *et al.*, 2004). Es bleibt unklar, ob das hier hergestellte Fusionsprotein eventuell aufgrund von Faltungsfehlern nicht die entsprechenden

Rezeptoren auf den DC binden und diese somit aktivieren konnte oder die starke LPS-Abreicherung für das Ausbleiben der DC-Maturierung verantwortlich war. Sowohl durch die Zytotoxizitäts- als auch die Tumorstudien liegt die Vermutung nahe, dass der immunogene Effekt der Hsp-Fusionsproteine weniger auf den Hsp-Anteil, sondern eher auf ihren Proteincharakter zurückzuführen war. Daher müsste hier das Protein HER2/neu₂₆₋₁₃₆ noch zusätzlich untersucht werden, um Rückschlüsse auf den Hsp-vermittelten maturierenden Effekt der Proteine zu ermöglichen. Verglichen mit anderen Arbeiten induzierten die Hsp-Fusionsproteine auf den BMDC jedoch nur eine geringe Zunahme des MFI. Somit bleibt es fraglich, ob die detektierte Expressionssteigerung hier tatsächlich eine physiologische Relevanz besitzt.

7.3 Hsp-HER2/neu-Fusionsprotein vermittelte Induktion einer HER2/neu-spezifischen Immunantwort gegen ein Selbstpeptid

Protoonkogene wie HER2/neu zeichnen sich durch ihre erhöhte Expression in Tumorzellen aus und dienen daher als Targetmolekül für die Immuntherapie. Die Tatsache, dass HER2/neu ein körpereigenes Protein ist, wirft das Problem der Selbsttoleranz auf. Da trotz der negativen Selektion selbstreaktiver T-Zellen in vielen Mammakarzinompatientinnen HER2/neu-spezifische T-Zellen detektierbar sind, ist klar, dass die klonale Deletion nicht absolut ist. Einige selbstreaktive T-Zellen können der zentralen Toleranz entkommen, werden aber durch Mechanismen der peripheren Toleranz anergisch. Für eine wirkungsvolle Immuntherapie gegen HER2/neu ist die Umgehung dieser Toleranz essentiell und stellt in der Tat die größte Herausforderung in der Tumorstudie dar.

Die in dieser Arbeit generierten Hsp-HER2/neu_{TE}-Fusionsproteine wurden neben der in **7.2** beschriebenen Evaluierung hinsichtlich ihres immunogenen Hsp-Anteils auch in Bezug auf ihr Potenzial geprüft, eine gegen das Selbstprotein HER2/neu gerichtete Immunantwort zu induzieren. Die Aminosäuresequenz des Epitops PYVSRLLLGI ist in Maus und Mensch vollkommen identisch, so dass die Verwendung der Fusionsproteine mit den K^d-restringierten HER2/neu-generierten CD8⁺ T-Zellepitopen TYLPTNASL und PYVSRLLLGI die Untersuchung dieser Fragestellung in BALB/c-Mäusen zuließ. Zusätzlich wurde die Induktion einer gegen Selbst gerichteten Immunantwort in HHD-Mäusen untersucht. Hier wurden die Tiere mit Hsp-HER2/neu₂₉₉₋₅₇₉ immunisiert, die ein HER2/neu-Fragment mit dem dominanten CD8⁺ T-Zellepitop KIFGSLAFL enthielten, das ebenfalls in Maus und Mensch identisch ist.

7.3.1 Eine gegen das Selbstprotein HER2/neu gerichtete Immunantwort kann durch die Hsp-HER2/neu-Fusionsproteine nicht induziert werden

Das aus HER2/neu stammende Peptid PYVSRLGI wurde als CD8⁺ T-Zellepitop beschrieben, gegen das spezifische T-Zellen induziert werden können. Die Immunisierung von Mäusen mit diesem Peptid bewirkte die Induktion antigenspezifischer Effektorzellen (Nagata *et al.*, 1997). In der hier vorliegenden Arbeit konnten jedoch keine PYVSRLGI-spezifischen CD8⁺ T-Zellen in BALB/c-Mäusen induziert werden. Weder die Immunisierung mit dem synthetischen Peptid (Abb. 26), noch die Applikation des Fusionsproteins *m.tub.Hsp70-HER2/neu_{TE}* (Abb. 28D und 28E) aktivierte selbstreaktive PYVSRLGI-spezifische T-Zellen. Bei der Peptidimmunisierung wurde das Peptid PYVSRLGI in Kombination mit dem zweiten CD8⁺ T-Zellepitop TYLPTNASL verabreicht. Da auch im rekombinanten Protein beide Epitope enthalten waren, konnte so die Aktivierung PYVSRLGI-spezifischer und TYLPTNASL-spezifischer T-Zellen parallel untersucht werden. Einer der Gründe, warum keine PYVSRLGI-spezifischen T-Zellen induziert wurden, könnte in der Kombination beider Peptide in einer Immunisierung liegen. Die so genannte Epitopkompetition (*epitope competition*) wurde *in vivo* erstmalig von Adorini und Mitarbeitern (1988) beschrieben, die zeigten, dass durch die Kombination zweier T-Zellepitope, die an dasselbe MHC-Molekül binden, die T-Zellantwort gegen das in geringerer Menge verabreichte Peptid signifikant geschwächt wird. Zwar wurden hier die Peptide PYVSRLGI und TYLPTNASL in äquimolarer Menge injiziert, dennoch wäre es möglich, dass die Konkurrenz der Epitope um dasselbe MHC-Klasse-I-Molekül die Bindung nur eines der beiden Peptide begünstigen würde. Der damit verbundene Affinitätsunterschied beider Epitope zu den K^d-Molekülen wurde in einem Affinitätsvergleich analysiert. Dabei zeigte sich, dass das Epitop TYLPTNASL eine wesentlich stärkere Affinität zu K^d besaß als das Peptid PYVSRLGI (Abb. 27). Dieser Unterschied könnte ein weiterer Grund dafür sein, dass keine gegen PYVSRLGI gerichteten spezifischen T-Zellen detektierbar waren. Zusätzlich muss die Homologie dieses Epitops zur murinen Sequenz berücksichtigt werden. Das applizierte humane Epitop TYLPTNASL unterscheidet sich in einer Aminosäure von der murinen Sequenz TYLPANASL, während PYVSRLGI in beiden Spezies vollständig identisch ist. Daher ist möglich, dass PYVSRLGI-spezifische T-Zellen tolerant sind und nicht aktiviert werden können. Die Diskrepanz zwischen den hier erhaltenen und von Nagata und Mitarbeitern (1997) beschriebenen Daten könnte außerdem auf den unterschiedlichen Immunisierungsstrategien beruhen. Während hier mit den Peptiden alleine bzw. mit dem Fusionsprotein immunisiert wurde, verwendeten Nagata und Mitarbeiter (1997) Peptid-beladene Milzzellen bzw. HER2/neu-transfizierte Tumorzellen, die aufgrund von zusätzlichen kostimulatorischen Molekülen offensichtlich ein stärkeres immunogenes Potential besaßen als die alleinige Verabreichung der Peptide bzw. des Fusionsproteins.

Neben der Aktivierung einer PYVSRLGI-spezifischen Immunität wurde im BALB/c-Mausmodell auch die potentielle Induktion einer gegen das Selbstpeptid TYLPANASL gerichteten Immunantwort analysiert. Gritzapis und Mitarbeiter (2006) konnten zeigen, dass die Aktivierung von selbstreaktiven T-Zellen durch eine Immunisierung mit einem HER2/neu-Selbstpeptid nicht möglich war. Immunisierten sie die Tiere allerdings mit einem xenogen veränderten Epitop, in ihrem Fall mit dem

humanen Peptid, das sich in einer Aminosäure von dem murinen Epitop unterscheidet, so konnten sie eine Kreuzreaktion zum murinen Selbstepitop induzieren. Aufgrund dieser Beobachtungen sollte untersucht werden, ob auch das in den Fusionsproteinen enthaltene humane Epitop TYLPINASL T-Zellantworten induzieren kann, die sich gegen das murine Selbstepitop richten. Eine frühere Studie konnte genau dies zeigen, indem durch die Vakzinierung mit dem humanen Peptid TYLPINASL sowohl antigenspezifische T-Zellen aktiviert wurden, diese T-Zellen aber auch eine Kreuzreaktivität zur murinen Sequenz TYLPANASL besaßen (Nagata *et al.*, 1997). Allerdings stellte sich in der hier vorliegenden Arbeit heraus, dass weder die Peptidimmunisierung, noch die Immunisierung mit den verschiedenen Hsp-HER2/neu_{TE}-Fusionsproteinen eine Reaktivität zu TYLPANASL induzierte (Abb. 29C und 29D). Gründe, warum hier keine Kreuzreaktivität erzielt wurde, könnten bei den unterschiedlichen Adjuvanzen in den einzelnen Vakzinierungsstrategien liegen. Durch die Wahl eines zusätzlichen Adjuvans wie GM-CSF, das eines der effektivsten DC-aktivierenden Zytokine ist (Disis *et al.*, 1996b; Disis *et al.*, 1999), und mehrfacher Applikation des Antigens bzw. der Adjuvanzen (Gritzapis *et al.*, 2006) könnte eventuell in zukünftigen Experimenten eine Kreuzreaktivität durch die Hsp-Fusionsproteine erzielt werden.

Parallel zum BALB/c-System wurde die Induktion einer gegen das Selbstprotein HER2/neu gerichteten Immunantwort in dem transgenen Mausmodell HHD untersucht. Die Hsp-HER2/neu₂₉₉₋₅₇₉-Fusionsproteine enthielten das dominante HLA-A2-restringierte CD8⁺ T-Zellepitop KIFGSLAFL. Die Immunisierung der Tiere mit dem Peptid KIFGSLAFL induzierte selbstreaktive INF γ -sekretierende CD8⁺ T-Zellen (Abb. 33). Dadurch wird deutlich, dass trotz der negativen Selektion nicht alle KIFGSLAFL-spezifischen T-Zellen vernichtet werden, sondern diese aktiviert werden können, was frühere Beobachtungen bestätigt (Murray *et al.* 2002). Es zeigte sich jedoch, dass die Proteine *m.tub*.Hsp70-HER2/neu₂₉₉₋₅₇₉ und Hsp70-HER2/neu₂₉₉₋₅₇₉ im Gegensatz zur Peptidimmunisierung keine KIFGSLAFL-spezifische Immunität auslösten (Abb. 34). Die Injektion geringerer Peptidmengen, analog zur Proteinimmunisierung, induzierten ebenfalls keine HER2/neu-spezifischen T-Zellen mehr (Abb. 35). Daher wird vermutet, dass die unterschiedliche Antigenmenge, die jeweils appliziert wurde, den Grund für die Immunogenitätsunterschiede zwischen Peptid und Protein bildet. Dennoch kann nicht ausgeschlossen werden, dass die Fusionsproteine im HHD-Mausssystem nicht effizient genug aufgenommen und prozessiert wurden, was eine weitere Ursache für die mangelnde Immunogenität der Hsp-Fusionsproteine in HHD-Mäusen sein könnte.

7.3.2 Peptidmodifikationen erhöhen die Immunantwort gegen das Selbstepitop KIFGSLAFL

Während der klonalen Deletion werden vorrangig selbstreaktive T-Zellen mit einem hoch affinen TCR aus dem T-Zellrepertoire entfernt oder aber diese autoreaktiven T-Zellen werden in der Peripherie inaktiviert. Daher gilt es als schwierig, diese T-Zellen zur Induktion einer gegen Selbst gerichteten Immunantwort zu aktivieren. Stattdessen kam die Überlegung auf, T-Zellen zu stimulieren, die

ebenfalls das Selbstprotein HER2/neu erkennen, aber eine Reaktivität gegen ein niedrig affines Epitop besitzen (Scardino *et al.*, 2001). Der Vergleich verschiedener HLA-A2-restringierter HER2/neu-generierter CD8⁺ T-Zellepitope unterschiedlicher Affinität zeigte, dass durch die Immunisierung von HHD-Mäusen mit den murinen HER2/neu-Peptiden KIFGSLAFL und ILHDGAYSL mit hoher bzw. mittlerer Affinität zum MHC-Molekül eine Aktivierung autoreaktiver T-Zellen induziert werden konnte, während jedoch das niedrig affine HER2/neu Epitop AWCRWGFL diese Immunogenität nicht besaß (Abb. 36A). Somit konnten die Beobachtungen von Scardino und Mitarbeitern (2001), die zeigen, dass eben dieses Peptid in HHD-Mäusen eine HER2/neu spezifische Immunantwort induziert, hier nicht bestätigt werden.

Da die höchste HER2/neu-spezifische Immunantwort durch die Applikation des Selbstpeptids KIFGSAFL induziert werden konnte, wurde an diesem Epitop die Möglichkeit einer Erhöhung der Immunantwort durch verschiedene Peptidmodifikationen untersucht. Durch den Austausch der Aminosäuren an Position 2 und 9 des Peptids, die den Anker für die Peptidbindung an die MHC-Moleküle bilden, kann die Affinität zum MHC-Klasse-I-Molekül verbessert werden (Vertuani *et al.*, 2004). Die Immunisierung von HHD-Mäusen mit dem synthetischen Peptid KVFGSAFV konnte die spezifische Immunantwort gegen das dominante CD8⁺ T-Zellepitop KIFGSLAFL im Vergleich zur Immunisierung mit dem unveränderten Peptid deutlich erhöhen (Abb. 36B und 36C). Dies bestätigt die Beobachtungen einer früheren Studie, in der bereits gezeigt werden konnte, dass der Austausch der Aminosäuren Isoleucin und Leucin gegen Valin die Affinität des modifizierten Epitops an MHC verbessert und damit eine stärkere Immunogenität gegen das Selbstepitop KIFGSLAFL erreicht wird (Vertuani *et al.*, 2004). Es wird vermutet, dass aufgrund der verbesserten Affinität eine höhere Stabilität des MHC:Peptid-Komplexes erreicht wird und damit die Wahrscheinlichkeit steigt, dass eine antigenpräsentierende dendritische Zelle den Lymphknoten erreicht und auf die spezifische T-Zelle trifft. Obwohl diese Modifikationen die Ankerregionen des Peptids für die MHC-Bindung betrafen, die TCR-Bindungsstelle aber unverändert ließen, besteht auch die Möglichkeit, dass neben der Affinitätserhöhung zum MHC-Molekül auch die Avidität des Komplexes zur T-Zelle und damit die Immunogenität des Peptids verbessert wird. Diese stärkere T-Zellavidität könnte indirekt durch einen stabileren MHC:Peptid-Komplex erreicht werden, oder aber von Konformationsänderungen in der TCR-Bindungsstelle rühren, welche durch die Veränderung der MHC-Ankermotive verursacht werden (Vertuani *et al.*, 2004).

Neben der Erhöhung der Affinität zum MHC-Molekül sollte der Einfluss einer N-terminalen tat-Translokationssequenz im Hinblick auf eine erhöhte Immunogenität des CD8⁺ T-Zellepitops untersucht werden. Dieses 11 Aminosäure lange Peptid des HIV-1 Transaktivator Proteins (tat) wurde als Zellpenetrierendes Peptid beschrieben, das *in vitro* und *in vivo* effizient die Aufnahme verschiedener Moleküle durch die Plasmamembran vermitteln kann (Rinne *et al.*, 2007). Es konnte gezeigt werden, dass dieses Peptid an der Internalisierung von kleinen Peptiden (Lindsay, 2002), DNA (Sandgren *et al.*, 2002) und Proteinen (Fawell *et al.*, 1994) beteiligt ist. Die Immunisierung der HHD-Mäuse mit dem tat-verlängerten T-Zellepitop induzierte eine deutlich stärkere KIFGSLAFL-spezifische Immunantwort als das unmodifizierte Peptid. Auch die durch den zuvor beschriebenen Aminosäureaustausch erhöhte

Immunogenität von KVFGLAFV konnte weiter verbessert werden (Abb. 36C und 36D). Das Peptid tat-KIFGLAFL muss zunächst prozessiert werden, um eine Antigenerkennung durch T-Zellen zu ermöglichen. Es wurde gezeigt, dass die durch die tat-Sequenz vermittelte Aufnahme der transportierten Moleküle über Endozytose bzw. Makropinozytose erfolgt (Richard *et al.*, 2005; Wadia *et al.*, 2004). Daher vermuten wir, dass der Vorteil der Fusion des CD8⁺ T-Zellepitops mit der tat-Sequenz hinsichtlich einer stärkeren Immunogenität darin besteht, dass das Antigen vorrangig von phagozytierenden Zellen wie den Makrophagen oder DC prozessiert und präsentiert wird. Wenn das Peptid dagegen ohne die tat-Sequenz verabreicht wird, erfolgt die Bindung auf sämtlichen Zellen, die das HLA-A2-Molekül exprimieren, so dass die Zahl der antigenbeladenen DC vergleichsweise geringer ist und im direkten Vergleich eine geringere T-Zellaktivierung erfolgen kann.

Die im HDD-System beobachtete Erhöhung der Immunogenität des CD8⁺ T-Zellepitops KIFGLAFL durch die Zellpenetrationssequenz (tat) konnte im BALB/c-Modell nur teilweise reproduziert werden. Eine Immunisierung der BALB/c-Mäuse mit dem rekombinanten Protein HER2/neu₂₆₋₁₃₆ induzierte eine schwächere zytotoxische TYLPTNASL-spezifische T-Zellantwort als das äquivalente Protein mit einer N-terminalen tat-Sequenz (tat-HER2/neu₂₆₋₁₃₆) (Abb. 32). Im Tumorversuch wurde ebenfalls deutlich, dass die tat-Proteine einen stärkeren antitumoralen Effekt besitzen als die äquivalenten Proteine ohne die zellpenetrierende Sequenz (Abb. 41C und 41D). Der direkte Vergleich des tat-TYLPTNASL Peptids mit dem unmodifizierten Epitop jedoch zeigte keinen immunogenen Vorteil des verlängerten Peptidkonstruktes (Abb. 37). Es bleibt unklar, warum die Immunogenität dieses Epitops auf Peptidebene nicht gesteigert werden konnte. Möglich wäre, dass die verlängerten Peptide im BALB/c-System vorrangig proteolytisch abgebaut wurden, so dass keine verstärkte Kreuzpräsentation der aufgenommenen Peptide erfolgte.

7.4 Einsatz der MHC-Klasse-I:Peptid-Fc-Dimere zur Detektion antigenspezifischer T-Zellen

Die Untersuchung der nach der Peptid- bzw. Proteinimmunisierung aktivierten HER2/neu-spezifischen CD8⁺ T-Zellen basierte in den bisher diskutierten Experimenten dieser Arbeit auf funktionsabhängigen Detektionsmethoden. Die T-Zellen wurden nach der Aktivierung kurzzeitig restimuliert, um hinsichtlich ihrer Zytokinsekretion analysiert zu werden, oder aber ihr zytotoxisches Potential wurde untersucht. Beide Detektionsmethoden stellen so genannte funktionelle Untersuchungen dar und erfassen somit nur antigenspezifische Zellen, welche nach der Antigenstimulation mit einer definierten Effektorfunktion reagieren. Zellpopulationen, die ebenfalls antigenspezifisch, aber für die gewählte funktionelle Detektionsmethode inaktiv sind, können hiermit nicht erfasst werden.

Damit sämtliche antigenspezifische T-Zellen untersucht werden können, wurden dimerisierte MHC:Peptid-Immunglobulin-Fusionsproteine hergestellt, die in einem funktionsunabhängigen Detektionsverfahren die Identifizierung und Quantifizierung der antigenspezifischen T-Zellen über die

Bindung des TCR erlauben. Frühere Studien zeigten, dass lösliche Peptid-beladene MHC-Komplexe für die Analyse spezifischer T-Zellen sehr nützlich sein können (Greten und Schneck, 2002). Dabei kommen tetramere oder pentamere MHC-Klasse-I-Komplexe zum Einsatz. Die Biotinylierung von MHC:Peptid-Molekülen ermöglicht über die Bindung an Avidin die Bildung von multimeren MHC-Komplexen. Die Herstellung dieser Moleküle, die zunächst in Bakterien exprimiert werden und sich anschließend in Anwesenheit des gewünschten Peptids optimal falten müssen, ist allerdings sehr mühsam. Alternativ wurden dimerisierte MHC-Immunglobulin-Fusionsproteine entwickelt (Dal Porto *et al.*, 1993; Greten *et al.*, 1998). Diese Moleküle wurden durch externe Zugabe des gewünschten Peptids mit dem Antigen der Wahl beladen. Da das Peptid aber nicht-kovalent mit dem MHC-Molekül verbunden ist, kann es auch wieder abdissoziieren, wodurch eine stabile Peptidbeladung des MHC-Moleküls und damit eine solide TCR-Erkennung nicht garantiert werden.

Analog zu der Arbeit von Greten und Mitarbeiter (2002) wurde hier ein MHC:Peptid-Ig-Dimer entwickelt, in dem das Peptid kovalent mit der β_2m -Untereinheit des MHC-Klasse-I-Moleküls verbunden ist. Durch die eukaryontische Expression dieser Moleküle konnte die zuvor nötige *in vitro* Faltung umgangen werden (Schneck *et al.*, 1999). Trotz des eukaryontischen Expressionssystems wurde nach der Aufreinigung der Fusionsproteine mittels Affinitätschromatographie über den konstanten Teil des IgG₁ Moleküls ein recht hohe Ausbeute von 2 mg/ml für das K^d:TYLPTNASL-Dimer und immerhin 0.2 mg/ml für das HLA-A2:KIGSLAFL-Dimer erzielt. Biochemische Untersuchungen der Dimere zeigten die erwartete Molekülgröße durch die Detektion der konstanten Region des IgG₁ (Abb. 25). Eine wichtige Beobachtung war, dass durch die Färbung von Milz- und Lymphknotenzellen aus immunisierten BALB/c-Mäusen (Abb. 46) bzw. von Blut- und Knochenmarkszellen HLA-A2-positiver Mammakarzinompatientinnen (Abb. 47) mit den MHC-Dimeren HER2/neu-spezifische CD8⁺ T-Zellen nachgewiesen werden konnten. Somit konnte die Peptid-spezifische TCR-Bindung durch die Dimere gezeigt werden. Die Titration der Dimere machte deutlich, dass bereits geringe Mengen wie 10 oder 100 ng des Dimers ausreichen, um die spezifischen T-Zellen gegenüber unspezifischen Zellen aus PBS-immunisierten Mäusen bzw. aus gesundem Spenderblut sichtbar zu machen. Generell ist ein Nachweis antigenspezifischer T-Zellen aus einem polyklonalen T-Zellrepertoire aufgrund der nur geringen Zahl spezifischer Zellen sehr schwierig. Zwar wurde der Prozentsatz der TYLPTNASL-spezifischen T-Zellen nach einer fünftägigen *in vitro* Restimulation um das zirka dreifache erhöht (Abb. 46C), eine weitere Anreicherung der spezifischen T-Zellen könnte den Nachweis über die Dimere aber verstärken und so eine deutlichere Unterscheidung zu unspezifisch angefärbten Zellen ermöglichen (Greten *et al.*, 2002).

Diese ersten Untersuchungen zeigen, dass die hier hergestellten Dimere eine spezifische Detektion HER2/neu-spezifischer T-Zellen erlauben und neben den kommerziell erhältlichen Tetrameren und Pentameren eine Alternative für den Nachweis antigenspezifischer T-Zellen darstellen könnten. Parallel zur Detektion antigenspezifischer T-Zellen könnten die hier entwickelten Dimere auch zur Generierung einer HER2/neu-spezifischen T-Zelllinie angewandt werden. Analog zu den Arbeiten von Greten und Mitarbeitern (2002) könnten Peptid-spezifische CD8⁺ T-Zellen durch die Kombination des MHC:Peptid-

IgG₁-Dimers und eines magnetisch gekoppelten Antikörpers, der gegen die konstante Region des IgG₁-Moleküls gerichtet ist, isoliert und in Kultur genommen werden.

7.5 Potential der Hitzeschockproteine in der Immuntherapie – ein Ausblick

Zusammenfassend zeigen die Daten der vorliegenden Arbeit, dass die Hitzeschockproteine, entgegen der Beobachtungen früherer Studien, keinen Adjuvanseffekt in den hier hergestellten Hsp-HER2/neu-Fusionsproteinen besitzen. Zwar konnte durch die Immunisierung mit den rekombinanten Proteinen mHsp70-HER2/neu_{TE} bzw. mHsc70-HER2/neu_{TE} und in geringerem Maße ebenso durch *m.tub.*Hsp70-HER2/neu_{TE} ein deutlicher Immunogenitätsvorteil im Vergleich zur Peptidimmunisierung erzielt werden, da aber in einem direkten Vergleich die Hsp-HER2/neu₂₆₋₁₂₆-Fusionsproteine und das rekombinant hergestellte HER2/neu₂₆₋₁₃₆ dieselbe Immunogenität besaßen, muss davon ausgegangen werden, dass in dem hier untersuchten System die Hsp-Anteile keinen verstärkenden Effekt auf die Immunantwort ausüben und der Vorteil der Fusionsproteine gegenüber dem Peptid eher in der Proteinimmunisierung an sich zu suchen ist.

Da die durch die Hsp-Fusionsproteine induzierte Immunität sowohl in den Zytotoxizitätsanalysen als auch in den Tumorstudien stärker als die der Peptide war, liegt die Schlussfolgerung nahe, dass ein proteinbasiertes Vakzin gegenüber Peptiden zu bevorzugen ist. Diese Arbeit zeigt jedoch, dass Fusionsproteine auf der Basis von Hitzeschockproteinen, wie sie hier zum Einsatz kamen, als Vakzinen in der Immuntherapie nicht optimal sind und keinen Vorteil gegenüber unfusionierten rekombinanten Proteinen bilden. In dem hier getesteten Antigen-System reichte der Adjuvanseffekt der Hitzeschockproteine offenbar nicht aus, so dass klar wird, dass für zukünftige Immunisierungsstrategien andere Adjuvantien als die Hitzeschockproteine eingesetzt werden müssen. So könnte z. B. parallel zum Tumorantigen, das präferentiell als Protein dargeboten werden sollte, GM-CSF integriert werden, das erfolgreich in verschiedenen Studien (Murray *et al.*, 2002) eingesetzt wurde. Eine Immunisierungsstrategie, die eine Beladung von DC mit den Proteinen vorsieht, könnte die Immunantwort durch die parallel zur Antigenpräsentation vorhandene Kostimulation und Sekretion verschiedener proinflammatorischer Moleküle deutlich verbessern. Wir vermuten, dass durch eine Integration des T-Helferepitops ebenfalls eine bessere Immunogenität erzielt werden könnte, da das Epitop über die Aufnahme des Proteins direkt in die Zielzellen, also die antigenpräsentierenden Zellen gelangt und optimal präsentiert wird.

Bezüglich einer gegen das HER2/neu-spezifische Selbstepitop KIFGSLAFL gerichteten Immunantwort konnte durch die Immunisierung mit modifizierten Peptiden die höchste Immunogenität erzielt werden. Hier wäre denkbar, dass Proteinvakzinen, die diese Modifikationen beinhalten, eine noch stärkere gegen Selbst gerichtete Immunantwort bewirken als eine Immunisierung auf Peptidebene.

Der Widerspruch hinsichtlich des Adjuvanseffektes der Hitzeschockproteinanteile der hier eingesetzten Fusionsproteine zu früheren Arbeiten könnte unter anderem auf höhere LPS-Kontaminationen in den applizierten Proteinlösungen zurückgeführt werden. Zwar wurde in sämtlichen Arbeiten das Endotoxin

stets abgereichert, da aber bereits geringe LPS-Mengen in Kombination mit Hsp einen synergetischen Effekt besitzen und eine starke Immunantwort induzieren können (Warger *et al.*, 2006), ist es schwer einen Einfluss des Endotoxins auf die gemessene Immunität völlig auszuschließen. Auch könnten Unterschiede in den Antigenadministrationswegen die Ursache für den hier beobachteten Mangel an zusätzlicher Immunogenität der Hsp-Fusionsproteine bilden. Eine Immunisierung mit einem rekombinanten Fusionsprotein ist z. B. nicht vergleichbar mit aus Tumorlysat gewonnenen Hitzeschock:Peptid-Komplexen, die sicherlich aufgrund der enthaltenen Vielfalt an Antigenen ein höheres immunologisches Potential besitzen.

Somit wird durch die Ergebnisse dieser Arbeit deutlich, dass die hier gewählte Immunisierungsstrategie mit Hsp-Fusionsproteinen im HER2/neu-System keine effektive Immunstimulation bewirkt. Der Hsp-induzierte Adjuvanzeffekt hängt sicherlich vom einzelnen Antigenesystem ab, sowie von der jeweiligen Immunisierungsstrategie. Dennoch muss der Einsatz von Hitzeschockproteinen in der Tumorthherapie im Allgemeinen und insbesondere im HER2/neu-System kritisch überdacht werden.

8 Literatur

- Ackerman, A. L. and Cresswell, P. (2003). Regulation of MHC class I transport in human dendritic cells and the dendritic-like cell line KG-1. *J. Immunol.* 170, 4178-4188.
- Aderem, A. and Ulevitch, R. J. (2000). Toll-like receptors in the induction of the innate immune response. *Nature* 406, 782-787.
- Adorini, L., Muller, S., Cardinaux, F. (1988). In vivo competition between self peptides and foreign antigens in T-cell activation. *Nature* 334, 623-625.
- Aida, Y. and Pabst, M. J. (1990). Removal of Endotoxin from protein solutions by phase separation using Triton X-114. *J. Immunol. Methods* 132, 191-195.
- Albert, M. L., Sauter, B., Bhardwaj, N. (1998). Dendritic cell acquire antigen from apoptotic cells and induce class I-restricted CTLs. *Nature* 392, 86-89.
- Alexander-Miller, M.A., Leggatt, G. R., Berzofsky, J. A. (1996). Selective expansion of high- or low-avidity cytotoxic T lymphocytes and efficacy for adoptive immunotherapy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 4102-4107.
- Allcock, R. J., Martin, A. M. and Price, P. (2000). The mouse as a model for the effects of MHC genes on human disease. *Immunol. Today* 21, 328-32
- Arndt, S. O., Vogt, A. B., Markovic-Plese, S., Martin, R., Moldenhauer, G., Wolpl, A., Sun, Y., Schandendorf, D., Hämmerling, G. J. and Kropshofer, H. (2000). Functional HLA-DM on the surface of B cells and immature dendritic cells. *Embo J.* 19, 1241-51.
- Asea, A. Kraeft, S. K., Kurt-Jones, E. A., Stevenson, M. A., Chen, L. B., Finberg, R. W., Koo, G. C., Calderwood, S. K (2000). HSP70 stimulates cytokine production through a CD14-dependant pathway, demonstrating its dual role as a chaperone and cytokine. *Nat. Med.* 6, 435-442.
- Avigan, D. (2004). Dendritic cell/tumour fusions vaccine. *Dev. Biol. (Basel)* 116, 161-168.
- Baines, J. and Celis, E. (2003). Immune-mediated tumor regression induced by CpG-containing oligodeoxynucleotides. *Clin. Cancer Res.* 9, 2693-2700.
- Banchereau, J. and Palucka, A. K. (2005). Dendritic cells as therapeutic vaccines against cancer. *Nat. Rev. Immunol.* 5, 296-306
- Banchereau, J. and Steinman, R. P. (1998). Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 392, 245-252.
- Baselga, J. (2001). Phase I and II clinical trials of Trastuzumab. *Ann. Oncol.* 12 Suppl. 1, 49-55
- Basu, and Srivastava, P. K. (2000). Heat shock proteins: the fountainhead of innate and adaptive immune responses. *Cell Stress. Chaperones.* 5, 443-451.
- Bauer, Y., Kramer, M.D., Wallich, R. (1999). Phenotype and function of antigen-presenting dendritic cells generated from peripheral blood monocytes. *Infusion Therapy and Transfusion Medicine* 26, 115-118.
- Becker, T., Hartl, F. U., Wieland, F. (2002). CD40, an extracellular receptor for binding and uptake of Hsp70-peptide complexes. *J. Cell. Biol.* 158, 1277-1285.
- Belli, F., Testori, A., Rivoltini, L., Maio, M., Andreola, G., Sertoli, M. R., Gallino, G., Piris, A., Cattelan, A., Lazzari, I., Carrabba, M., Scita, G., Santantonio, C, Pilla, L., Tragni, G., Lombardo, C., Arienti, F., Marchianò, A., Queirolo, P., Bertolini, F., Cova, A., Lamaj, E., Ascani, L., Camerini,

- R., Corsi, M., Cascinelli, N., Lewis, J. J., Srivastava, P., Parmiani, G. (2002). Vaccination of metastatic melanoma patients with autologous tumor-derived heat shock protein gp96-peptide complexed: clinical and immunologic findings. *J. Clin. Oncol.* 20, 4169-4180.
- Benoist, C. and Mathis, D. (1990). Regulation of major histocompatibility complex class-II genes: X, Y and other letters of the alphabet. *Annu. Rev. Immunol.* 8, 681-715.
- Berd, D., Sato, T., Maguire Jr., H. C., Kairys, J., Mastrangelo, M. J. (2004). Immunopharmacologic analysis of an autologous, hapten-modified human melanoma vaccine. *J. Clin. Oncol.* 22, 403-415.
- Binder, R. J., Blachere, N. E., Srivastava, P. K. (2001). Heat shock protein-chaperoned peptides but not free peptides introduced into the cytosol are presented efficiently by major histocompatibility complex I molecules. *J. Biol. Chem.* 276, 17163-17171.
- Binder, R. J., Vatner, R., Srivastava, P. K. (2004). The heat-shock protein receptors: some answers and more questions. *Tissue Antigens* 64, 442-451.
- Blachere, N. E., Li, Z., Chandawarkar, R. Y., Suto, R., Jaikaria, N. S., Basu, S., Udono, H., Srivastava, P. K. (1997). Heat shock protein-peptide complexed, reconstituted *in vitro*, elicit peptide-specific cytotoxic T lymphocyte response and tumor immunity. *J. Exp. Med.* 186, 1315-1322.
- Boggio, K., Nicoletti, G., Di Carlo, E., Cavallo, F., Landuzzi, L., Melani, C., Giovarelli, M., Rossi, I., Nanni, P., De Giovanni, C., Bouchard, P., Wolf, S., Modesti, A., Musini, P., Lollini, P. L., Colombo, M. P., Forni, G. (1998). Interleukin 12-mediated prevention of spontaneous mammary adenocarcinomas in two lines of Her-2/neu transgenic mice. *J. Exp. Med.* 188, 589-596.
- Bonifaz, L. C., Bonnyay, D. P., Charalambous, A., Darguste, D. I., Fujii, S.-I., Soares, H., Brimnes, M. K., Moltedo, B., Moran, T., Steinman, R. M. (2004). In vivo targeting of antigens to maturing dendritic cells via the DEC-205 receptor improves T cell vaccination. *J. Exp. Med.* 199, 815-824.
- Borsing, L., Berger, E. G., Malissard, M. (1997). Expression and purification of His-tagged beta-1,4 galactosyltransferase in yeast and in COS cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 240, 586-590.
- Byers, D. E. and Lindahl, K. F. (1999). Peptide affinity and concentration affect the sensitivity of M3-restricted CTLs induced in vitro. *J. Immunol.* 163, 3022-3028.
- Cao, G., Pei, W., Ge, H., Liang, Q., Luo, Y., Sharp, F. R., Lu, A., Ran, R., Graham, S. H., Chen, J. (2002). In Vivo Delivery of a Bcl-xL Fusion Protein Containing the TAT Protein Transduction Domain Protects against Ischemic Brain Injury and Neuronal Apoptosis. *J. Neurosci.* 22, 5423-5431.
- Carpentier, A. F., Chen, L., Maltoni, F., Delattre, J.-Y. (1999). Oligodeoxynucleotides containing CpG motifs can induce rejection of a neuroblastoma in mice. *Cancer Research* 59, 5429-5432.
- Cella, M., Sallusto, F., Lanzavecchia, A. (1997). Origin, maturation and antigen presenting function of dendritic cells. *Curr. Opin. Immunol.* 9, 10-16.
- Cerundolo, V., Hermans, I. F., Salio, M. (2004). Dendritic cells: a journey from laboratory to clinic. *Nat. Immunol.* 5, 7-10.
- Chen, B. P. and Hai, T. (1994). Expression vectors for affinity purification and radiolabeling of proteins using *Escherichia coli* as host. *Gene* 139, 73-75.

- Comoy, E.E., Capron, A., Thyphronitis, G. (1998). Adjuvant is the major parameter influencing the isotype profiles generated during immunization with a protein antigen, the *Schistosoma mansoni* Sm28-GST. *Scand. J. Immunol.* 47, 444-452 .
- Coussens, L. Yang-Feng, T. L., Liao, Y. C., Chen, E., Gray, A., McGrath, J., Seeburg, P.H., Libermann, T. A., Schlessinger, J., Francke, U. (1985). Tyrosine kinase receptor with extensive homology to EGF receptor shares chromosomal location with neu oncogene. *Science* 230, 1132-1139.
- Cresswell, P. (2005). Antigen processing and presentation. *Immunol. Rev.* 207, 5-7.
- Cresswell, P. (1996). Invariant chain structure and MHC class II function. *Cell* 84, 505-7.
- Dal Porto, J., Johansen, T. E., Catipovic, B., Parfiit, D. J., Tuveson, D., Gether, U., Kozlowski, S., Fearon, D. T., Schneck, J. P. (1993). A soluble divalent class I major histocompatibility complex molecule inhibits alloreactive T cells at nanomolar concentrations. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 6671-6675.
- Davila, E. and Celis, E. (2000). Repeated administration of cytosine-phosphorothiolated guanine-containing oligodeoxynucleotides together with peptide/protein immunization results in enhanced CTL responses with anti-tumor activity. *J. Immunol.* 165, 539-547.
- Davila, E., Velez, M. G., Heppelmann, C. J., Celis, E. (2002). Creating space: an antigen-independent, CpG-induced peripheral expansion of naïve and memory T lymphocytes in a full T-cell compartment. *Blood* 100, 2537-2545.
- Davis, M. M. and Bjorkman, P. J. (1988). T-cell antigen receptor genes and T-cell recognition [published erratum appears in *Nature* 1988 Oct 20;335(6192):744]. *Nature* 334, 395-402.
- den Haan, J. M., Lehar, S. M., Bevan, M. J. (2000). CD8(+) but not CD8(-) dendritic cells cross-prime cytotoxic T cells in vivo. *J. Exp. Med.* 192, 1685-1696.
- Dieu, M. C., Vanbervliet, B., Vicari, A., Bridon, J. M., Oldham, E., Ait-Yahia, S., Brière, F., Zlotnik, A., Lebecque, S., Caux, C. (1998). Selective recruitment of immature and mature dendritic cells by distinct chemokines expressed in different anatomic sites. *J. Exp. Med.* 188, 373-386.
- Disis, M. L., Grabstein, K. H., Sleath, P. R., Cheever, M. A. (1999). Generation of immunity to the HER-2/neu oncogenic protein in patients with breast and ovarian cancer using a peptide-based vaccine. *Clin. Cancer Res.* 5, 1289-1297.
- Disis, M. L., Gralow, J. R., Bernhard, H. Hand, S. L., Rubin, W. D., Cheever, M. A. (1996a). Peptide-based, but not whole protein, vaccines elicit immunity to HER-2/neu, oncogenic self-protein. *J. Immunol.* 156, 3151-3158.
- Disis, M. L., Bernhard, H., Shiota, F. M., Hand, S. L., Gralow, J. R., Huseby, E. S., Gillis, S., Cheever, M. A., (1996b). Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor: an effective adjuvant for protein and peptide-based vaccine. *Blood* 88, 202-210.
- Disis, M. L., Smith, J. W., Murphy, A. E., Chen, W., Cheever, M. A. (1994). In vitro generation of human cytolytic T-cells specific for peptides derived from the HER-2/neu protooncogene protein. *Cancer Res.* 54, 1071-1076.
- Dubská, L., Andrea, L., Sheard, M. A. (2005). HER2 signaling downregulation by Trastuzumab and suppression of the PI3K/Akt pathway: an unexpected effect on TRAIL-induced apoptosis. *FEBS Lett.* 579, 4149-4158.
- Ercolini, A. M., Ladle, B. H., Manning, E. A., Pfannenstiel, L. W., Armstrong, T. D., Machiels, J. P., Bieler, J. G., Emens, L. A., Reilly, R. T., Jaffee, E. M. (2005). Recruitment of latent pools of high-avidity CD8(+) T cells to the antitumor immune response. *J. Exp. Med.* 201, 1591-1602.

- Fawell, S., Seery, J., Daikh, Y., Moore, C., Chen, L. L., Pepinsky, B., Barsoum, J. (1994). Tat-mediated delivery of heterologous proteins into cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. 91, 664–668.
- Febbraio, M., Hajjar, D. P., and Silverstein, R. L. (2001). CD36: a class B scavenger receptor involved in angiogenesis, atherosclerosis, inflammation, and lipid metabolism. *J. Clin. Invest.* 108, 785-791.
- Foley, E. J. (1953). Antigenic properties of methylcholanthrene-induced tumors in mice of the strain of origin. *Cancer Res.* 13, 835-837.
- Foy, T. M., Fanger, G. R., Hand, S., Gerard, C., Bruck, C., Cheever, M. A. (2002). Designing HER2 vaccines. *Semin. Oncol.* 29, 53-61.
- Foy, T. M., Bannink, J., Sutherland, R. A., McNeill, P. D., Moulton, Garner, G. G., Smith, J., Cheever, M. A., Grabstein, K. (2001). Vaccination with Her-2/neu DNA or protein subunits protects against growth of a Her-2/neu-expressing murine tumor. *Vaccine* 19, 2598-2606.
- Gallo, P., Dharmapuri, S., Nuzzo, M., Maldini, D., Iezzi, M., Cavallo, F., Musini, P., Forni, G., Monaci, P. (2005). Xenogeneic immunization in mice using HER2 DNA delivered by an adenoviral vector. *Int. J. Cancer* 113, 67-77.
- Gamer, J., Multhaupt, G., Tomoyasu, T., McCarty, J. S., Rüdiger, S., Schönfeld, H. J., Schirra, C., Bujard, H., Bukau, B. (1996). A cycle of binding and release of DnaK, DnaJ and GrpE chaperones regulates activity of the Escherichia coli heat shock transcription factor sigma 32. *Embo J.*, 15, 607-617.
- Garbi, N., Hämmerling, G. J., Tanaka, S. (2007). Interaction of ERp57 and tapasin in the generation of MHC class I-peptide complexes. *Curr. Opin. Immunol.* 19, 99-105.
- Geisse, S., Gram, H., Kleuser, B., Kocher, H. P. (1996). Eukaryotic expression systems: a comparison. *Protein Expression and Purification* 8, 271-282.
- Gething, M. J. and Sambrook, J. (1992). Protein folding in the cell. *Nature* 355, 33-45.
- Glauser, M. P., Zanetti, G., Baumgartner, J. D., Cohen, J. (1991). Septic shock: pathogenesis. *Lancet* 338, 1220-1222.
- Greten, T. F. and Schneck, J. P. (2002). The development and use of multimeric MHC molecules. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 9, 216– 220.
- Greten, T. F., Korangy, F., Neumann, G., Wedemeyer, H., Schlote, K., Heller, A., Scheffer, S., Pardoll, D. M., Garbe, A. I., Schneck, J. P., Manns, M. P. (2002). Peptide-β2-microglobulin-MHC fusion molecules bind antigen-specific T cells and can be used for multivalent MHC-Ig complexes. *J. Immunol. Methods* 271, 125-135.
- Greten, T. F., Slansky, J. E., Kubota, R., Soldan, S. S., Jaffee, E. M., Leist, T. P., Pardoll, D. M., Jacobson, S., Schneck, J. P. (1998). Direct visualization of antigen-specific T cells: HTLV-1 Tax11 –19-specific CD8(+) T cells are activated in peripheral blood and accumulate in cerebrospinal fluid from HAM/TSP patients. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 7568– 7573.
- Gritzapis, A. D., Mahaira, L. G., Perez, S. A., Cacoullos, N. T., Papamichail, M., Baxevanis, C. N. (2006). Vaccination with human HER-2/neu (435-443) CTL peptide induces effective antitumor immunity against HER-2/neu-expressing tumor cells in vivo. *Cancer Res.* 66, 5452-5460.
- Gross, C., Hansch, D., Gastpar, R., Multhoff, G. (2003). Interaction of heat shock protein 70 peptide with NK cells involves the NK receptor CD94. *Biol. Chem.* 384, 267-279.
- Guermonez, P. and Amigorena, S. (2005). Pathways for antigen cross presentation. *Springer Semin. Immunopathol.* 26, 257-271.

- Guermonprez, P., Saveanu, L., Kleijmeer, M., Davoust, J., Van Endert, P. and Amigorena, S. (2003). ER-phagosome fusion defines an MHC class I cross-presentation compartment in dendritic cells. *Nature* 425, 397-402.
- Gullo, C. A. and Teoh, G. (2004). Heat shock proteins: to present or not, that is the question. *Immunol. Lett.* 94, 1-10.
- Heath, W. R. and Carbone, F. R. (1999). Cytotoxic T lymphocyte activation by cross-priming. *Curr. Opin. Immunol.* 11, 314-8.
- Homma, S., Kikuchi, T., Ishiji, N., Ochiai, K., Takeyama, H., Saotome, H., Sagawa, Y., Hara, E., Kufe, D., Ryan, J. L., Ohno, T., Toda, G. (2005). Cancer immunotherapy by fusions of dendritic and tumour cells and rh-IL-12. *Eur. J. Clin. Invest.* 35, 279-286.
- Hortobagyi, G. N. (2005). Trastuzumab in the treatment of breast cancer. *N. Engl. J. Med.* 353, 1734-1736.
- Houde, M., Bertholet, S., Gagnon, E., Brunet, S., Goyette, G., Laplante, A., Princiotta, M. F., Thibault, P., Sacks, D., Desjardins, M. (2003). Phagosomes are competent organelles for antigen cross-presentation. *Nature* 425, 402-406.
- Hsu, F. J., Benike, C., Fagnoni, F., Liles, T. M., Czerwinski, D., Taidi, B., Engleman, E. G., Levy, R. (1996). Vaccination of patients with B-cell lymphoma using autologous antigen-pulsed dendritic cells. *Nat. Med.* 2, 52-58.
- Huang, A. Y., Bruce, A. T., Pardoll, D. M., Levitsky, H. I. (1996) In vivo cross-priming of MHC class I-restricted antigens requires the TAP transporter. *Immunity* 4, 349-355.
- Huang, B., Zhao, J., Unkeless, J. C., Feng, Z. H., Xiong, H. (2008). TLR signaling by tumor and immune cells: a double-edged sword. *Oncogene* 27, 218-224.
- Inouye, M., Arnheim, N., Sternglanz, R. (1973). Bacteriophage T7 lysozyme is an N-acetylmuramyl-L-alanine amidase. *J. Biol. Chem.* 248, 7247-7252.
- Issekutz, A. C. (1983). Removal of gram-negative Endotoxin from solutions by affinity chromatography. *J. Immunol. Methods* 61, 275-281.
- Janetzki, S., Palla, D., Rosenhauer, V., Lochs, H., Lewis, J. J., Srivastava, P. K. (2000). Immunization of cancer patients with autologous tumor-derived heat shock protein gp96 preparations: a pilot study. *Int. J. Cancer* 88, 232-238.
- Janknecht, R., de Martynoff, G., Lou, J., Hipskind, R., Nordheim, A., Stunnenberg, H. G. (1991). Rapid and efficient purification of native histidine-tagged protein expressed by recombinant vaccinia virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88, 8972-8976.
- Kawarada, Y., Ganss, R., Garbi, N., Sacher, T., Arnold, B., Hämmerling, G. (2001). NK- and CD8(+) T cell-mediated eradication of established tumors by peritumoral injection of CpG-containing oligodeoxynucleotides. *J. Immunol.* 167, 5247-5253.
- Keefe, A. D., Wilson, D. S., Seelig, B., Szostak, J. W. (2001). One-step purification of recombinant proteins using a nanomolar-affinity Streptavidin-binding peptide, the SBP-Tag. *Protein Expr. Purif.* 23, 440-446.
- Kim, M., Moon, H.-B., Kim, K., Lee, K.-Y. (2006). Antigen dose governs the shaping of CTL repertoires in vitro and in vivo. *Int. Immunol.* 18, 435-444.
- Klein, J. and Sato, A. (2000). The HLA system. First of two parts. *N. Engl. J. Med.* 343, 702-709.

- Klinman, D. M. (2004). Immunotherapeutic uses of CpG oligodeoxynucleotides. *Nat. Rev. Immunol.* 4, 249-258.
- Knipppers, R. (1997). *Molekulare Genetik*. Thieme Verlag, 7. Auflage
- Knutson, K. L., Schiffman, K., Disis, M. L. (2001). Immunization with a HER-2/neu helper peptide vaccine generates HER-2/neu CD8 T-cell immunity in cancer patients. *J. Clin. Invest.* 107, 477-484.
- Komar, A. A., Lesnik, T., Reiss, C. (1999). Synonymous codon substitutions affect ribosome traffic and protein folding during in vitro translation. *FEBS Lett.* 462, 387-391.
- Kovacsovics-Bankowski, M., Clark, K., Benacerraf, B., Rock, K. L. (1993). Efficient major histocompatibility complex class I presentation of exogenous antigen upon phagocytosis by macrophages. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 4942-4946.
- Krepler, C., Wacheck, V., Strommer, S., Hartmann, G., Polterauer, P., Wolff, K., Pehamberger, H., Jansen, B. (2004). CpG oligonucleotides elicit antitumor responses in a human melanoma NOD/SCID xenotransplantation model. *J. Invest. Dermatol.* 122, 387-391.
- Krieg, A. M. (2004). Antitumor applications of stimulating toll-like receptor 9 with CpG oligodeoxynucleotides. *Curr. Oncol. Rep.* 6, 88-95.
- Kuppner, M. C., Gastpar, R., Gelwer, S., Noessner, E., Ochmann, O., Scharner, A., Issels, R. D. (2001). 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.
- Kuusinen, A., Arvola, M., Oker-Blom, C., Keinänen, K. (1995). Purification of recombinant GluR-D glutamate receptor produced in Sf21 insect cells. *Eur. J. Biochem.* 233, 720-726.
- Leclerc, C. and Ronco, J. (1998). New approaches in vaccine development. *Immunol. Today* 19, 300-302.
- Lindsay M. A. (2002). Peptide-mediated cell delivery: application in protein target validation. *Curr Opin Pharmacol.* 2, 587-594.
- Lollini, P.-L., Cavallo, F., Nanni, P., Forni, G. (2006). Vaccines for tumor prevention. *Nat. Rev. Cancer* 6, 204-216
- Mahoney, K. H., Miller, B. E., Heppner, G. H. (1985). FACS quantitation of leucine aminopeptidase and acid phosphatase on tumor associated macrophages from metastatic and nonmetastatic mouse mammary tumors. *J. Leukocyte Biol.* 38, 573
- Marincek, B. C. (2008). Dissertation: HSP-Antigen-Fusionsproteine als Tumor-Vakzinen in der Maus. Naturwissenschaftlich-Mathematische Gesamtfakultät der Universität Heidelberg
- McMurray, H. R., Nguyen, D., Westbrook, T. F., McAnce, D. J. (2001). Biology of human papillomaviruses. *Int. J. Exp. Pathol.* 82, 15-33.
- Moffat, B. A. and Studier, F. W. (1987). T7 lysozyme inhibits transcription by T7 RNA polymerase. *Cell* 49,221-227.
- Momburg, F. and Hämmerling, G. J. (1998). Generation and TAP-mediated transport of peptides for major histocompatibility complex class I molecules. *Adv. Immunol.* 68, 191-256.
- Morton, D. L., Hsueh, E. C., Essner, R., Foshag, L. J., O'Day, S. J., Bilchik, A., Gupta, R. K., Hoon, D. S., Ravindranath, M., Nizze, J. A., Gammon, G., Wanek, L. A., Wang, H. J., Elashoff, R. M. (2002). Prolonged survival of patients receiving active immunotherapy with Canvaxin

- therapeutic polyvalent vaccine after complete resection of melanoma to regional lymph nodes. *Ann. Surg.* 236, 438-448.
- Moser, M. and Murphy, K. M. (2000). Dendritic cell regulation of T_H1-T_H2 development. *Nat. Immunol.* 1, 199-205.
- Multhoff, G., Mizzen, L., Winchester, C. C., Milner, C. M., Wenk, S., Eissner, G., Kampinga, H. H., Laumbacher, B., Johnson, J. (1999). Heat shock protein 70 (Hsp70) stimulates proliferation and cytolytic activity of natural killer cells. *Exp. Hematol.* 27, 1627-1636.
- Murray, J. L., Gillogly, M. E., Przepiorka, D., Brewer, H., Ibrahim, N. K., Booser, D. J., Hortobagyi, G. N., Kudelka, A. P., Grabstein, K. H., Cheever, M. A., Ioannides, C. G. (2002). Toxicity, immunogenicity, and induction of E57-specific tumor-lytic CTLs by HER-2 peptide E75 (369-377) combined with granulocyte macrophage colony-stimulating factor in HLA-A2+ patients with metastatic breast and ovarian cancer. *Clin. Cancer Res.* 8, 3407-3418.
- Nava-Parada, P., Forni, G., Knutson, K. L., Pease, L. R., Celis, E. (2007). Peptide vaccine given with a Toll-like receptor agonist is effective for the treatment and prevention of spontaneous breast tumors. *Cancer Res.* 67, 1326-1334.
- Nagata, Y., Furugen, R., Hiasa, A., Ikeda, H., Ohta, N., Furukawa, K., Nakamura, H., Furukawa, K., Kanematsu, T., Shiku, H. (1997). Peptides derived from a wild type murine proto-oncogene c-erbB-2/HER2/neu can induce CTL and tumor suppression in syngeneic hosts. *J. Immunol.* 159, 1336-1343.
- Noessner, E., Gastpar, R., Milani, V., Brandl, A., Hutzler, P. J., Kuppner, M. C., Roos, M., Kremmer, E., Asea, A., Calderwood, S. K., Issels, R. D. (2002). Tumor-derived heat shock protein 70 peptide complexes are cross-presented by human dendritic cells. *J. Immunol.* 169, 5424-5432.
- Norbury, C. C., Princiotta, M. F., Bacik, I., Brutkiewicz, R. R., Wood, P., Elliott, T., Bennink, J. R., Yewdell, J.W. (2001). Multiple antigen-specific processing pathways for activating naive CD8⁺ T cells in vivo. *J. Immunol.* 166, 4355-4362.
- Nouri-Shizari, M., Banchereau, J., Fay, J., Palucka, K. (2000). Dendritic cell based tumor vaccines. *Immunol Lett.* 74, 5-10.
- Pamer, E. and Cresswell, P. (1998). Mechanisms of MHC class I--restricted antigen processing. *Annu. Rev. Immunol.* 16, 323-358.
- Pannellini, T., Spadaro, M., Di Carlo, E., Ambrosino, E., Iezzi, M., Amici, A., Lollini, P. L., Forni, G., Cavallo, F., Musini, P. (2006). Timely DNA vaccine combined with systemic IL-12 prevents parotid carcinomas before a dominant-negative p53 makes their growth independent of HER-2/neu expression. *J. Immunol.* 176, 7695-7703.
- Parmiani, G., Testori, A., Maio, M., Castelli, C., Rivoltini, L., Pilla, L., Belli, F., Mazzaferro, V., Coppa, J., Patuzzo, R., Sertolli, M. R., Hoos, A., Srivastava, P. K., Santinami, M. (2004). *Clinical Cancer Research* 10, 8142-8146.
- Pascolo, S., Bervas, N., Ure, J. M., Smith, A. G., Lemonnier, F. A., Pérarnau, B. (1997). HLA-A2.1-restricted education and cytolytic activity of CD8(+) T lymphocytes from beta2 microglobulin (beta2m) HLA-A2.1 monochain transgenic H-2Db beta2m double knockout mice. *J. Exp. Med.* 185, 2043-2051.
- Piechocki, M. P., Pilon, S. A., Wei, W. Z. (2001). Complementary antitumor immunity induced by plasmid DNA encoding secreted and cytoplasmic human ErbB-2. *J. Immunol.* 167, 3367-3374.
- Pooley, J. H., Heath, W. R., Shortman, K. (2001). Cutting edge: intravenous soluble antigen is presented to CD4 T cells by CD8⁻ dendritic cells, but cross-presented to CD8 T cells by CD8⁺ dendritic cells. *J. Immunol.* 166, 5327-5330.

- Porath, J., Carlsson, J., Olsson, I., Belfrage, G. (1975). Metal chelate affinity chromatography, a new approach to protein fractionation. *Nature* 258, 598-599.
- Prehn, R. T. and Main, J. M. (1957). Immunity to methylcholanthrene-induced sarcomas. *J. Natl. Cancer Inst.* 18, 769-778.
- Radsak, M. P., Hilf, N., Singh-Jasuja, H., Braedel, S., Brossart, P., Rammensee, H. G., Schild, H. (2003). The heat shock protein Gp96 binds to human neutrophils and monocytes and stimulates effector functions. *Blood*, 101, 2810-2815.
- Reed, R. C., Berwin, B., Baker, J. P., Nicchitta, C. V. (2003). GRP94/gp96 elicits ERK activation in murine macrophages. A role for endotoxin contamination in NF-kappa B activation and nitric oxide production. *J. Biol. Chem.* 278, 31853-31860.
- Richard, J. P., Melikov, K., Brooks, H., Prevot, P., Lebleu, B., Chernomordik, L. V. (2005). Cellular uptake of unconjugated TAT peptide involves clathrin-dependent endocytosis and heparan sulfate receptors. *J Biol Chem* 280, 15300-15306.
- Richards, J., Testori, A., Whitman, E., Mann, G. B., Lutzky, J., Camacho, L., Parmiani, G., Hoos, A., Gupta, R., Srivastava, P. (2006). Autologous tumor-derived HSPPC-96 vs. physician's choice (PC) in a randomized phase III trial in stage IV melanoma. *J. Clin. Oncol.* 24, 8002
- Rinne, J., Albarran, B., Jylhävä, J., Ihalainen, T. O., Kankaanpää, P., Hytönen, V. P., Stayton, P. S., Kulomaa, M. S., Vihinen-Ranta, M. (2007). Internalization of novel non-viral vector TAT-streptavidin into human cells. *BMC Biotechnol.* 7, 1-14.
- Rivoltini, L., Castelli, C., Carrabba, M., Mazzaferro, V., Pilla, L., Huber, V., Coppa, J., Galino, G., Scheibenbogen, C., Squarcina, P., Cova, A., Camerini, R., Lewis, J. J., Srivastava, P. K., Parmiani, G. (2003). Human tumor-derived heat shock protein 96 mediates in vitro activation and in vivo expansion of melanoma- and colon carcinoma-specific T cells. *J. Immunol.* 171, 3467-3474.
- Ruedl, C., Storni, T., Lechner, F., Bachi, T., Bachmann, M. F. (2002). Cross-presentation of virus-like particles by skin-derived CD8(-) dendritic cells: a dispensable role for TAP. *Eur. J. Immunol.* 32, 818-825.
- Sandgren, S., Cheng, F., Belting, M. (2002). Nuclear targeting of macromolecular polyanions by an HIV-Tat derived peptide. Role for cell-surface proteoglycans. *J Biol Chem.* 277, 38877-38883.
- Sato, K., Torimoto, Y., Tamura, Y., Shindo, M., Shinzaki, H., Hirai, K., Kohgo, Y. (2001). Immunotherapy using heat-shock protein preparations of leukemia cells after syngeneic bone marrow transplantation in mice. *Blood* 98, 1852-1857.
- Scardino, A., Alves, P., Gross, D. A., Tourdot, S., Graff-Dubois, S., Angevin, E., Firat, H., Chouaib, S., Lemonnier, F., Nadler, L. M., Cardoso, A. A., Kosmatomoulos, K. (2001). Identification of HER-2/neu immunogenic epitopes presented by renal cell carcinoma and other human epithelial tumors. *Eur. J. Immunol.* 31, 3261-3270.
- Scheeren, R. A., Koopman, G., Van der Baan, S., Meijer, C. J., Pals, S. T. (1991). Adhesion receptors involved in clustering of blood dendritic cells and T lymphocytes. *Eur. J. Immunol.* 21, 1101-1105.
- Schild, H. and Rammensee, H. G. (2000). gp96--the immune system's Swiss army knife. *Nat. Immunol.* 1, 100-101.
- Schneck, J. P., Slansky, J., O'Herrin, S., Greten, T. F. (1999). Use of MHC-Ig dimers for visualizing antigen specific T cells. *Current Protocol in Immunology* Wiley, New York, p. 17.3.

- Singh-Jasuja, H., Hilf, N., Arnold-Schild, D., Schild, H. (2001). The role of heat shock proteins and their receptors in the activation of the immune system. *Biol. Chem.* 382, 629-636.
- Spadaro, M., Ambrosino, E., Iezzi, M., Di Carlo, E., Sacchetti, P., Curcio, C., Amici, A., Wei, W. Z., Musini, P., Lollini, P. L., Cavallo, F., Forni, G. (2005). Cure of mammary carcinomas in Her-2 transgenic mice through sequential stimulation of innate (neoadjuvant interleukin-12) and adaptive (DNA vaccine electroporation immunity). *Clin. Cancer Res.* 11, 1941-1952.
- Spiridon, C. I., Ghetta, M. A., Uhr, J., Marches, R., Li, J. L., Shen, G. L., Vitetta, E. S. (2002). Targeting multiple Her-2 epitopes with monoclonal antibodies results in improved antigrowth activity of a human breast cancer cell line in vitro and in vivo. *Clin. Cancer Res.* 8, 1720-1730.
- Srivastava, P. K. (2002). Interaction of heat shock protein with peptides and antigen presenting cells: chaperoning of the innate and adaptive immune responses. *Annu. Rev. Immunol.* 20, 395-425.
- Srivastava, P. K. and Das, M. R. (1984). The serologically unique cell surface antigen of Zajdela ascitic hepatoma is also its tumor-associated transplantation antigen. *Int. J. Cancer* 33, 417-422.
- Srivastava, P. K., Udono, H., Blachere, N. E., Li, Z. (1994). Heat shock proteins transfer peptides during antigen processing and CTL priming. *Immunogenetics* 39, 93-98.
- Stevenson, F., Ottensmeier, C. H., Johnson, P., Zhu, D., Buchan, S. L., McCann, K. J., Roddick, J. S., King, A. T., McNicholl, F., Savelyeva, N., Rice, J. (2004). DNA vaccines to attack cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101 Suppl. 2, 14646-14652.
- Strbo, N., Yamazaki, K., Lee, K., Rukavina, D., Podack, E. R. (2002). Heat shock fusion protein gp96-Ig mediates strong CD8 CTL expansion in vivo. *Am. J. Reprod. Immunol.* 48, 220-225.
- Suto, R. and Srivastava, P. K. (1995). A mechanism for the specific immunogenicity of heat shock protein-chaperoned peptides. *Science* 269, 1585-1588.
- Takeda, K. and Akira, S. (2005). Toll-like receptors in innate immunity. *Int. Immunol.* 17, 1-14.
- Takeda, K., Kaisho, T., Akira, S. (2003). Toll-like receptors. *Annu. Rev. Immunol.* 21, 335-376.
- Tamura, Y., Peng, P., Liu, K., Daou, M., Srivastava, P. K. (1997). Immunotherapy of tumor with autologous tumor-derived heat shock protein preparations. *Science* 278, 117-120.
- Tan, P., Kropshofer, H., Mandelboim, O., Bulbuc, N., Hämmerling, G. J., Momburg, F. (2002). Recruitment of MHC class I molecules by tapasin into the transporter associated with antigen processing-associated complex is essential for optimal peptide loading. *J. Immunol.* 168, 1950-1960.
- Terpe, K. (2003). Overview of tag protein fusions: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 60, 523-533.
- Tobian, A. A. R., Canaday, D. H., Boom, W. H., Harding, C. V. (2004). Bacterial heat shock proteins promote CD91-dependent class I MHC cross-presentation of chaperoned peptide to CD8+ T cells by cytosolic mechanisms in dendritic cells versus vacuolar mechanisms in macrophages. *J. Immunol.* 172, 5277-5286.
- Tonegawa, S. (1983). Somatic generation of antibody diversity. *Nature* 302, 575-581.
- Udono, H. and Srivastava, P. K. (1993). Heat shock protein 70-associated peptides elicit specific cancer immunity. *J. Exp. Med.* 178, 1391-1396.

- Udono, H., Yamano, T., Kawabata, Y., Ueda, M., Yui, K. (2001). Generation of cytotoxic T lymphocytes by MHC class I ligands fused to heat shock cognate protein 70. *Int. Immunol.* 13, 1233-1243.
- Udono, H., Levey, D. L., Srivastava, P. K. (1994). Cellular requirements for tumorspecific immunity elicited by heat shock proteins: tumor rejection antigen gp96 primes CD8⁺ T cells in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91, 3077-3081.
- Urban, R. G., Chiczy, R. M., Vignali, D. A. and Strominger, J. L. (1993). The dichotomy of peptide presentation by class I and class II MHC proteins. *Chem. Immunol.* 57, 197-234.
- Vabulas, R. M., Ahmad-Nejad, P., Ghose, S., Kirsching, C. J., Issels, R. D., Wagner, H. (2002). HSP70 as endogenous stimulus of the Toll/interleukin-1 receptor signal pathway. *J. Biol. Chem.* 277, 15107-15112.
- Vertuani, S., Sette, A., Sidney, J., Southwood, S., Fikes, J. Keogh, E., Lindencrona, J. A., Ishioka, G., Levitskaya, J., Kiessling, R. (2004). Improved immunogenicity of an immunodominant epitope of the Her-2/neu protooncogene by alterations of MHC contact residues. *J. Immunol.* 72, 3501-3508.
- Vogt, A. B., Kropshofer, H. and Hämmerling, G. J. (1997). How HLA-DM affects the peptide repertoire bound to HLA-DR molecules. *Hum. Immunol.* 54, 170-9.
- Vremec, D., Pooley, J., Hochrein, H., Wu, L., Shortman, K. (2000). CD4 and CD8 expression by dendritic cell subtypes in mouse thymus and spleen. *J. Immunol.* 164, 2978-2986.
- Wadia, J. S., Stan, R. V., Dowdy, S. F. (2004). Transducible TAT-HA fusogenic peptide enhances escape of TAT-fusion proteins after lipid raft macropinocytosis. *Nat. Med.* 10, 310-315.
- Wallin, R. P., Lundqvist, A., More, S. H., von Bonin, A., Kiessling, R., Ljunggren, H. G. (2002). Heat-shock proteins as activators of the innate immune system. *Trends Immunol.* 23, 130-135.
- Wan, T., Zhou, X., An, H., Chen, T., Zhang, W., Liu, S., Jiang, Y., Yang, F., Wu, Y., Cao, X. (2004). Novel heat shock protein Hsp70L1 activates dendritic cells and acts as a Th1 polarizing adjuvant. *Blood* 103, 1747-1754.
- Wang, L., Miyahara, Y., Kato, T., Wang, L., Aota, T., Kuribayashi, K., Shiku, H. (2003). Essential roles of tumor-derived helper T cell epitopes for an effective peptide-based tumor vaccine. *Cancer Immun.* 3, 16.
- Warger, T., Hilf, N., Rechtsteiner, G., Haselmayer, P., Carrick, D. M., Jonuleit, H., von Landenberg, P., Rammensee, H. G., Nicchitta, C. V., Radsak, M. P., Schild, H. (2006). Interaction of TLR2 and TLR4 ligands with the N-terminal domain of Gp96 amplifies innate and adaptive immune responses. *J. Biol. Chem.* 281, 22545-22553.
- Wei, W. Z., Shi, W. P., Galy, A., Lichlyter, D., Hernandez, S., Groner, B., Heilbrun, L., Jones, F. L. (1999). Protection against mammary tumor growth by vaccination with full length, modified human ErbB-2 DNA. *Int. J. Cancer* 81, 748-754.
- Wei Y. Q. (2002). Immunotherapy of tumors with vaccines based on xenogeneic homologous molecules. *Anticancer Drugs* 13, 229-235.
- Wingender, G., Garbi, N., Schumak, B., Jüngerkes, F., Endl, E., von Bubnoff, D., Steitz, J., Striegler, J., Moldenhauer, G., Tüting, T., Heit, A., Huster, K. M., Takikawa, O., Akira, S., Busch, D. H., Wagner, H., Hämmerling, G. J., Knolle, P. A., Limmer, A. (2006). Systemic application of CpG-rich DNA suppresses adaptive T cell immunity via induction of IDO. *Eur. J. Immunol.* 36, 12-20.

- Wu, Y., Wan, T., Zhou, X., Wang, B., Yang, F., Li, N., Chen, G., Dai, S., Liu, S., Zhang, M., Cao, X. (2005). Hsp70-like protein 1 fusion protein enhances induction of carcinoembryonic antigen-specific CD8⁺ CTL response by dendritic cell vaccine. *Cancer Res.* 65, 4947-4954.
- Zaks, T. Z. and Rosenberg, S. A. (1998). Immunization with a peptide epitope (p369-377) from HER-2/neu leads to peptide-specific cytotoxic T lymphocytes that fail to recognize HER-2/neu⁺ tumors. *Cancer Res.* 58, 4902-4908.
- Zheng, H., Dai, J., Stoilova, D., Li, Z. (2001). Cell surface targeting of heat shock protein gp96 induces dendritic cell maturation and antitumor immunity. *J. Immunol.* 167, 6731-6735.

9 Anhang

Im Folgenden sind die Sequenzen der Proteine aufgelistet, die in den Mausmodellen BALB/c bzw. HHD zum Einsatz kamen. Auf die Auflistung der Fusionsproteine mit N-terminalem Hexa-Histidin-Tag wurde verzichtet, da hier nur geringe Reinheiten erzielt wurden und diese Proteine daher nicht einsetzbar waren. Die CD8⁺ bzw. CD4⁺ T-Zellepitope in den HER2/neu-Sequenzen sind durch Fettdruck hervorgehoben.

9.1 Unfusionierte Hitzeschockproteine

T7-mHsp70-SBP-His (77.9 kDa); Klon 3554.2

MASMTGGQQMGRISSRM₁AKNTAIGIDLGTTYSYCVGVFQHGKVEIANDQGNRTTPSYVAFTDTERLIGDAAKNQ
VALNPQNTVFDKRLIGRKFDAVVQSDMKHWPVQVNDGDKPKVQVNYKGESRSFFPEEISSMVLTKMKEIAEA
YLGHPVTNAVITVPAYFNDSQRQATKDAGVIAGLNLVRIINEPTAAAIAAYGLDRTGKGERNVLIFDLGGGTFDVSIL
TIDDGIFEVKATAGDTHLGGEDFDNRLVSHFVEEFKRKHKKDISQNKRAVRRRLTACERAKRTLSSSTQASLEIDSL
FEGIDFYTSITRARFEELCSDLFRGTLEPVEKALRDAKMDKAQIHDLVLVGGSTRIPKVQKLLQDFFNGRDLNKSIN
PDEAVAYGAAVQAAAILMGDKSENVQDLLLLDVAPLSLGLIETAGGVMTALIKRNSTIPTKQTQTFTTYSNQPGLI
QVYEGERAMTRDNNLLGRFELSGIPPAPRGVQIEVTFDIDANGILNVTATDKTTGKANKITITNDKGRLSKEEIER
MVQEAERYKAEDVQRDRVAAKNALESYAFNMKSAVEDEGLKGLSEADKKKVLKCCQEVISWLDSENTLADKEEF
VHKREELERVCSPIISGLYQAGAPGAGGFGAQAPKASGSGPTIEVD₆₄₁GTMEFGSDDDDKTTGWRGGHVVE
GLAGELEQLRARLEHHPQGQREPVEHHHHHH

T7-mHsc70-SBP-His (78.7 kDa); Klon 3355.1

MASMTGGQQMGRISSRM₁SKGPAVGIDLGTTYSYCVGVFQHGKVEIANDQGNRTTPSYVAFTDTERLIGDAAKNQ
VAMNPTNTVFDKRLIGRRFDDAVVQSDMKHWPVQVNDAGRPKVQVEYKGETKSFYPEEVSSMVLTKMKEIAE
AYLGKVTNAVITVPAYFNDSQRQATKDAGTIAGLNLVRIINEPTAAAIAAYGLDKKVGAERNVLIFDLGGGTFDVSIL
LTIEDGIFEVKSTAGDTHLGGEDFDNRMVNHFAIEFKRKHKKDISENKRAVRRRLTACERAKRTLSSSTQASIEIDS
LYEGIDFYTSITRARFEELNADLFRGTLDPVEKALRDAKLDKSQIHDIVLVGGSTRIPKIQKLLQDFFNGKELNKSINP
DEAVAYGAAVQAAIISGDKSENVQDLLLLDVTPSLGLIETAGGVMTVLIKRNTTIPKQTQTFTTYSNQPGLIQV
YEGERAMTKDNNLLGKFEELTGIPPAPRGVQIEVTFDIDANGILNVSVDKSTGKENKITITNDKGRLSKEDIERMV
QEAKEYKAEDKQRDKVSSKNSLESYAFNMKATVEDEKLQGKINDEKQKILDKCNIEISWLDKNQTAEEKEEFEHQ
QKELERVCPNITTKLYQSAGGMPGGMPGGFPGGGAPPSSGASSGPTIEVD₆₄₆GTMEFGSDDDDKTTGWRGGHV
VEGLAGELEQLRARLEHHPQGQREPVEHHHHHH

T7-mHsp70L1-SBP-His (62.3 kDa); Klon 3348.1

MASMTGGQQMGRISSRM₁AAIGVHLGCTSACVAVYKDGRADWANDAGDRVTPAIVAYSEREQVVGAAKQSRIR
RHVSSTVVKVQILGRSSADPQAQKYISESKCLVIEKNGKLRYEIDTGEETKLVNPEDEVARLIFSKMKETAHSVLS
DANDVVVTPFDGFEKQKQKALGAAAGAFNVLRIHEPSAALLAYGIGQDHPTGKSNVLFKLGGSLSLSVMEV
NSGMRYVLSNTSDNIGGAHFTDTLARYLASEFQRLFKHDVDRGNARAMMMLMNSAEVAKHSLSTLGSANCFVDSL
YEQDFDCNVSRRARFELLCSPLFNKCTEAIRELLRQTGFTADDINKVVLGSSSRIPKLQQLIKDLFPAVDLLNSIPP
DEVIPIGAAIEAGILVGKESTSGDSSVMIECSAKDILVKGVDGADRFTVLPFSGTLPARRQHTLQAPGRVSSVCL
ELYESEGKNSAKEEAKFAQVVLQDLDDKKNGLRDILAVLTMKRDGSLQVTCTDQDTGKCEAITVEVA₅₀₇GTMEFGS
DDDDKTTGWRGGHVVEGLAGELEQLRARLEHHPQGQREPVEHHHHHH

T7-m.tub.Hsp70-SBP-His (33.0 kDa); Klon 3347.1

MASMTGGQQMGRISSRM₃₅₈EVKDVLLLDVTPSLGLIETKGGVMTRLIERNTTIPKRSFTTADDNQPSVQIQVY
QGEREIAAHNKLGSFELTGIPPAPRGIPQIEVTFDIDANGIVHVTAKDKGTGKENTIRIQEGSGLSKEDIDRMKIDA
EAHAEDRKRREEADVNRQAETLVYQTEKFVKEQREAEGGSKVPEDTLNKVDAVAEAKAALGGSDISAISAMEK

LGQESQALGQAIYEEAAQAASQATGAAHPGGEPGGAHPGSAD₆₁₀SMEFGSDDDDKTTGWRGGHVVEGLAGELEQLRARLEHHPQGQREPVEHHHHHH

9.2 Hsp-HER2/neu₂₉₉₋₅₇₉-Fusionsproteine mit HLA-A2-Epitopen für das

HHD-System

T7-HER2/neu₂₉₉₋₅₇₉-SBP-His (39.2 kDa); Klon 3363.3

MASMTGGQQMGRISSRGTMEFC₂₉₉PYNYLSTDVGSCTLVCPHNEVTAEDGTQRCEKCSKPCARVCYGLGMEHLREVRVTSANIQEFAGCK**KIFGSLAFL**PESFDGDPASNTAPLQPEQLQVFETLEEITGYLYISAWPDSLPLDSVFNLQVIRGR**ILHNGAYSL**TLQGLGISWLGLRSLRELGSGLALIHNNHNLHLCFVHTVPWDQLFRNPHQALLHTANRPEDECVGEGLACHQLCARGHCWGPPTQCVNCSQFLRGQECVEECRVLQGLPREYVNRHCLPCHPECQPQNGSVTCFGP₅₇₉EFGSDDDDKTTGWRGGHVVEGLAGELEQLRARLEHHPQGQREPVEHHHHHH

T7-mHsp70-HER2/neu₂₉₉₋₅₇₉-SBP-His (110.0 kDa); Klon 3831.5

MASMTGGQQMGRISSRM₁AKNTAIGIDLGTYSYCVGVFQHGKVEIANDQGNRTTPSYVAFTDTERLIGDAAKNQVALNPQNTVFDKRLIGRKFDAVQSDMKHWPFPVNDGDKPKVQVNYKGESRSFFPEEISSMVLTKMKEIAEAYLGHVPTNAVITVPAYFNDSQRQATKDAGVIAGLNLRIINEPTAAAIAYGLDRTGKGERNVLIFDLGGGTFDVSILTIDDGIFEVKATAGDTHLGGEDFDNRLVSHFVEEFKRKHKKDISQNKRAVRRRTACERAKRTLSSSTQASLEIDSLFEGIDFYTSITRARFEELCSDLFRGTLEPVEKALRDAKMDKAQIHDIVLVGGSTRIPKIQKLLQDFFNGRDLNKSINPDEAVAYGAAVQAAAILMGDKSENVQDLLLLDVAPLSLGIETAGGVM TALIKRNSTIPTKQTQTFTTYSDNQPGVLIQVYEGERAMTRDNNLLGRFELSGIPPAPRGVQPQIEVTFDIDANGILNVTATDKTTGKANKITITNDKGRLSKEEIERMVQEAERYKAEDEVQRDRVAAKNALESYAFNMKSAVEDEGLKGLSEADKKKVLKCCQEVISWLDSENTLADKEEFVHKREELERVCSPIISGLYQAGAPGAGGFGAQAPKGASGSGPTIEEVD₆₄₁GTMEFC₂₉₉PYNYLSTDVGSCTLVCPHNEVTAEDGTQRCEKCSKPCARVCYGLGMEHLREVRVTSANIQEFAGCK**KIFGSLAFL**PESFDGDPASNTAPLQPEQLQVFETLEEITGYLYISAWPDSLPLDSVFNLQVIRGR**ILHNGAYSL**TLQGLGISWLGLRSLRELGSGLALIHNNHNLHLCFVHTVPWDQLFRNPHQALLHTANRPEDECVGEGLACHQLCARGHCWGPPTQCVNCSQFLRGQECVEECRVLQGLPREYVNRHCLPCHPECQPQNGSVTCFGP₅₇₉EFGSDDDDKTTGWRGGHVVEGLAGELEQLRARLEHHPQGQREPVEHHHHHH

T7-mHsc70-HER2/neu₂₉₉₋₅₇₉-SBP-His (111.7 kDa); Klon 3832.5

MASMTGGQQMGRISSRM₁SKGPAVGIDLGTYSYCVGVFQHGKVEIANDQGNRTTPSYVAFTDTERLIGDAAKNQVAMNPTNTVFDKRLIGRRFDDAVQSDMKHWPFPVNDAGRPKVQVEYKGETKSFYPEEVSSMVLTKMKEIAEAYLGKVTNAVITVPAYFNDSQRQATKDAGTIAGLNLRIINEPTAAAIAYGLDKKVAERNVLIIFDLGGGTFDVSILTIEDGIFEVKSTAGDTHLGGEDFDNRMVNHFAEFKRKHKKDISENKRAVRRRTACERAKRTLSSSTQASIEIDS LYEGIDFYTSITRARFEELNADLFRGTLDPEKALRDAKLDKSQIHDIVLVGGSTRIPKIQKLLQDFFNGKELNKSINPDEAVAYGAAVQAAAILSGDKSENVQDLLLLDVTPLSLGIETAGGVM TVLIKRNNTIPTKQTQTFTTYSDNQPGVLIQVYEGERAMTKDNNLLGKFEELTGIAPPAPRGVQPQIEVTFDIDANGILNVSVDKSTGKENKITITNDKGRLSKEDIEMVQEAERYKAEDEKQRDKVSSKNSLESYAFNMKATVEDEKLGKINDEDKQKILDKCNEIISWLDKNQTAEKEEFEHQQKELERVNPIITKLYQSAGGMPGGMPGGFPGGAPPSSGASSGPTIEEVD₆₄₆GTMEFC₂₉₉PYNYLSTDVGSCTLVCPHNEVTAEDGTQRCEKCSKPCARVCYGLGMEHLREVRVTSANIQEFAGCK**KIFGSLAFL**PESFDGDPASNTAPLQPEQLQVFETLEEITGYLYISAWPDSLPLDSVFNLQVIRGR**ILHNGAYSL**TLQGLGISWLGLRSLRELGSGLALIHNNHNLHLCFVHTVPWDQLFRNPHQALLHTANRPEDECVGEGLACHQLCARGHCWGPPTQCVNCSQFLRGQECVEECRVLQGLPREYVNRHCLPCHPECQPQNGSVTCFGP₅₇₉EFGSDDDDKTTGWRGGHVVEGLAGELEQLRAREHHPQGQREPVEHHHHHH

T7-mHsp70L1-HER2/neu₂₉₉₋₅₇₉-SBP-His (95.4 kDa); Klon 3833.11

MASMTGGQQMGRISSRM₁AAIGVHLGCTSAACVAVYKDGRADWANDAGRVTVAIVAYSEREQVWGLAAKQSRIRHVSSTVVKVKQILGRSSADPQAQKYISESKCLVIEKNGKLRYEIDTGEETKLVNPEDEVARLIFSKMKETAHSVLSGDANDVWVTPDFDGEKQKSALGAAAGAAGFNVRLRIHEPSAALLAYGIGQDHPGKSNVLFKLGSTLSLSVMEVNSGMYRVLSTNTSDNIGGAHFTDTLARYLASEFQRLFKHDVGRNARAMMKLMNSAEVAKHSLSTLGSANCFVDSL

YEQDFDCNVSRRARFELLCSPLFNKCTEAIRELLRQTGFTADDINKVWLGGSSRIPKLQQLIKDLFPAVDLLNSIPP
 DEVIPIGAAIEAGILVGKESTSGDDSVMIIECSAKDILVKGVDSESGADRFTVLFPSGTPLPARRQHTLQAPGRVSSVCL
 ELYESEGKNSAKEEAKFAQVVLQDLDDKENGRLDILAVLTMKRDGSLQVTCTDQDTGKCEAITVEVA₅₀₇GTMEFC₂₉
9PYNYLSTDVGSCTLVCPHNPQEVTAEDGTQRCEKCSKPCARVCYGLGMEHLREVRVTSANIQEFAGCKKIFGSL
AFLPESFDGDPASNTAPLQPEQLQVFETLEEITGYLYISAWPDSLPLDSVFQNLQVIRGRILHNGAYSLTLQGLGI
 SWLGLRSLRELGSGLALIHNTLHLCFVHTVTPWDQLFRNPHQALLHTANRPEDECVGEGLACHQLCARGHCWGP
 PTQCVNCSQFLRGQECVEECRVLQGLPREYVNRHCLPCHPECQPQNGSVTCFGP₅₇₉EFGSDDDDKTTGWRGGH
VVEGLAGELEQLRARLEHHPQGQREPVEHHHHHH

T7-*m.tub.Hsp70-HER2/neu*₂₉₉₋₅₇₉-SBP-His (66.1 kDa); Klon 3443.2

MASMTGGQQMGRISSRM₃₅₈EVKDVLLLDVTPLSLGIETKGGVMTRLIERNTTIPTKRSETFTTADDNQPSVQIQVY
 QGEREIAAHNKLLGSFELTGIPPAPRGIPQIEVTFDIDANGIVHVTAKDKGTGKENTIRIQEGSGLSKEDIDRMKDA
 EAHAEEDRKRREEADVNRQAETLVYQTEKFVKEQREAEAGGSKVPEDTLNKVDAVAEAKAALGGSDISAIKSAMEK
 LGQESQALGQAIYEAQAASQATGAAHPGGEPGGAHPGSAD₆₁₀SMEFC₂₉₉PYNYLSTDVGSCTLVCPHNPQEVTA
EDGTQRCEKCSKPCARVCYGLGMEHLREVRVTSANIQEFAGCKKIFGSLAFLPESFDGDPASNTAPLQPEQLQV
FETLEEITGYLYISAWPDSLPLDSVFQNLQVIRGRILHNGAYSLTLQGLISWLGLRSLRELGSGLALIHNTLHLCF
 VHTVTPWDQLFRNPHQALLHTANRPEDECVGEGLACHQLCARGHCWGPPTQCVNCSQFLRGQECVEECRVLQ
 LPREYVNRHCLPCHPECQPQNGSVTCFGP₅₇₉EFGSDDDDKTTGWRGGHVVEGLAGELEQLRARLEHHPQGQRE
PVEHHHHHH

9.3 Hsp-HER2/neu-Fusionsproteine mit K^d-Epitopen für das BALB/c-System

9.3.1 Hsp-HER2/neu(Tandemepitop)_{TE}-Fusionsproteine

T7-mHsp70-HER2/neu_{TE}-SBP-His (79.9 kDa); Klon 4227.1

MASMTGGQQMGRISSRM₁AKNTAIGIDLGTTYSCVGVFQHGKVEIANDQGNRTTPSYVAFTDTERLIGDAAKNQ
 VALNPQNTVFDKRLIGRKFQDAVVQSDMKHWPFQVNDGDKPKVQVNYKGESRFFPEEISSMVLTMKKEIAEA
 YLGHVPTNAVITVPAYFNDSQRQATKDAGVIAGLNLRIINEPTAAAIAYGLDRTGKGERNVLIFDLGGGTFDVSIL
 TIDDGIFEVKATAGDTHLGGEDFDNRLVSHFVEEFKRKHKKDISQNKRAVRRRLTACERAKRTLSSSTQASLEIDL
 FEGIDFYTSITRARFEELCSDLFRGTLEPVEKALRDAKMDKAQIHDVLVGGSTRIPKVQKLLQDFFNGRDNLKNSIN
 PDEAVAYGAAVQAAILMGDKSENVQDLLLLDVAPLSLGLLETAGGVMTALIKRNSTIPTKQTQFTTYSNQPGLVI
 QVYGERAMTRDNNLLGRFELSGIPPAPRGVQIEVTFDIDANGILNVTATDKTTGKANKITITNDKGRLSKEEIER
 MVQEAEERYKAEDVQRDRVAAKNALESYAFNMKSAVEDEGLKGLSEADKKKVLDKCQEVISWLDSENTLADKEEF
 VHKREELERVCSPIISGLYQAGAPGAGGFGAQAPKGASGSGPTIEEVD₆₄₁GTMEFLT₆₃YLPTNASLQLP₇₈₀YVS
RLLGIGSSDDDDKTTGWRGGHVVEGLAGELEQLRARLEHHPQGQREPVEHHHHHH

T7-mHsc70-HER2/neu_{TE}-SBP-His (80.7 kDa); Klon 4228.1

MASMTGGQQMGRISSRM₁SKGPAVGIDLGTTYSCVGVFQHGKVEIANDQGNRTTPSYVAFTDTERLIGDAAKNQ
 VAMNPTNTVFDKRLIGRRFDDAVVQSDMKHWPFMVVNDAGRPKVQVEYKGETKSFYPEEVSSMVLTMKKEIAEA
 AYLGKVTNAVITVPAYFNDSQRQATKDAGTIAGLNLRIINEPTAAAIAYGLDKKVGAEARNVLIQDGGGTFDVSIL
 LTIEDGIFEVKSTAGDTHLGGEDFDNRMVNHFIAEFKRKHKKDISENKRAVRRRLTACERAKRTLSSSTQASIEIDS
 LYEGIDFYTSITRARFEELNADLFRGTLDPVEKALRDAKLDKSIHDIVLVGGSTRIPKIQKLLQDFFNGKELNKSINP
 DEAVAYGAAVQAAILSGDKSENVQDLLLLDVTPLSLGIETAGGVMTVLIKRNTTIPTKQTQFTTYSNQPGLVIQV
 YGERAMTKDNNLLGKFEELTGIPPAPRGVQIEVTFDIDANGILNVSVDKSTGKENKITITNDKGRLSKEDIERMV
 QEAKEYKAEDKQRDKVSSKNSLESYAFNMKATVEDEKLQKINDEDKQKILDKCNEIISWLDKNQTAEKEEFEHQ
 QKELERVNPIITKLYQSAGGMPGGMPGGFPGGGAPPSSGASSGPTIEEVD₆₄₆GTMEFLT₆₃YLPTNASLQLP₇₈₀Y
VSRLGIGSSDDDDKTTGWRGGHVVEGLAGELEQLRARLEHHPQGQREPVEHHHHHH

T7-mHsp70L1-HER2/neu_{TE}-SBP-His (64.3 kDa); Klon 4231.1

MASMTGGQQMGRISSRM₁AAIGVHLGCTSACVAVYKDGRADWANDAGDRVTPAIVAYSEREQVWGLAAKQSRIRHVSSTVVKVQILGRSSADPQAQKYISESKCLVIEKNGKLRYEIDTGEETKLVNPEVARLIFSKMKETAHSLVLSGSDANDVWVTPFDGFEKQKSALGEEAAGFNVLRILHEPSAALLAYGIGQDHPTGKSNLVFKLGGTSLSLVMEVNSGMYRVLSTNTSDNIGGAHFTDLARYLASEFQRLFKHDVGRNARAMMKLMNSAEVAKHSLSTLGSANCFVDSL YEGQDFDCNVSRRARFELLCSPLFNKCTEAIRELLRQTGFTADDINKVVLGSSSRIPKLQQLIKDLFPAVDLLNSIPP DEVIPIGAAIEAGILVGKESTSGDDSVMIIECSAKDILVKGVDSESGADRFTVLFPSGTPLPARRQHTLQAPGRVSSVCL ELYESEGNKSAKEEAKFAQVVLQDLDDKENGRLDILAVLTMKRDGSLQVTCTDQDTGKCEAITVEVA₅₀₇MEFL₆₃**Y**
LPTNASLQLP₇₈₀YVSRLGIGSDDDDKTTGWRGGHVVEGLAGELEQLRARLEHHPQGQREPVEHHHHHH

T7-m.tub.Hsp70(ct)-HER2/neu_{TE}-SBP-His (35.0 kDa); Klon 4230.1

MASMTGGQQMGRISSRM₃₅₈EVKDVLLLDVTPSLGIETKGGVMTRLIERNTTIPTKRSETFTTADDNQPSVQIQVY QGEREIAAHNKLGSFELTGIPPAPRGIPQIEVTFDIDANGIVHVTAKDCKGTGKENTIRIQEGSGLSKEDIDRMKDA EAHAEEDRKRREEADVNRQAETLVYQTEKFVKEQREAEGGSKVPEDTLNKVDAVAEAKAALGSDISAISAMEK LGQESQALGQAIYEAQAASQATGAAHPGGEPGGAHPGSAD₆₁₀SMEFL₆₃**Y****LPTNASLQLP₇₈₀YVSRLGI**GS DDDDKTTGWRGGHVVEGLAGELEQLRARLEHHPQGQREPVEHHHHHH

9.3.2 Hsp-HER2/neu_{1/26-136}-Fusionsproteine**HER2/neu₁₋₁₃₆-SBP-His** (20.8 kDa); Klon 4580.3

M₁ELAA**LCRWGLLLALLPPGAASTQCVC****GTDM**KLRLPASPETHLDMLRHLYQGCQVQGNLEL**TYLPTNASL**
SLSFLQDIQEVQGYVLIAHNQVRQVPLQRLRIVRGTQLFEDNYALAVLDNGDPLNNTTPVTGASPGG₁₃₆MEFGSD
 DDDDKTTGWRGGHVVEGLAGELEQLRARLEHHPQGQREPVEHHHHHH

T7-HER2/neu₂₆₋₁₃₆-SBP-His (20.5 kDa); Klon 4500.7

MASMTGGQQMGRISSRGSAAAGTM_{C26}TGTD**MKLRLPASPETHLDMLRHLYQGCQVQGNLELTYLPTNASL****SFL**
QDIQEVQGYVLIAHNQVRQVPLQRLRIVRGTQLFEDNYALAVLDNGDPLNNTTPVTGASPGG₁₃₆MEFGSDDDDKT
 TGWRGGHVVEGLAGELEQLRARLEHHPQGQREPVEHHHHHH

T7-mHsp70-HER2/neu₂₆₋₁₃₆-SBP-His (90.2 kDa); Klon 4652.1

MASMTGGQQMGRISSRM₁AKNTAIGIDLGTTYSCVGVFQHGKVEIANDQGNRTTPSYVAFTDTERLIGDAAKNQ VALNPQNTVFDKRLIGRFKFGDAVVQSDMKHWPFQVNDGDKPKVQVNYKGESRSFFPEEISSMVLTKMKEIAEA YLGHPVTNAVITVPAYFNDSQRQATKDAGVIAGLNVLRINEPTAAAIAAYGLDRTGKGERNVLIFDLGGGTFDVSIL TIDDGIFEVKATAGDTHLGGEDFDNRLVSHFVEEFKRKHKKDISQNKRAVRRRLTACERAKRTLSSSTQASLEIDSL FEGIDFYTSITRARFEELCSDLFRGTLEPVEKALRDAKMDKAQIHDVLVGGSTRIPKQKLLQDFFNGRDLNKSIN PDEAVAYGAAVQAAILMGDKSENVQDLLLLDVAPLSLGLLETAGGVMTALIKRNTIPTKQTQFTTYSNQPGLI QVYEGERAMTRDNNLLGRFELSGIPPAPRGVQIEVTFDIDANGILNVTATDKTTGKANKITITNDKGRLSKEEIER MVQEAERYKAEDVQRDRVAAKNALESYAFNMKSAVEDEGLKGLSEADKKKVLKCCQEVISWLDSENTLADKEEF VHKREELERVCSPIISGLYQAGAPGAGGFGAQPAGSGSGPTIEVD₆₄₁GTMC₂₆TGTD**MKLRLPASPETHLDML**
RHLYQGCQVQGNLELTYLPTNASL**SFLQDIQEVQGYVLI**AHNQVRQVPLQRLRIVRGTQLFEDNYALAVLDNG
 DPLNNTTPVTGASPGG₁₃₆MEFGSDDDDKTTGWRGGHVVEGLAGELEQLRARLEHHPQGQREPVEHHHHHH

T7-mHsc70-HER2/neu₂₆₋₁₃₆-SBP-His (91.0 kDa); Klon 4653.1

MASMTGGQQMGRISSRM₁SKGPAVGIDLGTTYSCVGVFQHGKVEIANDQGNRTTPSYVAFTDTERLIGDAAKNQ VAMNPTNTVFDKRLIGRRFDDAVVQSDMKHWPFQVNDAGRPKVQVEYKGETKSFYPEEVSSMVLTKMKEIAEA AYLKKTVTNAVITVPAYFNDSQRQATKDAGTIAAGLNVLRINEPTAAAIAAYGLDKKVAERNVLIIFDLGGGTFDVSIL TIEDGIFEVKSTAGDTHLGGEDFDNRMVNHFIAEFKRKHKKDISENKRAVRRRLTACERAKRTLSSSTQASIEIDS LYEGIDFYTSITRARFEELNADLFRGTLDPVEKALRDAKLDKSQIHDIVLVGGSTRIPKIQKLLQDFFNGKELNKSINP DEAVAYGAAVQAAILSGDKSENVQDLLLLDVTPSLGIETAGGVMTVLIKRNTTIPTKQTQFTTYSNQPGLIQV YEGERAMTKDNNLLGKFEELTGIPPAPRGVQIEVTFDIDANGILNVSVDKSTGKENKITITNDKGRLSKEDIERMV

QEAKEYKAEDEKQRDKVSSKNSLESYAFNMKATVEDEKLQKINDEKQKILDKCNEIISWLDKNQTAEKEEFEHQ
 QKELERVNPIITKLYQSAGGMPGGMPGGFPGGGAPPSGGASSGPTIEEVD₆₄₆GTMC₂₆TGTMKLRASPETHL
 DMLRHLYQGCQVVGQGNLEL**TYLPTNASL**SFLQDIQEVQGYVLIAHNQVRQVPLQRLRIVRGTQLFEDNYALAVL
 DNGDPLNNTTPVTGASPGG₁₃₆MEFGSDDDDKTTGWRGGHVVEGLAGELEQLRARLEHHPQGQREPVEHHHHHH

T7-mHsp70L1-HER2/neu₂₆₋₁₃₆-SBP-His (75.5 kDa); Klon 4683.1

MASMTGGQQMGRISSRM₁AAIGVHLGCTSACVAVYKDGRADWANDAGDRVTPAIVAYSEREQVWGLAAKQSRI
 RHVSSTVVKVKQILGRSSADPQAQKYISESKCLVIEKNGKLRYEIDTGEETKLVNPEDEVARLIFSKMKETAHSVLS
 DANDVWVTPFDFGEKQKSALGEEAAGAFNVLRLIHEPSAALLAYGIGQDHPTGKSNLVFKLGGTSLSLVMEV
 NSGMVRLSTNTSDNIGGAHFTDLARYLASEFQRLFKHDVRGNARAMMKLMNSAEVAKHSLSTLGSANCFVDSL
 YEGQDFDCNVSRARFELLCSPLFNKCTEAIRELLRQTGFTADDINKVVLGGSSRIPKLQQLIKDLFPAVDLLNSIPP
 DEVIPIGAAIEAGILVGKESTSGDDSVMIIECSAKDILVKGVDSESGADRFTVLFPSGTPLPARRQHTLQAPGRVSSVCL
 ELYESEGKNSAKEEAKFAQVVLQDLDDKENGRLDILAVLTMKRDGSLQVTCTDQDTGKCEAITVEVA₅₀₇SMSRGS
 AGTMC₂₆TGTMKLRASPETHLDMLRHLYQGCQVVGQGNLEL**TYLPTNASL**SFLQDIQEVQGYVLIAHNQVRQ
 VPLQRLRIVRGTQLFEDNYALAVLDNGDPLNNTTPVTGASPGG₁₃₆MEFGSDDDDKTTGWRGGHVVEGLAGELEQ
 LRARLEHHPQGQREPVEHHHHHH

T7-m.tub.Hsp70(ct)-HER2/neu₂₆₋₁₃₆-SBP-His (47.9 kDa); Klon 4682.1

MASMTGGQQMGRISSRM₃₅₈EVKDVLLLDVTPSLGIETKGGVMTRLIERNNTIPTKRSETFTTADDNQPSVQIQVY
 QGEREIAAHNKLGSFELTGIPPAPRGIPQIEVTFDIDANGIVHVTAKDGTGKENTIRIQEGSGLSKEDIDRMKDA
 EAHAEEDRKRREEADVNRQAETLVYQTEKFVKEQREAEAGGSKVPEDTLNKVDAVAEAKAALGGSDISAIKSAMEK
 LGQESQALGQAIYEAQAASQATGAAHPGGEPGGAHPGSAD₆₁₀SMSRGSAGTMC₂₆TGTMKLRASPETHLD
 MLRHLYQGCQVVGQGNLEL**TYLPTNASL**SFLQDIQEVQGYVLIAHNQVRQVPLQRLRIVRGTQLFEDNYALAVLD
 NGDPLNNTTPVTGASPGG₁₃₆MEFGSDDDDKTTGWRGGHVVEGLAGELEQLRARLEHHPQGQREPVEHHHHHH

9.3.3 Hsp-HER2/neu₂₆₋₁₃₆-Fusionsproteine mit N-terminalem Zellpenetrierungs-peptid tat

tat-HER2/neu₂₆₋₁₃₆-SBP-His (20.6 kDa); Klon 4659.3

MGSRKKRRQRRRSRGSAGTMC₂₆TGTMKLRASPETHLDMLRHLYQGCQVVGQGNLEL**TYLPTNASL**SFLQD
 IQEVQGYVLIAHNQVRQVPLQRLRIVRGTQLFEDNYALAVLDNGDPLNNTTPVTGASPGG₁₃₆MEFGSDDDDKTTG
 WRGGHVVEGLAGELEQLRARLEHHPQGQREPVEHHHHHH

tat-mHsp70-HER2/neu₂₆₋₁₃₆-SBP-His (90.4 kDa); Klon 4667.1

MGSRKKRRQRRRSRM₁AKNTAIGIDLGTTSYCVGVFQHGKVEIANDQGNRTTPSYVAFTDTERLIGDAAKNQVAL
 NPQNTVFDKRLIGRKFQDVAVQSDMKHWPFQVNDGDKPKVQVNYKGESRSFFPEEISSMVLTKMKEIAEAYLG
 HPVTNAVITVPAYFNDSQRQATKDAGVIAGLNVLRIINEPTAAAIAYGLDRTGKGERNVLIFDLGGGTFDVSILTID
 DGIFEVKATAGDTHLGGEDFDNRLVSHFVEEFKRKHKKDISQNKRAVRLRTACERAKRTLSSTQASLEIDSLFEG
 IDFYTSITRARFEELCSDLFRGTLEPVEKALRDAKMDKAQIHDLVLVGGSTRIPKVQKLLQDFFNGRDLNKSINPDE
 AVAYGAAVQAAILMGDKSENVQDLLLLDVAPLSLGLTAGGVM TALIKRNSTIPTKQTQFTFTYSDNQPGVLIQVY
 EGERAMTRDNNLLGRFELSGIPPAPRGVQIEVTFDIDANGILNVTATDKTTGKANKITITNDKGRLSKEEIERMVQ
 EAERYKAEDDEVQRDRVAAKNALESYAFNMKSAVEDEGLKGLSEADKKKVLKDCQEVISWLDNSNTLADKEEFVHK
 REELERVCSPIISGLYQAGAPGAGGFGAQAAPKGASGSGPTIEEVD₆₄₁GTMC₂₆TGTMKLRASPETHLDMLRHL
 YQGCQVVGQGNLEL**TYLPTNASL**SFLQDIQEVQGYVLIAHNQVRQVPLQRLRIVRGTQLFEDNYALAVLDNGDPL
 NNTTPVTGASPGG₁₃₆MEFGSDDDDKTTGWRGGHVVEGLAGELEQLRARLEHHPQGQREPVEHHHHHH

tat-mHsc70-HER2/neu₂₆₋₁₃₆-SBP-His (91.2 kDa); Klon 4665.1

MGSRKKRRQRRRSRM₁SKGPAVGIDLGTTSYCVGVFQHGKVEIANDQGNRTTPSYVAFTDTERLIGDAAKNQVA
 MNPTNTVFDKRLIGRRFDDAVVQSDMKHWPFMVNDAGRPKVQVEYKGETKSFYPEEVSSMVLTKMKEIAEAY
 LGKVTNAVITVPAYFNDSQRQATKDAGTIAGLNVLRIINEPTAAAIAYGLDKKVGAEARNVLIFDLGGGTFDVSILTI

EDGIFEVKSTAGDTHLGGEDFDNRMVNHFAIEFKRKHKKDISENKRAVRLRTACERAKRTLSSSTQASIEIDSLYE
 GIDFYTSITRARFEELNADLFRGTLDPVEKALRDAKLDKSIHQHDIVLVGGSTRIPKIQKLLQDFNKGKLNKSNINPDE
 AVAYGAAVQAAIILSGDKSENVQDLLLLDVTPLSLGIETAGGVMTVLIKRNTTIPTKQTQFTTYSNQPGLVQVYE
 GERAMTKDNNLLGKFELTGIPPAPRGVQIEVTFDIDANGILNVSVDKSTGKENKITITNDKGRLSKEDIERMVQE
 AEKYKADEKQRDKVSSKNSLESYAFNMKATVEDEKLQKINDEDKQKILDKCNIEISWLDKNQTAEEKEEFHQQ
 KELERVCNPIITKLYQSAGGMPGGMPGGFPGGGAPSSGGASSGPTIEEVD₆₄₆GTMC₂₆TGDMKLRLPASPETHLD
 MLRHLYQGCQVWQGNLEL**TYLPTNASL**SFLQDIQEVQGYVLIHQNVRQVPLQRLRIVRGTQLFEDNYALAVLD
 NGDPLNNTTPVTGASPGG₁₃₆MEFGSDDDDKTTGWRGGHVVEGLAGELEQLRARLEHHPQGQREPVEHHHHHH

tat-mHsp70L1-HER2/neu₂₆₋₁₃₆-SBP-His (75.7 kDa); Klon 4680.1

MGSRRKRRQRRSRM₁AAIGVHLGCTSACVAVYKDGADRVWANDAGDRVTPAIVAYSEREQVWGLAAKQSRIRHV
 SSTWVKVKQILGRSSADPQAQKYISESKCLVIEKNGKLYEIDTGEETKLVNPEVARLIFSKMKETAHSLVLSGDAN
 DVVVTVPDFGKQKXSALGEAAGAAGFNVLRLIHEPSAALLAYGIGQDHPTGKSNVLFKLGGSLSLSVMEVNSG
 MYRVLSTNTSDNIGGAHFTDLARYLASEFQRLFKHDVRGNARAMMKLMNSAEVAKHSLSTLGSANCFVDSLYEG
 QDFDCNVSRRARFELLCSPLFNKCTEAIRELLRQTGFTADDINKVVLGGSSRIPKLQQLIKDLFPAVDLLNSIPPDEVI
 PIGAAIEAGILVGKESTSGDSSVMIECSAKDILVKGVDESADRFVLPFSGTLPARRQHTLQAPGRVSSVCELYE
 SEGKNSAKEEAKFAQVVLQDLKENGRLDILAVLTMKRDGSLQVTCTDQDTGKCEAITVEVA₅₀₇SMSRGSAAAGT
 MC₂₆TGDMKLRLPASPETHLDMLRHLYQGCQVWQGNLEL**TYLPTNASL**SFLQDIQEVQGYVLIHQNVRQVPLQ
 RLRIVRGTQLFEDNYALAVLDNGDPLNNTTPVTGASPGG₁₃₆MEFGSDDDDKTTGWRGGHVVEGLAGELEQLRAR
 LEHHPQGQREPVEHHHHHH

tat-m.tub.Hsp70(ct)-HER2/neu₂₆₋₁₃₆-SBP-His (48.0 kDa); Klon 4679.1

MASMTGGQMGRISSRM₃₅₈EVKDVLLLDVTPLSLGIETKGGVMTRLIERNNTTIPTKRSETFTTADDNQPSVQIQVY
 QGEREIAAHNKLGSFELTGIPPAPRGIPQIEVTFDIDANGIVHVTAKDKGTGKENTIRIQEGSGLSKEDIDRMKDA
 EAHAEEDRKRREEADVNRQAETLVYQTEKFVKEQREAEAGGSKVPEDTLNKVDAVAEAKAALGGSDISAIKSAMEK
 LGQESQALGQAIYEAQAASQATGAAHPGGEPGGAHPGSAD₆₁₀SMSRGSAAAGTMC₂₆TGDMKLRLPASPETHLD
 MLRHLYQGCQVWQGNLEL**TYLPTNASL**SFLQDIQEVQGYVLIHQNVRQVPLQRLRIVRGTQLFEDNYALAVLD
 NGDPLNNTTPVTGASPGG₁₃₆MEFGSDDDDKTTGWRGGHVVEGLAGELEQLRARLEHHPQGQREPVEHHHHHH

9.4 MHC:Peptid-Dimere

9.4.1 HLA-A2:KIFGSLAFL-IgG₁Fc-Dimer

HA1-HER2/neu₃₆₉₋₃₇₇-Spacer-hu₂m-Spacer(pYD1)-HLA-A2-huIgG₁Fc (75.3 kDa, ohne
 Glykosylierung); Klon 4170.2

MAKANLLVLLCALAAADA**KIFGSLAFL**SLGGGGSGGGGAPGSGGGSIQRTPKIQVYSRHPAENGKSNFLNICYVSG
 FHPSDIEVDLLKNGERIEKVEHSDLSFSKDWFSYLLYYTEFTPTTEKDEYACRVNHVTLSPQKIVKWDRDMRSASGG
 GSGGGGGSGGGGSASGGGGDLGSHSMRYFFTSVSRPGRGEPRIAVGVVDDTQFVRFSDAASQRMEPRAPWIE
 QEGPEYWDGETRKKAHSQTHRVDLGLTRGYNNQSEAGSHTVQRMYGCDVGSWRFWRFLRGYHQYAYDGKDYIALK
 EDLRSWTAADMAAQTTKHKEAAHVAEQLRAYLEGTCVEWLRRYLENGKETLQRTDAPKTHMTHHAVSDHEATLR
 CWALSFYPAEITLTWQRDGEDQTQDELVETRPAGDGTQKWAAVVWPSGQEQRYSCHVQHEGLPKPLTLRWE
 PSSQPTIPIVIGIEPKSSDKTHTCPPCAPEFEGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVWVDVSHEDPEVKFNWYVD
 GVEVHNAKTPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPTPIEKTKAKAGQPREPQVYTLPPSRD
 ELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEA
 LHNHYTQKSLSPGK

9.4.2 K^d:TYLPTNASL-IgG₁Fc-Dimer

HA1-HER2/neu₆₃₋₇₁-Spacer-huβ₂m-Spacer(pYD1)-K^d-huIgG₁Fc (75.3 kDa, ohne Glykosylierung); Klon 4380.1

MAKANLLVLLCALAAADAT**TYLPTNASL**SLGGGGSGGGGAPGSGGGSIQRTPKIQVYSRHPAENGKSNFLNCYVSG
FHPSDIEVDLLKNGERIEKVEHSDLSFSKDWSFYLLYYTEFTPTTEKDEYACRVNHVTLSPKIVKWDRDMRSASGG
GGSGGGSGGGGSASGGGGDLGPHSLRYFVTAVSRPGLGGEPFIAVGYVDDTQFVRFDSADNPRFEPRAPWM
EQEGPEYWEEQTQRAKSDEQWFRVSLRTAQRYYNQSKGGSHTFQRMFGCDVGS DWRLLRGYHQFAYDGRDYI
ALNEDLKTWTAADTAALITRRKWEQAGDAEYRAYLEGECEVWLRRYLELGNETLLRTDSPKAHVTYHPRSQVDV
TLRCWALGFYPADITLTWQLNGEDLTQDMELVETRPAGDGTQKWA AVVPLGKEQNYTCHVHHKGLPEPLTLR
WKLPSTVSNTVPEPKSSDKTHCPCPAPEFEGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTP EVT CVVVDVSHEDPEVKFNWY
VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPTPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS
RDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFC SVMH
EALHNHYTQKSLSPGK