Aus dem Interfakultären Institut für Zellbiologie
der Universität Tübingen
Abteilung Immunologie
Abteilungsleiter: Professor Dr. Hans-Georg Rammensee

Untersuchungen zur Rolle molekularer Chaperone und Hitzeschockprotein-assoziierter Peptide in der T-Zell-vermittelten Immunantwort

-

Peptidmotiv und Liganden des Miniaturschwein-MHC I Moleküls PD1

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Medizinischen Fakultät
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
HANS ULRICH SCHERER
aus
München
2004

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

Meinen Eltern und meiner Schwester Kathrin gewidmet

„Wenn Du ein Schiff bauen willst, dann trommele nicht Männer zusammen, um Holz zu beschaffen, Aufträge zu vergeben und Arbeit zu verteilen, sondern lehre sie die Sehnsucht nach dem weiten endlosen Meer.“

Antoine de St. Exupéry

Inhaltsverzeichnis

1	**Einleitung**	**1**
1.1	**Das Immunsystem – Ein Überblick**	**1**
1.1.1	Angeborene und erworbene Immunität	1
1.2	**Antigenpräsentation**	**4**
1.2.1	MHC-Moleküle	4
1.2.2	Peptidbindungseigenschaften der MHC-Moleküle	6
1.2.3	Antigenerkennung durch T-Zellen (Priming)	7
1.2.4	Funktionen der T-Lymphozyten	9
1.3	**Antigenprozessierung**	**10**
1.3.1	Der klassische MHC-I Prozessierungsweg	10
1.3.2	Der klassische MHC-II Prozessierungsweg	13
1.3.3	Cross-priming und Cross-presentation	14
1.3.4	Dendritische Zellen (DC)	17
1.4	**Molekulare Chaperone und Hitzeschockproteine**	**20**
1.4.1	Molekulare Chaperone, Proteinfaltung und die Stressantwort	20
1.4.2	Immunogene Eigenschaften von Hitzeschockproteinen	24
1.4.3	Das Multifunktionstalent Gp96	28
1.4.4	Gp96 und die „T-Zell-Hilfe“	29
1.5	**Zielsetzung der Arbeit**	**30**
1.5.1	Peptidmotivbestimmung des MHC-I Moleküls PD1 *(Sus scrofa)*	31
2	**Material und Methoden**	**33**
2.1	**Zellkultur**	**33**
2.1.1	Zellinien	33
2.1.2	Kulturbedingungen	34
2.1.3	Einfrieren und Auftauen von Zellen	36
2.1.4	Milz- und Lymphknotenkulturen	37
2.1.5	Dendritische Zellen aus Mäuseknochenmark (BMDC)	38
2.1.6	Peritoneale Exsudat-Zellen (PEC)	38
2.2	**Durchflußzytometrie (FACS)**	**39**
2.2.1	FACS-Färbung mit Zelloberflächenmarkern	40
2.2.2	Intrazelluläre Zytokinfärbung	41
2.3	**Mauszucht und -typisierung**	**42**
2.3.1	OT-I und -II Mäuse	42
2.3.2	Schwanzblutentnahme und Typisierung	43
2.4	**Proteinreinigung**	**44**
2.4.1	Aufreinigung von Gp96 mit ConA-Sepharose und FPLC	44
2.4.2	SDS - PAGE	48
2.4.3	Dot Blot	49
2.4.4	Coomassie-Färbung von SDS - Gelen	50
2.5	**Proteinmarkierung**	**51**
2.5.1	TRITC-Markierung von Hsp60	51

2.5.2 Proteinbestimmung nach Lowry 52
2.5.3 Biotinylierung von Gp96 53
2.6 Aktivierungs- / Repräsentationsassays 53
2.6.2 Repräsentationsassay - in vitro-System 57
2.6.3 Zellproliferationsassays mit BrdU 58
2.6.4 Aktivierung dendritischer Zellen 58
2.6.5 Sandwich - ELISA zum Zytokinnachweis 59
2.7 Gp96 - Beladungsassay 61
2.7.1 Europium - ELISA (time-resolved fluorometry) 62
2.8 Peptidextraktion von MHC-Klasse-I Molekülen und ihre Analyse 63
2.8.1 Aufreinigung von PD1 mit ProteinA-Sepharose 64
2.8.2 Poolsequenzierung der extrahierten Peptide 65
2.9 Verzeichnis verwendeter synthetischer Peptide 66

3 Ergebnisse 68

3.1 Versuche zum Nachweis von Gp96-assoziierten MHC-II Epitopen 68
3.1.1 Isolierung von Gp96 68
3.1.2 Schwache Aktivierbarkeit der T-Zellhybridome 3DO und BO97 69
3.1.3 Das T-Zellrepertoire von OT-I und -II Mäusen 71
3.1.4 Festlegung der Immunisierungsbedingungen 72
3.1.5 Immunisierung von OT-II Mäusen mit Gp96 73
3.1.6 Aktivierung Ovalbumin-spezifischer T-Zellen durch Peptid aber nicht durch Gp96 74
3.1.7 Versuch der Repräsentation Gp96-assoziierter Peptide durch antigenpräsentierende Zellen (APC) 76
3.1.8 Assay zur Beladung von Gp96 mit exogenen Peptiden 78
3.2 Aktivierung dendritischer Zellen durch Gp96 80
3.2.1 Das Zytokinmuster aktivierter dendritischer Zellen 80
3.2.2 Die Aktivierung dendritischer Zellen durch Gp96 ist Ca^{++}-abhängig 81
3.3 HSP60 - Bindungsstudien 82
3.4 Peptidmotiv und Liganden des Schweine-MHC-I Moleküls PD1 86
3.4.1 PD1 Expression auf A505 und PD1.1 Zellen 86
3.4.2 Motivbestimmung mit A505-Zellen 86
3.4.3 Ligandenbestimmung mit PD1.1 Zellen 88

4 Diskussion 90

4.1 Gp96-induzierte Immunität und $CD4^+$ T-Zellen 90
4.1.1 Interpretation der Ergebnisse 90
4.1.2 Pro und Contra einer T-Zell-Hilfe für Gp96 92
4.2 Das proinflammatorische Zytokinmuster Gp96-aktivierter DC 94
4.3 Hsp60-Bindung und Autoimmunität 96
4.4 Peptidmotiv und Liganden des Schweine-MHC-I Moleküls PD1 98
4.4.1 Peptidmotiv 98
4.4.2 Liganden 99
4.5 Fragestellungen und Ausblick 101

5 Zusammenfassung 102

6 Anhang 103

6.1 Literatur 103
6.2 Einbuchstaben-Code der Aminosäuren 120
6.3 Danksagung 121
6.4 Lebenslauf / Publikationen 123

1 Einleitung

1.1 Das Immunsystem – Ein Überblick

Die ungeheure Artenvielfalt der Natur erfordert von jedem Organismus die Fähigkeit zur Verteidigung des eigenen Lebensraums. Im Laufe der Evolution ist bei Vertebraten ein komplexes und hochpotentes Abwehrsystem entstanden, welches den Organismus vor Infektionserregern wie Bakterien, Viren, Pilzen und Parasiten sowie entarteten Zellen zu schützen versucht. Im Mittelpunkt steht dabei die spezifische Erkennung körperfremder, schädlicher Strukturen und Substanzen und deren selektive Bekämpfung. Nur durch ein sensibles Gleichgewicht von Aktivierung und Unterdrückung dieses Immunsystems wird dabei verhindert, dass es sich gegen körpereigene Strukturen wendet. Die fulminanten Verläufe mancher Autoimmunkrankheiten sowie der Transplantatabstoßung sind eindrucksvolle Zeugnisse der Entgleisung dieser Regulationsmechanismen.

1.1.1 Angeborene und erworbene Immunität

Bei der Ausbildung von Immunität eines Organismus gegenüber einem Infektionserreger oder Antigen wird klassischerweise eine angeborene von einer adaptiven, erworbenen Komponente der Immunantwort unterschieden. Die angeborene Komponente ist phylogenetisch alt. Viele daran beteiligte Gene finden sich nicht nur in Vertebraten, sondern auch in Nichtvertebraten und Pflanzen (Medzhitov and Janeway, 2000). Sie verwendet bei der Antigenerkennung ein relativ kleines Repertoire an Rezeptoren für konservierte mikrobielle Strukturen und ist schnell und unmittelbar einsatzfähig. Zu den Effektoren zählen Enzyme wie Lysozym, phagozytierende Zellen, die alternative Komplementkaskade sowie natürliche Killerzellen. Gerade den phagozytierenden Zellen kommt mit ihrer Fähigkeit zur professionellen Antigenpräsentation und der Sekretion von Botenstoffen (Zytokine, Chemokine) die Vermittlerrolle zu den Akteuren der adaptiven Immunantwort (T- und B-Lymphozyten) zu, welche sich durch Antigenspezifität, Freund-Feind-Erkennung und ein immunologisches Gedächtnis auszeichnet. Diese Komponente arbeitet mit einer großen Vielfalt an Rezeptoren (Diversität), die entschei-

dende klonale Expansion der antigenspezifischen Zelle ist jedoch mit 3-5 Tagen zeitaufwendig. Die Ausbildung eines immunologischen Gedächtnisses verkürzt die Aktivierungszeit der adaptiven Immunität bei Reinfektion und verleiht einem Neugeborenen in Form von Antikörpern der Mutter in den ersten Lebensmonaten Schutz bis zur Reifung der eigenen adaptiven Abwehr (Zinkernagel, 2001).

Angeborene Immunität:

Die Effektoren der angeborenen Immunantwort, professionelle antigenpräsentierende Zellen wie Makrophagen, dendritische Zellen und B-Zellen, erkennen Pathogene an wenigen hochkonservierten Strukturen (pathogen-associated molecular patterns), für welche sie entsprechende Rezeptoren (pathogen-recognition receptors) besitzen. Zu diesen nur von mikrobiellen Pathogenen produzierten Strukturen zählen bakterielles Lipopolysaccharid (LPS), Peptidoglykane, Lipoteichonsäure, Mannane, bakterielle DNA, doppelsträngige RNA sowie Glykane (Medzhitov and Janeway, 2000). Die Rezeptoren besitzen meist Leucin-reiche Domänen, Calcium-abhängige Lectin-Domänen und Scavenger-Rezeptor Protein Domänen (Fearon and Locksley, 1996). Sie können in löslicher Form Antigene opsonisieren, mit dem gebundenen Antigen endozytiert werden sowie Signale ins Zellinnere übermitteln. Der Mannose-Rezeptor auf Makrophagen zum Beispiel bindet Mannose-reiche Kohlenhydrate auf Mikroorganismen und führt so zu deren Endozytose und Zerstörung in Lysosomen (Fraser et al., 1998). Ebenso sind Scavenger-Rezeptoren auf Makrophagen (SR-AI/II) durch die Bindung an bakterielle Zellwandbestandteile grampositiver Bakterien entscheidend an deren Elimination aus dem Blutstrom beteiligt (Thomas et al., 2000).
Signalvermittelnde Rezeptoren induzieren die Expression immunmodulatorischer Zytokine und Chemokine sowie kostimulatorischer Moleküle für die Antigenpräsentation. Die in der Fruchtfliege Drosophila melanogaster erstmals entdeckte Toll-Rezeptor-Familie und ihre Homologe in Maus und Mensch (toll-like receptors, TLRs) führen über eine Signalkaskade zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF-κB (nuclear factor-κB), für den wiederum viele immunologisch wichtige Gene Promotorbindungsstellen besitzen. TLR4 ist in der Maus, zusammen mit einem LPS-Bindungsprotein im Serum sowie den Molekülen CD14 (löslich und membrangebunden) und MD-2 auf Makropha-

gen und B-Zellen, essentiel an der Erkennung von LPS beteiligt (Viriyakosol et al., 2000; Lien et al., 2000; Fearon, 2000). Mäuse mit einem defekten *tlr4*-Gen sind resistent gegenüber dem durch Endotoxin vermittelten Schock-Syndrom (Hoshino et al., 1999). Vergleichbar dazu können Mäuse mit defektem *tlr2*-Gen Peptidoglykane und Lipoproteine nicht erkennen (Hoshino et al., 1999). Ebenso wird bakterielle DNA, welche sich durch hohes Vorkommen unmethylierter CpG-Dinukleotide von humaner DNA unterscheidet, anhand dieses Kriteriums spezifisch durch TLR9 erkannt, so dass $TLR9^{-/-}$-Mäuse Resistenz gegenüber der sonst lethalen Wirkung von CpG-DNA zeigen (Hemmi et al., 2000). Zunehmend wird auch die Bedeutung dieser Rezeptorfamilie für die Erkennung körpereigener sowie fremder extrazellulärer Chaperone und Hitzeschockproteine deutlich (siehe 1.4.2).

Adaptive Immunität:

T- und B-Zellen werden durch die Akteure der angeborenen Immunantwort auf ein Antigen aufmerksam. Diese produzieren zum einen Botenstoffe, die T-Zellen stimulieren und zur Penetration der Gefäßwand in Richtung Entzündungsherd anregen. Zum anderen präsentieren sie Peptidfragmente phagozytierter und intrazellulärer Proteine mit Hilfe von MHC-Molekülen auf ihrer Zelloberfläche, die von T-Zellen mittels Rezeptoren spezifisch erkannt werden (siehe 1.2). B-Zellen dagegen werden durch die Bindung von nativem Antigen an die auf ihrer Oberfläche exprimierten Immunglobuline aktiviert und zur Sekretion von Antikörpern angeregt.
Da alle kernhaltigen Körperzellen Fragmente aus ihrem Proteinmetabolismus dem Immunsystem zur Kontrolle präsentieren, ist eine Unterscheidung zwischen körpereigen und körperfremd notwendig, deren Grundlage während der Reifung von T- und B-Lymphozyten gelegt wird. Bei beiden Lymphozytenarten entstehen durch unterschiedliche Kombination von Gensegmenten während der Entwicklung Populationen mit Rezeptoren unterschiedlichster Spezifität, zunächst unabhängig von einer potentiellen Autoreaktivität. Dabei sind weniger als 400 Gene der Ursprung für geschätzte 10^{16} verschiedene variable Regionen der T- und B-Zellrezeptoren (siehe 1.2 und (Tonegawa, 1983)). Von einer bestimmten Spezifität existieren letztlich nur einige tausend reife Lymphozyten im gesamten Organismus.

Unreife B-Zellen im Knochenmark exprimieren zunächst membranständige IgM-Moleküle, wobei jede Zelle nur eine Spezifität aufweist. Erkennen diese ubiquitär vorkommende, körpereigene Antigene, wird die entsprechende B-Zelle in die Apoptose getrieben (klonale Deletion) oder inaktiviert. Reife B-Lymphozyten exprimieren bei Verlassen des Knochenmarks membranständige IgM- und IgD-Moleküle. Binden sie in Milz oder Lymphknoten ein Fremdantigen, entwickeln sie sich weiter in antikörpersezernierende Plasmazellen.

T-Zellen werden im Thymus zunächst darauf getestet, ob sie ausschließlich körpereigene MHC-Moleküle erkennen (positive Selektion). Anschließend werden all jene eliminiert, die körpereigene Peptide in Verbindung mit körpereigenem MHC erkennen (negative Selektion). Als weiterer Schutz vor Autoreaktivität werden reife T-Zellen nur aktiviert, wenn die antigenpräsentierende Zelle zusätzlich zum MHC-Peptid-Komplex kostimulatorische Moleküle wie CD80 und CD86 (B7.1/2) exprimiert. Normale Körperzellen sind dazu nicht in der Lage und auch APC exprimieren diese nur nach Kontakt mit pathogenen Strukturen.

1.2 Antigenpräsentation

1.2.1 MHC-Moleküle

Major histocompatibility complex (MHC)-Moleküle sind spezifische Rezeptoren für Peptidantigene aus dem intrazellulären Proteinabbau und dem Abbau phagozytierten Materials (Rammensee et al., 1993). Die ursprünglich im Zusammenhang mit Transplantatabstoßungen entdeckten Moleküle (Gorer, 1936; Snell, 1948) werden von T-Zellen als MHC-Peptid-Komplexe auf Zelloberflächen erkannt. Als körperfremd identifizierte Peptide aus virusinfizierten oder entarteten Zellen sowie aus dem Abbau phagozytierter Antigene aktivieren T-Zellen zur antiviralen Zytolyse (Zinkernagel and Doherty, 1974), Transplantat- und Tumorabstoßung sowie zur Produktion immunregulatorischer Zytokine (Madden, 1995). Gegenüber körpereigenen, natürlichen Peptiden weisen T-Zellen Toleranz auf.

Aufgrund von Struktur und Peptidbindungseigenschaften wird zwischen MHC-I und -II Molekülen unterschieden. MHC-I Moleküle kommen ubiquitär auf allen kernhaltigen Zellen vor und werden von $CD8^+$, zytotoxischen T-Zellen erkannt. MHC-II Moleküle werden lediglich auf antigenpräsentierenden Zellen, aktivierten T-Zellen und Epithelzellen des Thymus exprimiert und von $CD4^+$ T-Helferzellen erkannt. In Anwesenheit von Intereferon-γ sind jedoch auch andere Zellen zur MHC-II Expression fähig (Klein and Sato, 2000).

Die ca. 200 Gene des humanen Leukozyten-Antigen (HLA-) Komplexes, der humanen Version des MHC, befinden sich auf Chromosom 6. Dabei besteht für die verschiedenen Komponenten der heterodimeren MHC-Moleküle ein starker Polymorphismus, der den Haplotyp eines Menschen bestimmt. Zusätzlich zu den Genen der MHC-Moleküle liegen in diesem Bereich Gene anderer immunologisch bedeutsamer Proteine wie TAP (transporter associated with antigen processing), MICA und MICB (MHC-class I chain genes A und B) sowie einiger Hitzeschockproteine.

MHC-I Moleküle bestehen aus einer in der Membran verankerten α-Kette sowie einer nichtkovalent assoziierten β-Kette, deren monomorphes Gen (β_2-Mikroglobulin-Gen) auf Chromosom 15 liegt. Die α-Kette besteht aus fünf Domänen: zwei peptidbindenden Domänen (α1, α2), einer immunglobulinähnlichen Domäne (α3), einer Transmembranregion und einem zytoplasmatischem Schwanz. Von den ca. 20 MHC-I Genen in der HLA-Region haben die Loci HLA-A, -B und -C die größte Bedeutung. Die Peptidbindungstasche der besonders polymorphen α1- und α2-Domäne wird durch einen Boden in β-Faltblattstruktur und zwei α-helikale Wände gebildet. Dabei zeigen die variabelsten Aminosäuren in die Tasche hinein und von den α-Helices nach aussen. An beiden Enden der länglichen Tasche konvergieren die α-Helices und verschließen die Tasche mit großen Aminosäuren wie Tyrosin und Tryptophan (Bjorkman et al., 1987; Madden et al., 1991). MHC-I Liganden werden fest in diese Tasche gebunden und haben eine Länge von 8-10 Aminosäuren (Rammensee et al., 1993).

MHC-II Moleküle bestehen aus einer α- und einer β-Kette. Hier sind beide Ketten in der Zellmembran verankert, sind in etwa gleich schwer und bilden zusammen die Peptidbindungstasche. Auch hier finden sich drei Loci: HLA-DP, -DQ und -DR. Die Bindungstasche wird von den α1- und β1-Domänen gebildet und ist ähnlich der Klasse-I Tasche geformt. Jedoch ist sie an den Enden nicht durch sperrige Aminosäuren ver-

schlossen, so dass MHC-II Peptidliganden sowohl C- wie auch N-terminal über die Tasche hinaushängen können. Sie haben in der Regel eine Länge von 12 bis 25 Aminosäuren, wobei jedoch nur 9 Aminosäuren an der Bindung beteiligt sind.
Die Beobachtung, dass Transplantate trotz MHC-Identität von Spender und Empfänger zu Abstoßungsreaktionen führen können, führte zum Postulat sogenannter minor histocompatibility Antigene (Minor-H Antigene) (Townsend et al., 1985) und deren Nachweis (Speiser et al., 1990; Wallny and Rammensee, 1990). Hierbei handelt es sich um zelleigene polymorphe Proteine, welche als Peptide im Kontext mit MHC-Molekülen aber auch direkt auf der Zelloberfläche durch zytotoxische T-Zellen (CTL) erkannt werden können (Bevan, 1987). Als klassisches Modell gilt die Stimulation von Milzzellen einer immunisierten C57BL/6 Maus (Haplotyp H-2^b, H-2 ist der MHC der Maus) mit Zellen einer BALB.B Maus (Haplotyp ebenfalls $H2^b$). Hierdurch erhält man minor-H-spezifische CTL. Zu bislang identifizierten Minor-H Antigenen zählen unter anderen β_2-Mikroglobulin, welches direkt erkannt wird (Rammensee et al., 1986), sowie das auf H-2 D^b Molekülen präsentierte Y-chromosomale H-Y Antigen.

1.2.2 Peptidbindungseigenschaften der MHC-Moleküle

Die wohl eindrucksvollste Eigenschaft eines MHC-Moleküls ist seine Fähigkeit, extrem stabile Komplexe mit tausenden verschiedener Peptide zu bilden, die sich nur in wenigen Aminosäureseitenketten gleichen (Rotzschke and Falk, 1994). Zunächst werden die Peptide, unabhängig von ihren Seitenketten, durch van der Waals-Kräfte und Wasserstoffbrückenbindungen in der Bindungstasche stabilisiert (Madden et al., 1992). Durch Elution natürlicher Liganden von MHC-I Molekülen des Menschen (HLA) und der Maus (H2) sowie Sequenzierung des Peptidpools konnten zudem allelspezifische Peptidbindungsmotive identifiziert werden (Falk et al., 1991), welche bestimmte Anforderungen an die Peptidsequenz aufdeckten. Positionen im Peptid, an denen nur eine bestimmte Aminosäure oder zwei chemisch eng verwandte Aminosäuren vorkommen, gelten als primäre Ankerpositionen. Die meisten MHC-I Liganden haben Anker an Position 2 und dem Carboxylende des Peptids. Als Hilfsanker werden Positionen bezeichnet, die eine weniger strenge Präferenz gegenüber einer Aminosäure aufweisen. Diese

haben einen Einfluß auf die Affinität der Peptidbindung an die Tasche. Die restlichen Positionen sind relativ variabel, wobei jede Tasche an praktisch jeder Position gewisse Vorlieben hat. Die beschriebenen Bindungseigenschaften gelten so jedoch nur für natürliche MHC-Liganden bzw. Peptide, die den Weg der Antigenprozessierung durchlaufen haben (siehe 1.3). Generell können MHC-Moleküle Peptide von 4 bis 28 Aminosäuren Länge binden, unabhängig davon, ob die Sequenz das erforderliche Motiv enthält. Diese Bindung ist jedoch deutlich schwächer als die natürlicher Liganden (Rammensee et al., 1993).

Aufgrund des Polymorphismus der MHC-Allele hat jedes MHC-Molekül sein eigenes Bindungsmotiv für natürliche Liganden. Die Zellen eines Individuums können dementsprechend nur eine Auswahl an Peptiden präsentieren, die den Bindungsvorgaben der von ihnen exprimierten MHC-Moleküle entsprechen. Mutationen im zelleigenen Genom müssen daher nicht unbedingt zur Präsentation eines als fremd erkannten Peptids aus dem defekten Protein führen. Dies erklärt unter anderem die Assoziation bestimmter Autoimmunerkrankungen mit dem Haplotyp eines Individuums (z.B. rheumatoide Arthritis und HLA-B27).

1.2.3 Antigenerkennung durch T-Zellen (Priming)

Die Vielzahl der durch MHC-Peptid-Komplexe präsentierten Antigene erfordert von T-Zellen ein ähnlich diverses Rezeptorsystem. Der T-Zellrezeptor (TCR) ist ein heterodimeres, membranständiges Molekül bestehend aus einer α- und einer β-Kette. Darüber hinaus existiert eine kleine Population von T-Zellen, deren TCR aus einer γ- und einer δ-Kette besteht. Über die Funktion der γδ T-Zellen ist jedoch noch wenig bekannt. Ähnlich Immunglobulinen besitzen die α- und β-Ketten eine N-terminale variable Region, eine konstante Region, einen beweglichen Hinge-Bereich, eine Transmembranregion sowie einen kurzen zytoplasmatischen Schwanz. Die auch bei der Produktion von Antikörpern durch B-Zellen eingesetzte Kombinierung mehrerer Gensegmente, die Insertion und Deletion von Verbindungsbereichen (junctions) sowie die zufällige Kombination der fertigen Ketten führt zu einer Diversität von geschätzten 10^{16} möglichen variablen Regionen (Davis and Bjorkman, 1988; Germain and Stefanova, 1999). Nach Selektion

im Thymus befinden sich damit ca. 25-100 Millionen naive T-Zellklone unterschiedlicher Spezifität im menschlichen Organismus (Arstila et al., 1999).

Die in den Taschen der MHC-Moleküle gebundenen Peptide ragen nur mit wenigen Aminosäuren über die sie umgebenden α-Helices hinaus. Dem TCR stellt sich somit von oben gesehen eine breite Oberfläche dar, die zum Großteil durch das MHC-Molekül gebildet wird (Garboczi et al., 1996).

Beide Ketten bilden die Antigenbindungsstelle des TCR mit drei Bereichen (complementarity determining regions, CDR), von denen die äußeren, CDR1 und CDR2, das MHC-Molekül binden und daher wenig Variation zeigen. Die zentrale, das Peptid erkennende CDR3 Region, weist folglich die höchste Variabilität auf (Garcia et al., 1998). Der TCR setzt diagonal auf der MHC-Peptid-Oberfläche auf, so dass die CDR1 und 2 Region der α-Kette den Aminoterminus und die CDR1 und 2 Region der β-Kette den Carboxyterminus des Peptids überdecken (Ding et al., 1998; Klein and Sato, 2000).

Da die zytoplasmatische Domäne des TCR zu kurz für die Weiterleitung eines Signals ist, wird dies durch den sogenannten CD3-Komplex übernommen. Dieser besteht aus drei Transmembranproteinen (γ, δ, ε), welche stabil mit dem TCR assoziiert sind. Zusammen mit einem vierten Protein (ζ) bilden sie ITAMs (immunoreceptor tyrosine-based activation motifs), welche Signale über Tyrosinkinasen ins Zellinnere vermitteln. Der alleinige Kontakt von TCR und MHC-Peptid-Komplex sendet jedoch ein eher schwaches Signal, so dass eine hohe Antigenkonzentration zur T-Zellaktivierung notwendig ist. Durch die Korezeptoren CD4 und CD8 auf T-Helferzellen bzw. CTL wird dieses Signal um das 100fache verstärkt. Das Monomer CD4 bindet an eine konstante Region des MHC-II Moleküls, das Heterodimer CD8 kontaktiert MHC-I. Beide binden auf der cytoplasmatischen Seite die Tyrosinkinase Lck.

Eine weiteres wichtiges kostimulatorisches Signal für die $CD4^+$ T-Zellaktivierung wird durch CD40 auf APC und B-Zellen und CD40-Ligand (CD154) auf T-Helferzellen vermittelt. Die Induktion der Antikörperproduktion in B-Zellen sowie die Aktivierung von DC für erfolgreiches CTL-priming sind abhängig von diesem Signal.

1.2.4 Funktionen der T-Lymphozyten

Verglichen mit der unübersehbaren Zahl im Organismus präsentierter Antigene ist die Zahl der für ein bestimmtes Antigen spezifischen T-Lymphozyten verschwindend gering. Naive T-Zellen wandern daher bevorzugt in regionale Lymphknoten (homing), zu denen Antigene durch dendritische Zellen transportiert werden (Banchereau and Steinman, 1998; Marzo et al., 1999). Durch Fremdantigen aktivierte T-Zellen proliferieren zunächst klonal, bevor sie zu Effektoren werden und Chemokinen zum Entzündungsherd folgen. Sie besitzen sowohl eine Vielzahl von Chemokin-Rezeptoren (CCR- und CXCR-Familie) als auch Adhesionsmoleküle (VCAMs, ICAMs, etc.), die sie dirigieren und ihnen die Wanderung durch das Endothel von Venolen erlauben (von Andrian and Mackay, 2000).

$CD8^+$ zytotoxische T-Zellen zerstören Zellen durch direkte Lyse mit Perforinen oder durch Induktion von Apoptose über Fas/Fas-Ligand. $CD4^+$ T-Helferzellen werden aufgrund ihrer Zytokinproduktion im Anschluß an eine spezifische Aktivierung unterteilt in Th_1- und Th_2-Zellen. In welche dieser Effektorvarianten sich eine naive T-Helferzelle entwickelt, hängt hauptsächlich von dem sie umgebenden Zytokinmilieu zum Zeitpunkt der Antigenerkennung ab. IFN-γ und IL-12 gelten als Hauptinitiatoren einer Th_1-Antwort, während IL-4 die Differenzierung von Th_2-Zellen bestimmt. Letztere produzieren die Zytokine IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 sowie IL-13 und nehmen so Einfluß auf den Isotyp-Wechsel und die Antikörpersekretion von B-Zellen. Th_1-Zellen sind durch die Sekretion von IFN-γ und TNF-β charakterisiert und an der Auslösung zellulärer Immunantworten beteiligt (Constant and Bottomly, 1997). Sie aktivieren Makrophagen und spielen eine entscheidende Rolle bei der Induktion von spezifischen CTL. Die Interaktion mit DC über die Moleküle CD40 / CD40Ligand kann über die Auslösung von Toleranz oder Immunität entscheiden (Diehl et al., 1999). Zudem sind CD40-unabhängige CD4-vermittelte Wege der CTL-Induktion beschrieben (Lu et al., 2000).

1.3 Antigenprozessierung

Intrazelluläre und extrazelluläre Proteinantigene müssen für die Präsentation auf MHC-I und -II Molekülen vorbereitet (prozessiert) werden. Aus dem Proteinmetabolismus einer Zelle stammende Proteine, also auch viralen oder entarteten Ursprungs, werden auf MHC-I Molekülen präsentiert. Extrazelluläre, von APC aufgenommene Antigene dagegen gelangen meist auf MHC-II Moleküle.

1.3.1 Der klassische MHC-I Prozessierungsweg

Vor der Peptidbindung befinden sich leere MHC-I Moleküle im endoplasmatischen Retikulum (ER) einer Zelle. Ohne Peptid sind sie instabil, so dass sie mit molekularen Chaperonen wie Calnexin, Calreticulin, ERp57 sowie dem Protein Tapasin interagieren (Williams and Watts, 1995; Hughes and Cresswell, 1998; Lindquist et al., 1998; Ortmann et al., 1997). Dies verhindert, dass leere MHC-Moleküle an die Zelloberfläche gelangen und dort extrazelluläre Peptide binden (Rock and Goldberg, 1999).
Die Generierung von Peptiden aus zellulären Proteinen geschieht hauptsächlich durch einen Multienzymkomplex, das Proteasom, im Zytosol der Zelle (s.u.). Von dort werden sie über einen dimeren Transporter (TAP-1/-2, transporter associated with antigen processing) in das ER überführt. Als Quelle dienen zum einen gealterte Proteine, die ihre Funktion erfüllt haben. Zum anderen gelangen aber auch ca. 30 % neu, jedoch fehlerhaft synthetisierte Proteine als DRiPs (defective ribosomal products) zum Proteasom und damit als Peptide auf MHC-I Moleküle. Dies wird durch eine recht hohe Fehlerquote bei der Transkription und Translation ermöglicht. T-Zellen werden dadurch schon sehr früh über eine mögliche Virusinfektion oder Entartung der Zelle informiert (Schubert et al., 2000; Reits et al., 2000; Schild and Rammensee, 2000b).
Viele Proteine werden vor der Degradation durch das Proteasom enzymatisch mit Ubiquitin-Molekülen markiert. Obwohl diese Markierung nicht essentiell für den Abbau eines Proteins zu sein scheint, ist sie jedoch notwendig für eine regulierte Proteolyse und die Generierung von MHC-I Liganden in vivo (Townsend et al., 1988; Michalek et al., 1993). Dabei scheint die Beschaffenheit des Aminoterminus eines Proteins die Ge-

schwindigkeit der Ubiquitinylierung zu beeinflussen (Varshavsky, 1992). Zusätzlich sind jedoch Modellsysteme beschrieben, in denen trotz Inhibierung der Ubiquitinylierung MHC-I Liganden präsentiert werden. Dies wird durch Inhibition des Proteasoms vollständig unterbunden (Michalek et al., 1996). Es ist daher möglich, dass die Ubiquitinylierung, zumindest für manche Proteine, den Abbau durch das Proteasom lediglich beschleunigt.

Das Proteasom:

Der 26S-Proteasomkomplex (S = Svedberg-Konstante) besteht aus der zylindrischen, fassartigen Struktur des 20S Proteasoms, dem an beiden Enden eine 19S-Kappe aufgesetzt ist. Das Kernstück, das proteolytisch aktive 20S Proteasom, setzt sich aus 4 aufeinanderliegenden Ringen à 7 Untereinheiten zusammen, wobei zwei äußere Ringe aus α-Untereinheiten zwei innere mit β-Untereinheiten flankieren. Der Eingang der gebildeten „Röhre“ ist so klein, dass nur entfaltete Proteine hindurchtreten können. Jeweils drei Untereinheiten der zentralen β-Ringe haben proteolytisch aktive Zentren. In ihrer Eigenschaft als Threonin-Proteasen sind sie im Organismus einzigartig (Seemuller et al., 1995). Irreversible Inhibitoren des Proteasoms wie Lactazystin modifizieren dieses zentrale Threonin (Fenteany et al., 1995). Die dem 20S-Proteasom an einem oder beiden Enden aufgesetzte 19S-Kappe besitzt eine Bindungsstelle für Polyubiquitin-Ketten und ist somit entscheidend für die Degradation Ubiquitin-markierter Proteine. Durch eine eigene Isopeptidase wird die Ubiquitin-Kette abgebaut und Ubiquitin für die Wiederverwendung freigesetzt. Die Bindung der 19S-Kappe an das 20S Proteasom ist ATP-abhängig.
Unter Einfluß von Interferon-γ können die proteolytischen Untereinheiten des 20S-Proteasoms gegen drei andere Threonin-Proteasen (LMP2, LMP7, MECL1) ausgetauscht werden, die sich in Kinetik und Substratspezifität von den konstitutiv exprimierten unterscheiden. Die Gene für LMP2 und LMP7 befinden sich im MHC-Genkomplex in direkter Nachbarschaft zu TAP. Aufgrund dieser Tatsache wurde eine Verbindung zur Antigenprozessierung angenommen und die IFN-γ induzierbare Variante des 20S Proteasoms „Immunoproteasom“ genannt. Tatsächlich ändern die LMP-Untereinheiten die Degradationsrate des Proteasoms nicht (Gaczynska et al., 1993), jedoch ist eine er-

höhte tryptische und chymotryptische Aktivität sowie eine Zunahme von Peptiden mit hydrophoben Carboxylenden nachweisbar (Cardozo and Kohanski, 1998). Zudem besitzen LMP7$^{-/-}$- sowie LMP2$^{-/-}$-Mäuse Defekte in der Präsentation bestimmter, zum Teil viraler Antigene (Fehling et al., 1994; Sibille et al., 1995). Wahrscheinlich erhöhen die Untereinheiten die Häufigkeit bestimmter Schnittstellen, so dass mehr potentielle MHC-I Liganden produziert werden (Rock and Goldberg, 1999).

Ebenfalls durch IFN-γ induzierbar ist PA28 (proteasom activator, 11S), eine konische Struktur, die wie die 19S-Kappe dem 20S Proteasom an beiden Enden aufsitzen kann. PA28 besitzt einen zentralen Kanal, durch den Substrate in das Proteasom eintreten oder Peptide dieses verlassen. Mit der α-Untereinheit von PA28 transfizierte Zellen zeigen eine gesteigerte MHC-I Präsentation, so dass zusammen mit der Induzierbarkeit durch IFN-γ von einer Rolle von PA28 in der effektiven Produktion von MHC-I Liganden ausgegangen wird (Groettrup et al., 1996). Die Degradationsrate des Proteasoms wird jedoch auch durch PA28 nicht erhöht, jedoch kommt es zu einer Konformationsänderung des Substrats, die den gleichzeitigen Abbau durch zwei Proteaseuntereinheiten möglich macht (Groettrup et al., 1996).

Das Proteasom produziert sowohl fertige MHC-I Epitope als auch Peptide, die lediglich den korrekten C-Terminus besitzen und N-terminal weiter prozessiert werden müssen (Rock and Goldberg, 1999; Lucchiari-Hartz et al., 2000). Dies kann im Zytosol wie auch im ER geschehen. Im Zytosol konnten kürzlich eine Aminopeptidase (puromycin-sensitive aminopeptidase) und eine Hydrolase (bleomycin hydrolase) identifiziert werden (Stoltze et al., 2000). Diese Proteasen generierten aus einem N-terminal verlängerten Peptid des VSV-Nukleoproteins (RGYVYQGL) die endgültigen MHC-Epitope.

Der Transport der Peptide ins ER erfolgt mittels TAP, einem dimeren Transporter, der selbst an der Auswahl translozierter Peptide zur Beladung auf MHC-I Molekülen beteiligt ist (Powis et al., 1996). Diese Auswahl erfolgt anhand des Carboxylterminus sowie dreier Aminosäuren des Aminoterminus (Neefjes et al., 1993; van Endert et al., 1995), welche die Affinität des Peptids zu TAP bestimmen. Bevorzugt transportiert werden Peptide von 8-13 AS Länge, die am N-Terminus jedoch Verlängerungen bis zu 40 AS aufweisen können. Dementsprechend wird im ER eine Aminopeptidase erwartet, die den Peptiden ihre endgültige Form verleiht. Kandidaten hierfür sind unter anderem

MHC-I Moleküle selbst, das Chaperon und Hitzeschockprotein Gp96 sowie Tapasin (Lauvau et al., 1999). Der Hauptakzeptor für TAP-translozierte Peptide ist PDI (protein disulfid isomerase), ein Chaperon mit ATPase-Aktivität (Lammert et al., 1997b). Dieses bindet alle ins ER überführten Peptide mit hoher Affinität, unabhängig davon, ob diese auch an MHC-Moleküle binden.
Die Bindung eines Peptids an frisch synthetisierte und durch Chaperone stabilisierte MHC-I Moleküle bewirkt den Transport des fertigen Komplexes über Golgi-Vesikel an die Zelloberfläche.

Alternative MHC-I Prozessierungswege:

Endogene, durch das Proteasom prozessierte Proteine stellen die Hauptquelle für auf MHC-I Molekülen präsentierte Peptide dar. In TAP-defizienten Zellinien ist die Präsentation MHC-I assoziierter Antigene stark abgeschwächt (Hosken and Bevan, 1990). Jedoch sind mindestens zwei weitere, von einander unabhängige Wege beschrieben, die Peptide auf MHC-I Moleküle dirigieren können (Rock, 1996). Der eine Weg umfaßt die Endozytose exogenen Antigens, dessen Prozessierung in Peptide und deren Transport zur Beladung von MHC-I Molekülen ins ER (Day et al., 1997). Der zweite Weg ist ER-unabhängig und bietet Hinweise für die MHC-I Beladung in frühen Endosomen. Durch Experimente mit fluoreszenz-markiertem β_2-Mikroglobulin konnte mit Hilfe konfokaler Mikroskopie die spontane Endozytose von MHC-I Molekülen in B-Zellen beobachtet werden (Chiu et al., 1999). Diese kolokalisierten in frühen Endosomen mit MHC-II Molekülen, fanden sich aber nicht im ER. Der genaue Zeitpunkt der Peptidbindung an derart recyclete MHC-I Moleküle ist jedoch unklar. Außerdem scheint dieser Weg auf Subpopulationen bestimmter Zellarten beschränkt zu sein.

1.3.2 Der klassische MHC-II Prozessierungsweg

Die Aufnahme exogenen Antigens durch professionelle antigenpräsentierende Zellen (APC) erfolgt mittels Phagozytose, Rezeptor-vermittelter Endozytose und Makropino-

zytose (die Aufnahme extrazellulärer Flüssigkeit). Das Antigen gelangt dadurch über frühe und späte Endosomen in Lysosomen, saure Kompartimente mit zunehmend abfallendem pH-Wert, in denen es enzymatisch in Peptide katabolisiert wird. Dies geschieht hauptsächlich durch die Aspartatproteasen Cathepsin D und E sowie durch die Cysteinproteasen Cathepsin B, L, S und H (Watts, 1997). Die Peptide treffen in einem bislang nicht genau lokalisierten (Neefjes, 1999) MHC-II Beladungskompartiment (MIIC (Peters et al., 1991), CIIV (Amigorena et al., 1994; Amigorena et al., 1995)) auf neu synthetisierte MHC-II Moleküle, welche in Vesikeln vom Golgi-Apparat kommend in diese sauren Kompartimente aufgenommen werden. Zusätzlich werden auch MHC-II Moleküle von der Zelloberfläche durch Endozytose recyclet und in diesen Weg der Antigenprozessierung eingeschleußt. Frische MHC-Peptid-Komplexe werden in Vesikeln zur Zelloberfläche transportiert (Wubbolts et al., 1996) und sind dort, abhängig von der Beschaffenheit des Peptids, mehrere Tage lang stabil (Nelson et al., 1994).
Im endoplasmatischen Retikulum formieren sich drei neu synthetisierte αβ-MHC-II Dimere zunächst zusammen mit drei invarianten Ketten (invariant chains, Ii) zu Nonameren. Die invarianten Ketten schützen die Peptidbindungstaschen der MHC-Moleküle mit einer als CLIP (class II associated invariant chain peptide) bezeichneten Region (81-104) (Cresswell, 1996). Die Nonamere werden durch eine Sequenz im zytoplasmatischen Schwanz von Ii in Vesikeln in Richtung Zelloberfläche dirigiert und treffen dabei auf Kompartimente des endosomalen-lysosomalen Prozessierungswegs. Die invariante Kette wird bis auf CLIP durch den sauren pH und endosomale Proteasen abgebaut. Das MHC-kodierte Molekül HLA-DM (Mensch) oder H-2M (Maus) löst CLIP aus den Bindungstaschen und unterstützt zusammen mit dem nicht-klassischen MHC-Molekül HLA-DO dessen Austausch gegen Peptide.

1.3.3 Cross-priming und Cross-presentation

Ursprünglich wurde mit dem Begriff des ‚Cross-primings' die Aktivierung spezifischer CTL einer Empfängermaus durch Minor-H Antigene aus Zellen einer H2-inkompatiblen Spendermaus beschrieben (Bevan, 1976). Der allgemeinere Begriff der ‚Cross presentation' bezieht sich heute auf die alternative Aktivierung (siehe 1.3.1) zytotoxischer T-

Zellen durch zelluläre, exogene Antigene, welche von APC aufgenommen, prozessiert und repräsentiert werden (Heath and Carbone, 1999). Dabei liegt die Bedeutung der ‚Cross presentation' nicht allein im Übertritt exogenen Antigens in den MHC-I Prozessierungsweg, sondern in der Existenz eines eigenen Prozessierungwegs für zelluläre Antigene wie apoptotische Zellen, Exosomen oder Antigenträgerproteine in speziellen APC. Die APC aktiviert die zytotoxische T-Zelle also mit Antigenen, die aus einer anderen Zelle stammen. Dadurch ist sie in der Lage, virusspezifische CTL zu induzieren, ohne selbst infiziert zu sein (Sigal et al., 1999). Für das effektive Priming einer CTL-Immunantwort ist dabei das Zusammenspiel zwischen $CD4^+$ T-Helferzellen (siehe 1.4), $CD8^+$ CTL und APC entscheidend. Die T-Zellaktivierung kann sowohl Effektor-Funktionen (‚cross priming') als auch Toleranz, d.h. die Elimination autoreaktiver T-Zellen (‚cross tolerance'), auslösen (Kurts et al., 1997b; Kurts et al., 1998).

Die Protagonisten des Cross primings sind aus dem Knochenmark stammende professionelle antigenpräsentierende Zellen. Diese exprimieren spezifische Rezeptoren, welche ihnen die Phagozytose apoptotischer Zellen, antigentragender Hitzeschockproteine und anderen zellulären Materials erlauben. Obwohl die genaue Identität der Cross-präsentierenden APC noch unklar ist, sind jedoch dendritische Zellen die potentesten Kandidaten (siehe 1.3.4). Eine essentiel wichtige Funktion phagozytierender Zellen ist die Interpretation des Schweregrades eines Ereignisses, welches zum Gewebsuntergang führt. Über den Integrin-Rezeptor $\alpha v\beta 5$ und den Scavenger-Rezeptor CD36 nehmen DC, anders als Makrophagen, apoptotische Zellen auf (Albert et al., 1998a; Albert et al., 1998b) und präsentieren Antigene dieser Quelle auf MHC-I und MHC-II Molekülen in vitro (Inaba et al., 1998). DC, die mit bestrahlten und dadurch apoptotischen MAGE-3 (einem Tumorantigen) exprimierenden Zellen inkubiert wurden, konnten so in vitro Lymphozyten eines $MAGE\text{-}3^+$ Melanompatienten spezifisch aktivieren (Russo et al., 2000).

DC und Makrophagen besitzen desweiteren einen Rezeptor für Phosphatidylserin (PSR), welches beim apoptotischen Zelluntergang von der Innenseite der Zellmembran nach aussen gelangt. Auf diese Weise sind sie in der Lage, zwischen Zelltod durch Apoptose (im Rahmen des normalen Zelluntergangs) und durch Nekrose (im Rahmen einer Entzündung oder Tumornekrose) zu unterscheiden. Dabei bestimmt das Verhältnis von apoptotischem zu nekrotischem Zelltod die Reaktion der DC sowie der T-Zellen

(Fadok et al., 2000). Die Aufnahme nekrotischer Zellen induziert in DC die Expression kostimulatorischer Moleküle, welche T-Zellen zur Aktivierung brauchen. Werden apoptotische Zellen über den PSR-Rezeptor erkannt und aufgenommen, werden keine kostimulatorischen Moleküle exprimiert. Dagegen führt dies zur Produktion antiinflammatorischer Zytokine wie TGF-β und zur Inaktivierung von T-Zellen. Die Ergebnisse von Fadok et al. werden unterstützt durch die Beobachtung, daß apoptotische Zellen zwar aufgenommen und cross-präsentiert werden, jedoch kein Reifungssignal in DC induzieren. Dies geschieht durch nekrotische Zellen bzw. deren Kulturüberstände (Sauter et al., 2000).

Molekulare Chaperone und Hitzeschockproteine (siehe 1.4), freigesetzt z.B. durch nekrotisierende Zellen (Basu et al., 2000), werden ebenfalls rezeptorvermittelt von DC aufgenommen und induzieren CTL (Arnold et al., 1997; Singh-Jasuja et al., 2000b). Dieser Aspekt wird unter 1.4.3 ausführlich besprochen.

Über die intrazelluläre Prozessierung cross-präsentierter Antigene ist wenig bekannt. In vivo-Experimente belegen die Notwendigkeit von TAP für die effektive CTL-Aktivierung (Huang et al., 1996), was eine zumindet teilweise Nutzung des klassischen MHC-I Prozessierungswegs nahelegt. Im Einklang damit steht die Beschreibung eines bislang unbekannten Endosom-zu-Zytosol Transports in der dendritischen Zellinie D1, der in primären Makrophagenkulturen nicht nachweisbar war (Rodriguez et al., 1999) (Der Übertritt endozytierter Antigene in das Zytosol ist in Makrophagen unter anderen Bedingungen jedoch beobachtet worden (Norbury et al., 1995)). Dieser Transport ist ähnlich Poren oder Kanälen größenselektiv und auf einen noch nicht näher definierten Endosomentyp beschränkt.

Die Sicherstellung von Toleranz gegenüber Selbst-Antigenen, neben der (inkompletten) Selektion im Thymus, wurde auch durch den Nachweis CD95-vermittelter Deletion (Apoptose) autoreaktiver T-Zellen in der Peripherie durch Cross presentation gezeigt (Kurts et al., 1998). Naive CTL wandern aus dem Thymus direkt in periphere Lymphknoten aus, so daß sie mit ausschließlich in peripherem Gewebe vorkommenden Autoantigenen nicht in Kontakt kommen. Dazu zählt z.B. das Gewebe des Pankreas. In transgenen Mäusen, welche durch einen speziellen Promotor (RIP, rat insulin promotor) membranständiges Ovalbumin ausschließlich in Niere, β-Zellen des Pankreas, Thymus und Testes exprimieren, präsentieren APC Ovalbumin-Epitope in den abführenden

Lymphknoten dieser Organe (Kurts et al., 1997a). Adoptiv in diese Mäuse transferierte, syngene Ovalbumin-spezifische CTL werden dadurch aktiviert und eliminiert. Dieses als AICD (activation induced cell death) bezeichnete Phänomen wird in diesem Fall als Apoptose-Signal durch CD95 vermittelt, dessen Rolle bei der Elimination autoreaktiver T-Helferzellen und B-Zellen ebenfalls beschrieben wurde (Singer and Abbas, 1994). CD95 defiziente CTL dagegen entgehen der Elimination.

1.3.4 Dendritische Zellen (DC)

Dendritische Zellen nehmen als die „mobilen Wächter" des Immunsystems (Banchereau and Steinman, 1998) eine Sonderstellung als Mittler zwischen erworbener und adaptiver Immunität ein. Lokalisiert in großer Zahl und Spezifizierung in nahezu jedem Gewebe des Organismus (ca. 10^9 Langerhans-Zellen befinden sich allein in der Epidermis) sind DC die potentesten antigenpräsentierenden Zellen. T-Lymphozyten zeichnen sich zwar durch Spezifität aus. Jedoch ist die Wahrscheinlichkeit, daß ein im Blut zirkulierender spezifischer T-Zellklon allein das zu ihm passende Antigen unter der Masse an im Organismus vorhandenen Antigenen findet, extrem gering. Dazu kommt, daß Tumorzellen und virusinfizierte Zellen effiziente Wege entwickelt haben, sich dem Immunsystem zu entziehen. Hierzu gehört die Herunterregulierung von MHC-Molekülen oder die Produktion von Proteinen, welche nicht durch das Proteasom prozessierbar sind (z.B. EBNA1 in Epstein-Barr Virus-infizierten Zellen). DC nehmen in der Peripherie Antigene auf, reifen dadurch, wandern zu den ableitenden Lymphknoten und präsentieren dort in konzentrierter Form T-Zellen prozessierte Antigene. Gleichzeitig kontrollieren und modulieren sie alle an der Immunantwort beteiligten Zellen. DC durchlaufen drei funktionell für die Immunantwort essentielle Entwicklungsstadien, in denen sie als DC-Vorläufer, unreife und reife DC bezeichnet werden.

Dendritische Zellen entwickeln sich im Menschen aus $CD34^+$ Stammzellen der myeloiden und der lymphoiden Reihe. Auch in der Maus werden sowohl myeloide als auch lymphoide DC-Vorläufer gefunden. Beide lassen sich anhand bestimmter Oberflächenmarker, ihrer Funktionen und anatomischen Lokalisationen unterscheiden. Humane myeloide DC-Vorläufer exprimieren CD14 und CD11c. Unter dem Einfluß von GM-CSF

und IL-4 differenzieren sie in unreife DC. Ein weiterer myeloider DC-Vorläufer ist $CD14^-$ und $CD11c^+$. Die Kombination von GM-CSF, IL-4 und TGF-β bewirkt hier die Differenzierung in Langerhans-Zellen der Haut. Lymphoide humane DC scheinen sensibel gegenüber IL-3 zu sein, dessen Rezeptor sie tragen. Funktionell bestehen zwischen den einzelnen DC-Populationen große Unterschiede in Hinblick auf die von ihnen ausgelöste Immunantwort (z.B. Th_1 oder Th_2) (Banchereau et al., 2000). DC-Vorläufer gehören funktionell zum angeborenen Immunsystem. Sie besitzen pattern recognition receptors, mit denen sie Tumorzellen, virusinfizierte Zellen sowie bakterielle DNA und andere PAMP (pathogen associated molecular patterns) erkennen können. Dies führt über die Produktion von IFN-α, TNF und IL-1 zur Aktivierung von NK-Zellen und Makrophagen.

Unreife DC sind Spezialisten der Antigenaufnahme. Gewebsständig vorhanden in zahlreichen Subpopulationen an allen erregerexponierten Stellen des Organismus exprimieren sie zum einen Endozytose-Rezeptoren (F_c- und F_ε-Rezeptoren, DEC-205, Mannose-Rezeptor) zur Erkennung von Antikörpern und opsonisierten Partikeln (Jiang et al., 1995). Zum anderen besitzen sie mit der Fähigkeit zur Makropinozytose einen nichtsättigbaren Mechanismus zur Aufnahme löslichen Antigens (Sallusto et al., 1995). Die Phagozytose bakterieller Antigene (Leishmania major, Bacillus Calmette-Guerin (Mykobakterien)) ist ebenfalls beschrieben (Inaba et al., 1993; Moll et al., 1993). Dabei ist die Formation von MHC-Peptid-Komplexen aus phagozytiertem Material wesentlich effektiver als die Verarbeitung experimentell vorprozessierter Peptide (Inaba et al., 1998). Die Endozytose apoptotischer Zellreste mittels αvβ5, CD36 und PSR wurde im Rahmen des Cross priming besprochen (siehe 1.3.3). Die Fähigkeit der DC, T-Zellen zu aktivieren, ist im unreifen Stadium durch die niedrige Expression kostimulatorischer Moleküle (CD40, CD54, CD25, CD80, CD86) gering (Sallusto and Lanzavecchia, 1994).

Aufgenommene Strukturen werden intrazellulär direkt in saure Kompartimente des endosomalen-lysosomalen Prozessierungsweges (MIIC) überführt. Diese sind reich an MHC-II Molekülen, HLA-DM (bzw. H-2M), Cathepsin D und S sowie LAMP-1 (lysosomal-associated membrane protein-1) (Nijman et al., 1995). Aktuelle Arbeiten mit einem fluoreszensmarkierten Antikörper, der ein Peptid aus HEL (hen egg-white lysozyme 46-61) in Verbindung mit MHC-II erkennt, konnten Licht auf die Gesetzmäßig-

keiten der Beladung von MHC-II Molekülen mit Peptiden in diesen Kompartimenten werfen. Im unreifen Zustand arretierte DC sind trotz Kolokalisation von Peptid und MHC-II zu dieser Beladung nicht in der Lage (Inaba et al., 2000). Sie bewahren die Antigene jedoch, zumindest in vitro, mehrere Tage lang auf (Turley et al., 2000). Erst die Stimulation mit CD40 Ligand, TNF-α oder LPS, den klassischen Reifungssignalen für DC, führt zur Formierung von TCR-Liganden, so daß dieser Schritt auf die Reifung der DC abgestimmt zu sein scheint. Im Verlauf der Reifung werden die Kompartimente zu nicht-lysosomalen Zwischenstufen (CIIV (Amigorena et al., 1994)), die kein LAMP und H-2M mehr enthalten (Turley et al., 2000). Dagegen nehmen sie MHC-I und das kostimulatorische Molekül B7.2 (CD86) auf, welche im ER auf den Reifungsstimulus der DC warten. Selbst auf der Zelloberfläche bleibt die Kolokalisation von MHC-I, -II und B7.2 erhalten. Neben diesem intrazellulären Prozessierungsweg für Antigene scheint auch eine extrazelluläre Prozessierung möglich zu sein. Auf der Zelloberfläche dendritischer Zellen wurden reichlich leere MHC-II Moleküle gefunden, die im Gegensatz zu leeren MHC-I Molekülen stabiler sind (Santambrogio et al., 1999b). DC sezernieren und exprimieren Proteasen, die im extrazellulären Milieu zur Generierung von immundominanten Peptiden in der Lage sind. Da sich auch HLA-DM bzw. H-2M auf der Zelloberfläche befindet, ist so die direkte Formierung von MHC-Peptid-Komplexen möglich (Santambrogio et al., 1999a).

Die DC-Reifung wird durch Antigene, Zytokine und andere signalvermittelnde Moleküle wie CD40 Ligand, LPS oder TNFα induziert. Sie geht mit der Abnahme der Endozytose-/Phagozytose-Fähigkeit, der chemokinvermittelten Wanderung zu Lymphknoten und Milz, morphologischen Veränderungen und der Expression kostimulatorischer Moleküle einher. Reife DC sind hochspezialisierte T-Zellaktivatoren. Im klassischen Modellversuch der Transplantatabstoßung, der gemischten Leukozytenreaktion (mixed leukocyte reaction, MLR), werden normalerweise gleiche Mengen Donor- und Akzeptorleukozyten gemischt und die CTL-Proliferation gemessen. Eine DC reicht dabei jedoch aus, 100-3000 T-Zellen zu aktivieren (Banchereau and Steinman, 1998). Innerhalb eines Tages präsentieren DC hohe MHC-Konzentrationen, Adhäsions- und Signalmoleküle wie LFA-3 (CD58), ICAM-1 (CD54), RANK und B7.2 (CD86) und sezernieren, neben Chemokinen wie IL-8 und MIP-1α/β, das inflammatorische Zytokin IL-12. IL-12 wirkt auf NK-Zellen der erworbenen Immunität ebenso wie auf T- und B-Zellen. In Kombina-

tion mit MHC-II führt es zur Ausbildung IFN-γ produzierender Th_1-Zellen. Über IL-4 können DC aber auch IL-5 sezernierende Th_2-Zellen induzieren.
Die außergewöhnlich starke T-Zellaktivierung durch DC basiert unter anderem auf einer DC-spezifischen Kommunikation mit T-Zellen. Ruhende T-Lymphozyten exprimieren das Adhäsionsmolekül ICAM-3. Als Ligand wurde kürzlich ein Typ II Membranprotein mit einer Mannose-bindenden Lectindomäne identifiziert (Geijtenbeek et al., 2000b). Dieses als DC-SIGN (*DC*-*s*pecific, *I*CAM-3 *g*rabbing, *n*on-integrin) bezeichnete Molekül wurde ursprünglich durch seine Fähigkeit entdeckt, die Glykan-reiche Hülle des HI-Virus 1 zu binden. Da auch unreife DC DC-SIGN exprimieren, wird angenommen, daß der initiale, eher lockere Kontakt zwischen T-Zelle und DC über diesen Weg erfolgt. Durch die Expression kostimulatorischer Moleküle reifer DC zusammen mit MHC-I /-II bildet sich dann ein geschützter Bereich der Kommunikation aus, eine „immunologische Synapse“ (Steinman, 2000). Pathologischer Nachteil von DC-SIGN ist seine Bindung von HIV-1, das auf diese Weise an T-Helferzellen weitervermittelt wird, ohne DC selbst zu infizieren (Geijtenbeek et al., 2000a).

1.4 Molekulare Chaperone und Hitzeschockproteine

1.4.1 Molekulare Chaperone, Proteinfaltung und die Stressantwort

Im Rahmen der Translation werden Proteine von Ribosomen in ihrer Primärstruktur als Aminosäureketten produziert. Die anschließende Faltung zum fertigen, funktionellen Protein wird überwacht und unterstützt durch molekulare Chaperone (Chaperon (*engl.*) = „Anstandsdame“). Diese umfassen mehrere, in der Evolution hochkonservierte Proteinfamilien sowohl im Zytosol, als auch im endoplasmatischen Retikulum und in Mitochondrien. Neben ihrer Rolle in der Proteinfaltung binden und stabilisieren sie instabile Konformationen anderer zellulärer Proteine und führen sie ihrer korrekten Bestimmung (Transport in ein subzelluläres Kompartiment, Degradation, etc.) zu (Hartl, 1996). Chaperone sind mit 1-2% die häufigsten zellulären Proteine (Csermely et al., 1998). Viele Chaperone sind zudem stressinduzierbar. Jegliche Situation, die für eine Zelle Stress bedeutet (Glukosemangel, Hitze, Virusinfektion, etc.), bedroht die korrekte Funktion

zellulärer Mechanismen und kann zur Denaturierung oder Degradation von Polypeptiden führen. Sofort wird daher die Produktion der Chaperone als Wächter und Helfer des Proteinmetabolismus erhöht, so daß sie auch als Hitzeschockproteine (Hsp) oder Stressproteine bezeichnet werden (Lindquist, 1986). Am besten untersucht und immunologisch relevant sind die Hsp70-Familie, die Chaperonin-Familie um Hsp60 und die Hsp90-Familie.

Mitglieder der Hsp70-Familie, eine Gruppe von ATPasen eines Molekulargewichts von ca. 70 kD, finden sich in fast allen Zellkompartimenten. Es existieren im Zytosol eine konstitutive Form, Hsc70 (Hsc73), sowie eine induzierbare Form, Hsp70 (Hsp72). Im ER residiert das Homolog BiP (binding protein), im Mitochondrium (mitochondriales) mHsp70 (grp75) (Flynn et al., 1989). Ihre intrazellulären Aufgaben resultieren aus der ATP-abhängigen Bindung hydrophober Segmente ungefalteter Polypeptide und umfassen die *de novo* Proteinfaltung, den Transmembrantransport, die Degradation mißgefalteter Proteine und andere regulative Prozesse (Hartl, 1996). Für ihre Aufgaben benötigen sie die Mitwirkung anderer Proteine: Hsp40 im Menschen bzw. DnaJ in Bakterien katalysieren die Hydrolyse von ATP; Hip stabilisiert die ADP-Form von Hsp70; Bag1 ist am Nukleotidaustausch beteiligt (Caplan, 1999). Hsp70 und sein bakterielles Homolog DnaK bestehen aus einer N-terminalen ATPase-Domäne (~45kD), einer Peptidbindungsstelle (~18kD) und einer variablen Region (~10kD). Die peptidbindende Domäne formt mit zwei antiparalellen β-Faltblattstrukturen und einer α-Helix als Deckel eine Röhre (Morshauser et al., 1995). Die Hydrolyse von ATP zu ADP führt zu einer Konformationsänderung, die das Substrat festhält. Erneute ATP-Bindung an DnaK/Hsp70 gibt es wieder frei (Schmid et al., 1994). Die Hsp70-Moleküle der verschiedenen Zellkompartimente besitzen bestimmte Peptidbindungspräferenzen. Allgemein werden hydrophobe Peptidsequenzen bevorzugt, die im ungefalteten Protein frei zugänglich sind. Da sie im nativen Zustand im hydrophoben Zentrum des Proteins verborgen sind, wird so die selektive Hsp70-Bindung ungefalteter Proteine gewährleistet.

Eine weitere Gruppe von Chaperonen, die Hsp60-Familie, ist essentiel an der ATP-abhängigen Proteinfaltung unter normalen und stressinduzierten Bedingungen beteiligt. Hsp60 befindet sich im Mitochondrium eukaryotischer Zellen, in das es durch eine ami-

noterminale Signalsequenz gelangt (Itoh et al., 1995). Zusätzlich wird Hsp60 auf der Zelloberfläche verschiedener Zelltypen gefunden (Soltys and Gupta, 1997; Xu et al., 1994). Am besten untersucht sind derzeit GroEL, sein Homolog in Escherichia coli, und dessen Kofaktor GroES. Die Röntgenkristallstruktur von GroEL zeigte, daß es sich um einen zylindrischen Komplex aus zwei aufeinander liegenden heptameren Ringen (à 57kD) handelt, in dessen ~50Å weiten Zentrum die Peptidbindungsstelle liegt (Braig et al., 1994). GroES hat eine Hauben- oder Dom-ähnliche Form, mit dessen Basis es an GroEL andocken kann (Hunt et al., 1996). GroEL bindet wie Hsp70 bevorzugt hydrophobe Peptidsequenzen mit positiv geladenen Aminosäuren (Hayer-Hartl et al., 1994).

Die Hsp90-Familie umfaßt das zytosolische Hsp90 mit einer konstitutiven β- und einer induzierbaren α-Form sowie sein ER-Homolog grp94 (Gp96). Es handelt sich bei Hsp90 um C-terminal verbundene Dimere mit einer N-terminalen Bindungsstelle für Nukleotide und das Zytostatikum Geldanamycin (Prodromou et al., 1997). Eine Peptidbindungsstelle befindet sich sowohl am N-Terminus als auch am C-Terminus (Scheibel et al., 1998). Experimente in Hefen mit mutierten Hsp90-Aminotermini belegen, daß die ATPase-Aktivität für die N-terminale Peptidbindung und die physiologischen Funktionen notwendig ist (Panaretou et al., 1998). Die generelle Beteiligung von Hsp90 an der Proteinfaltung ist nicht eindeutig geklärt. Hsp90 ist nicht an der *de novo* Synthese von Proteinen beteiligt. Es verhindert jedoch die Aggregation denaturierter Proteine und unterstützt die Reifung, den intrazellulären Transport und die Regulierung von Proteinkinasen, Steroidhormon-Rezeptoren, der NO-Synthase und der Telomerase (Caplan, 1999; Mayer and Bukau, 1999). Auch die Reifung und Stabilität des CFTR-Chloridkanals, mutiert im Rahmen der zystischen Fibrose, ist Hsp90-abhängig. Wie Hsp70 assoziiert Hsp90 mit Co-Chaperonen: Hop vermittelt die Interaktion von Hsp90 und Hsp70; p23 stabilisiert Hsp90 und sein Substrat. Dabei bilden sich funktionell verschiedene Komplexe (der Hsp90-Hop-Hsp70-Hip-Komplex sowie der Hsp90-p23-Komplex), deren genaues zeitliches Zusammenspiel jedoch noch nicht vollständig geklärt ist (Pearl and Prodromou, 2000).
Gp96 wird mit einer aminoterminalen Signalsequenz synthetisiert, welche das Protein ins Lumen des ER dirigiert, und trägt am C-Terminus eine ER-Retentionssequenz (KDEL). Geringe Mengen Gp96 werden zudem phylogenetisch konserviert auf Ober-

flächen von Tumor- und nichttransformierten Zellen gefunden (Robert et al., 1999). Im Rahmen der Proteinfaltung scheint Gp96 mit späten Zwischenstufen ungefalteter Proteine zu assoziieren. Immunologisch bedeutsam ist jedoch besonders die Bindung von Peptiden im endoplasmatischen Retikulum. Gp96 gilt dabei (neben PDI und Calreticulin) als Peptidakzeptor TAP-translozierter Peptide, bindet darüberhinaus aber auch andere ER-Peptide (Lammert et al., 1997a; Arnold et al., 1997). Eine direkte, essentielle Beteiligung von Gp96 an der Beladung von MHC-I Molekülen erscheint jedoch unwahrscheinlich, da die Antigenpräsentation von Zellen, deren Gp96-Expressionslevel künstlich niedrig gehalten wird, nicht verändert ist (Lammert et al., 1996). Während PDI mit allen Peptiden assoziiert, zeigt Gp96 eine Präferenz für nicht-geladene Aminosäuren an den Positionen 2 und 9 in 9-AS-Peptiden (Spee and Neefjes, 1997). Struktur und Peptidbindung von Gp96 ähneln seinem Homolog Hsp90. Gp96 liegt für die Peptidbindung als Dimer vor und bindet Peptide in einer hydrophoben Tasche (Nicchitta, 1998; Sastry and Linderoth, 1999; Linderoth et al., 2000). Durch Erhitzen auf 50 °C oder chemisch durch bis-ANS (1,1'-bis(4-Anilino-5-Naphtalensulfonsäure)) wird eine Konformationsänderung induziert, die die Bindungsaktivität erhöht (Wassenberg et al., 2000). ATP bindet Gp96 nur mit sehr geringer Affinität und hat, anders als bei Hsp70, keinen direkten Einfluß auf die Peptidbindung (Wearsch and Nicchitta, 1997).

Funktionell wird zunehmend deutlich, daß die einzelnen Chaperone im Rahmen der Proteinfaltung kooperieren und bestimmte Zwischenschritte überwachen. Das Chaperon TF (Trigger factor) in E.coli z.B. assoziiert mit Ribosomen und nimmt nahezu alle neu synthetisierten Proteine in Empfang. TF kooperiert mit DnaK als zweitem Akzeptor werdender Proteine. Proteine, die leicht aggregieren und sich nur langsam falten, werden an den schützenden Käfig von GroEL und GroES weitergereicht. Auch die Interaktion von Hsp70 und Hsp90 während der Faltung hormonbindender Domänen der Progesteron- und Glukokortikoidrezeptoren benötigt mindestens die Proteine Hsp90, Hop, DnaK/Hsp70, p23 und DnaJ/Hsp40 (Caplan, 1999).

Im Menschen ist die Aggregation mißgefalteter Proteine und ihre fehlende Degradation unter anderem Ursache der Parkinsonschen Erkrankung (intrazelluläre Ablagerung von α-synuclein) sowie der spongiformen Enzephalopathien (Kuru, Jakob-Creutzfeld-Erkrankung, etc). Bei den Letzteren führt nach der „protein-only" Hypothese (Alper et al., 1967) eine Konformationsänderung im normalen zellulären Prionprotein (PrP^C) zu

einer β-Faltblatt-reichen, unlöslichen, jedoch chemisch identischen „scrapie“-Form (PrP^{Sc}), welche intrazellulär akkumuliert. Diese Strukturänderung wird einem putativen „protein X“, möglicherweise ein Chaperon, zugeschrieben (Prusiner, 1998; Zahn et al., 2000).

1.4.2 Immunogene Eigenschaften von Hitzeschockproteinen

Bestrahlte Zellen eines Tumors lösen, in Mäuse gespritzt, eine spezifische Immunität gegenüber Zellen dieses Tumors aus, jedoch nicht gegenüber anderen Tumoren desselben Typs. Die Tumorzellen besitzen folglich individuelle Marker, die jedem Tumor immunogene Eigenschaften im eigenen (syngenen) Organismus verleihen. Auf der Suche nach Immunogenitätskriterien für Tumorzellen stießen Srivastava et al. durch Fraktionierung immunisierender Tumorzellpräparate auf die Hitzeschockproteine Hsp70, Hsp90, und Gp96 (Srivastava et al., 1986; Srivastava et al., 1998). Später wurde die Gruppe um Calreticulin, Hsp110 und grp170 erweitert (Basu and Srivastava, 1999; Wang et al., 2001). Diese lösen eine spezifische CTL-vermittelte Immunantwort in den tumortragenden Mäusen aus, aus deren (autologen) Tumoren sie isoliert wurden (Udono et al., 1994). Eine derartige Immuntherapie bzw. Vakzinierung bei Tumoren unterschiedlichen Ursprungs (chemisch oder physikalisch induziert) führt zu Tumorimmunität, verlangsamtem Tumorwachstum bestehender Tumoren, Rückgang von Metastasen sowie zu einer verlängerten Überlebenszeit (Tamura et al., 1997). Die Tatsache, daß normalerweise intrazelluläres Gp96, Hsp70 und Hsp90 von nekrotischen, nicht jedoch von apoptotischen Zellen freigesetzt wird, verleiht der beobachteten immunisierenden Hsp-Wirkung zusätzlich eine physiologische Bedeutung (Basu et al., 2000) (siehe 1.4.3).

Das skizzierte Phänomen der Immunogenität extrazellulärer Hitzeschockproteine wird derzeit auf vier Punkte zurückgeführt. Diese umfassen ihre Fähigkeit, als Chaperone Peptide zu binden, die rezeptorvermittelte Endozytose durch antigenpräsentierende Zellen, deren Stimulation zur Zytokinproduktion sowie die Reifung dendritischer Zellen durch Hsp-Bindung (Singh-Jasuja et al., 2001; Basu and Srivastava, 2000).

Peptidbindung und Immunogenität:

Hitzeschockproteine sind monomorph kodiert, so daß ihre Immunogenität nicht auf unterschiedliche Hsp-Varianten zurückzuführen ist. Im Einklang damit induzieren Hsp-Präparationen aus gesundem Gewebe im Ursprungs-Organismus keine spezifische Immunantwort (Udono and Srivastava, 1993; Peng et al., 1997). Tumorspezifische Mutationen in Hsp90 und Gp96 cDNAs wurden ebenfalls nicht gefunden (Srivastava and Maki, 1991). Vielmehr konnten die von Hsp gebundenen Peptide in mehreren unabhängigen Experimenten als Mediatoren der spezifischen Immunität identifiziert werden: Hsp70-Präparationen, deren Peptide durch ATP-Behandlung entfernt werden, sind nicht mehr immunogen (Udono and Srivastava, 1993). Gp96-Präparationen aus Zellen, die mit dem β-Galactosidase-Gen (β-gal) transfiziert sind, induzieren die Aktivierung von CTL spezifisch für ein L^d-restringiertes β-gal-Epitop. Dagegen ist Gp96 der identischen, jedoch nichttransfizierten Zellen unwirksam (Arnold et al., 1995). Diese CTL-Induktion ist außerdem unabhängig vom Haplotyp der Zellen, aus denen Gp96 isoliert wird. Im klassischen Cross-priming Experiment lösen Gp96-Präparationen aus Zellen eines Haplotyps in Mäusen eines anderen Haplotyps CTL-Antworten gegen Minor-H Antigene aus (Arnold et al., 1995). Ähnliche Beobachtungen konnten über die Induktion von Tumorimmunität hinaus auch bei Hsp-Präparationen aus virusinfizierten Zellen gemacht werden. Gp96 aus VSV (vesicular stomatitis virus)-infizierten EL4-Zellen induziert VSV8 (RGYVYQGL, 52-59)-spezifische CTL (Nieland et al., 1996). Vergleichbare Experimente liegen mit Hsp70 und Gp96 zu SV40-transformierten Zellen (Blachere et al., 1993), im Influenza-System (Heikema et al., 1997) sowie mit LCMV-Epitopen (Ciupitu et al., 1998) vor. Darüber hinaus erlangen ex-vivo mit Epitopen und Präkursoren rekonstituierte Hsp70- und Gp96-Moleküle sowie Hybridpeptid-Hsp70 Komplexe ebenfalls spezifische, zum Teil verstärkte immunogene Wirkung (Blachere et al., 1997; Moroi et al., 2000). Dies trifft weder für die Peptide allein noch für „leere“ Hsp zu.
Die beschriebenen Hsp binden durch ihre intrazellulären Funktionen im MHC-Prozessierungsweg ein großes Repertoire an Peptiden aus dem Proteinmetabolismus ihrer Zelle. Sie werden dadurch im extrazellulären Milieu zu Botschaftern aus Krisengebieten des Körpers, für die das Immunsystem ein hochsensitives Gehör besitzt.

Rezeptorvermittelte Endozytose von Hsp:

Die Induktion MHC-I restringierter T-Zellantworten durch exogene Antigene weist auf die Notwendigkeit antigenpräsentierender Zellen in diesem Zusammenhang hin. Die an Hsp-Moleküle gebundene Peptidmenge wird mit 1-2 ng als sehr gering angenommen (Blachere et al., 1997). Da trotz dieser geringen Antigenmenge effiziente T-Zellantworten induziert werden, wurden spezifische endozytotische Rezeptoren für Hsp auf APC postuliert (Srivastava et al., 1994), für die es früh erste Hinweise gab: Das ER-ständige peptidbindende Chaperon Calreticulin besitzt wie Gp96 immunogene Wirkung. Dagegen sind Immunisierungen mit PDI, dem Hauptakzeptor TAP-translozierter Peptide, bislang nicht gelungen (Nair et al., 1999). Untersuchungen an Makrophagen zeigten zudem, daß lediglich eine Subpopulation von Makrophagen in der Lage ist, Hsp-Peptid-Komplexe effektiv zu repräsentieren. Diese Beobachtungen deuten auf die selektive Expression eines oder mehrerer Hsp-Rezeptoren hin. Ihre Notwendigkeit für die Cross-Präsentation konnte kürzlich nachgewiesen werden (Singh-Jasuja et al., 2000b).
Bislang wurde zunächst die Existenz mindestens eines Endozytose-Rezeptors für Gp96 gezeigt und mit CD91 ein solcher identifiziert. In Experimenten mit Gold-markiertem Gp96 und Hsp70 wurde im Elektronenmikroskop eine Bindung der Hsp an Clathrin-reiche Oberflächenregionen (Clathrin-coated pits) von Makrophagen und Monozyten beobachtet (Arnold-Schild et al., 1999). Der eindeutige Rezeptor-Nachweis gelang mit fluoreszenzmarkiertem Gp96 (Gp96-FITC). Dabei konnte spezifische Gp96-Bindung auf B-Zellen, Monozyten und Makrophagen, nicht jedoch auf T-Zellen gezeigt werden. Diese Bindung läßt sich sättigen und mit unmarkiertem Gp96 kompetitieren (Singh-Jasuja et al., 2000b). Während der Endozytose des markierten Gp96 kolokalisiert dieses außerdem mit MHC-I und -II Molekülen, ein erster Hinweis auf das weitere Schicksal der Peptide. Durch Verbindung von Gp96 mit seinem Rezeptor mittels eines photoreaktiven Crosslinkers konnte kürzlich CD91, bislang nur als Rezeptor für α2-Makroglobulin und LDL (low-density lipoprotein) bekannt, auch als erster Gp96-Rezeptor auf Makrophagen identifiziert werden (Binder et al., 2000b). Die Cross-Präsentation Gp96-assoziierter Peptide ist dementsprechend durch α2-Makroglobulin oder anti-CD91 Antikörper kompetitierbar.

Ähnlich wie für Gp96 ist auch die rezeptorvermittelte Endozytose von Hsp70 gezeigt worden (Castellino et al., 2000). Abhängig von der Sequenz des gebundenen Peptids verfolgt Hsp70 dabei einen Weg in Endosomen oder durch das Zytosol. Besitzt das Peptid bereits die exakte Länge für die Beladung von MHC-I Molekülen, verbleibt Hsp70 in Endosomen. C-terminal verlängerte Peptide werden ins Zytosol abgegeben und gelangen über das Proteasom und TAP in den MHC-I Präsentationsweg.

Hsp-vermittelte Zytokinproduktion und DC-Reifung:

Hitzeschockproteine als hochkonservierte und phylogenetisch alte Moleküle sind neben ihrer Rolle in der spezifischen, adaptiven Immunität wichtige Mediatoren des angeborenen Immunsystems. Mit dieser Doppelrolle fungieren sie, zusammen mit und ähnlich wie dendritische Zellen (1.3.4), als Mittler zwischen den beiden Säulen der Immunantwort. Essentiel für die Induktion spezifischer T-Zellantworten sind neben der korrekten Antigenpräsentation die Expression kostimulatorischer Moleküle sowie die Zellkommunikation durch Zytokine. Beide Signale können durch Hsp vermittelt werden.
Die Zytokininduktion durch Hsp70 erfolgt über zwei Mechanismen unter der Verwendung von intrazellulärem Calcium und der Aktivierung von NF-κB. Durch Bindung an CD14 bewirkt Hsp70 in humanen Monozyten die Produktion der pro-inflammatorischen Zytokine IL-1β, IL-6 und TNF-α. CD14-unabhängig erfolgt zusätzlich die Sekretion von TNF-α, so daß mit CD14 zunächst nur ein Korezeptor für Hsp70 identifiziert ist (Asea et al., 2000). Die erhöhte Konzentration von Antikörpern gegen Hsc70 im Blut von SLE-Patienten (systemischer Lupus erythematodes) weist auf die Bedeutung extrazellulären Hsp70 hin (Minota et al., 1988).
Hsp60 besitzt keine immunisierenden, jedoch wichtige unspezifische Eigenschaften. Unter Stressbedingungen exprimieren Endothelzellen der Aorta Hsp60 auf ihrer Oberfläche (Xu et al., 1994), konstitutiv wird es unter anderem auf Makrophagen und transformierten $CD4^+$ T-Zellinien gefunden (Soltys and Gupta, 1997). Durch Bindung an CD14 und Tlr4 vermittelt extrazelluläres Hsp60 die Produktion von IL-6, TNF-α und NO (Stickstoffmonoxid) durch humane Monozyten und Makrophagen (Ohashi et al., 2000; Kol et al., 2000). Humanes wie auch chlamydiales Hsp60 induziert die Expression von Adhäsionsmolekülen und Zytokinen (IL-6, TNF-α) in Gefäßendothelien und

glatter Muskulatur ähnlich einem LPS-Effekt, so daß ihm die Rolle eines Gefahrensignalvermittlers zugesprochen wird (Kol et al., 1999; Chen et al., 1999). Zusätzlich zu den genannten Zytokinen bewirkt humanes Hsp60 die Sekretion von IL-12 und IL-15, die die Differenzierung einer Th_1-Antwort begünstigen. Durch seine hohe Konservierung spielt Hsp60 zudem eine wichtige Rolle in der Pathogenese von Autoimmunkrankheiten wie Diabetes mellitus und Arthritis. Kreuzreagierende T-Zellklone gegen bakterielle und humane Hsp60-Epitope werden als Vermittler von sowohl Schutz und Toleranz als auch Autoreaktivität gesehen (Birk et al., 1996).

Für Gp96 ist bislang kein signalvermittelnder Rezeptor bekannt. Die direkte Beteiligung von CD91 an einer Signalkaskade ist unwahrscheinlich, da CD91 eine signalvermittelnde zytoplasmatische Domäne fehlt (Singh-Jasuja et al., 2001). Gp96 induziert jedoch die NF-κB-vermittelte Zytokinproduktion und die Reifung dendritischer Zellen sowohl in vitro (siehe 3.2.1; Singh-Jasuja 2000) als auch in vivo. Die Injektion von 1µg Gp96 in Mäuse führt zu massiver Infiltration reifer dendritischer Zellen in die regionären Lymphknoten des Injektionsareals (Binder et al., 2000a). Außerdem sind zumindest CTL-Linien direkt durch Gp96 aktivierbar und sezernieren TNF-α und IFN-γ (Breloer et al., 1998).

1.4.3 Das Multifunktionstalent Gp96

Gp96 ist das bislang am besten untersuchte immunologisch relevante Hsp. Neben den immunisierenden Eigenschaften bei der Tumorvakzinierung werden zunehmend seine physiologischen Funktionen im extrazellulären Milieu, wenn auch noch modellhaft, verstanden. Die Vielzahl dieser Funktionen führte zum Vergleich von Gp96 mit einem Schweizer Taschenmesser (Schild and Rammensee, 2000a).

Apoptose als physiologischer Zelltod führt über ACAMPs (apoptotic cell associated ligands) wie Phosphatidylserin zur Toleranzentwicklung von T-Zellen gegenüber den freigesetzten Antigenen (1.3.3). Nekrotische Zellen jedoch setzen (unter anderem) Gp96 frei (Basu et al., 2000), welches über die beschriebenen Mechanismen (1.4.2) zum einen APC aktiviert, zum anderen endozytiert wird und T-Zellen generiert, die spezifisch für das die Zelltodesursache auslösende Antigen sind.

Geringe Mengen Gp96 werden zudem phylogenetisch konserviert auf Oberflächen von Tumor- und nichttransformierten Zellen gefunden (Robert et al., 1999). Dies mag, neben Zelltod durch Nekrose, die Beobachtung von Autoantikörpern (IgD) gegen Gp96 im Serum von Mäusen erklären (Menoret et al., 2000). Da die Antikörperlevel durch Gp96-Immunisierung nicht ansteigen, ist eine Auslösung von Autoimmunität gegen Gp96-Tumorvakzinierungen nicht zu befürchten.
Aktuelle Ergebnisse zeigen außerdem die Bindung von Gp96 an Thrombozyten und eine Inhibierung der DC-Aktivierung durch Thrombozyten (Singh-Jasuja et al., 2001). Dieser Aspekt eröffnet ein neues Funktionsfeld für Gp96 im Rahmen der Blutstillung in Wundgebieten.

1.4.4 Gp96 und die „T-Zell-Hilfe“

Unklar ist, welche Rolle $CD4^+$ T-Zellen bei den durch Gp96 vermittelten Immunreaktionen spielen. Besonders das effiziente Cross-priming von CTL durch Gp96-assoziierte Peptide legt eine Beteiligung von T-Helferzellen nahe. Bislang liegen jedoch lediglich kontroverse Hinweise diesbezüglich vor. Die Depletion $CD4^+$ T-Zellen in Mäusen durch Antikörper verhindert die immunisierende Gp96-Wirkung (Tamura et al., 1997). Immunisierung in MHC-$II^{-/-}$ Mäusen wird ebenfalls nicht beobachtet (Schild HJ, persönliche Mitteilung). Wird das ER-Retentionssignal von Gp96 in Tumorzellen ersetzt durch den F_c-Teil von murinem IgG1, wird Gp96 in das extrazelluläre Milieu sezerniert. Dieses Gp96 induziert eine CD4-unabhängige CTL-vermittelte Tumorabstoßung (Yamazaki et al., 1999).
Eine eindeutige Klärung der Frage nach der Bedeutung von $CD4^+$ T-Zellen durch den direkten Nachweis Gp96-assoziierter MHC-II Epitope und spezifischer T-Helferzellaktivierung ist bislang nicht erfolgt.

1.5 Zielsetzung der Arbeit

In der vorliegenden Arbeit sollen folgende Aspekte der Funktion extrazellulärer Hitzeschockproteine geklärt werden:

- Nachweis Gp96-assoziierter MHC-II Epitope:
  Durch Repräsentationsassays mit unterschiedlichen APC soll die Aktivierung Ovalbumin (OVA)-spezifischer $CD4^+$ T-Zellen durch Gp96 aus EG.7-Zellen (mit Ovalbumin-cDNA transfizierte EL4-Zellen) in-vitro und in-vivo gezeigt werden. Dazu stehen als in-vitro Effektoren $CD4^+$, OVA-spezifische T-Zellhybridome zur Verfügung. Der in-vivo Nachweis wird mit zwei TCR-transgenen Mausstämmen (OT-I mit OVA-spezifischen CTL, OT-II mit OVA-spezifischen T-Helferzellen) geführt. Die Aktivierung der Effektoren wird anhand ihrer Zytokinsekretion (IL-2 und IFN-γ) gemessen.
  Zusätzlich soll bei erfolgreichem Nachweis die Bedeutung und der Mechanismus einer T-Helferzellaktivierung durch die Vewendung spezifischer Inhibitoren charakterisiert werden.
- Gp96-vermittelte Aktivierung dendritischer Zellen:
  Mit Hilfe von Zytokin-ELISAs soll die Aktivierung dendritischer Zellen durch Gp96 erstmals gezeigt und anschließend anhand des Zytokinprofils näher charakterisiert werden.
- Direkter Nachweis der Hsp60-Bindung an Zelloberflächenrezeptoren:
  Durch Markierung von Hsp60-Molekülen des Menschen und aus Chlamydia trachomatis mit dem Fluoreszensfarbstoff TRITC soll die Hsp60-Bindung an verschiedene Zelltypen (Makrophagen, dendritische Zellen) direkt gezeigt werden. Die Messung der Fluoreszenz soll im FACS-Gerät (fluorescence activated cell-sorter) erfolgen.
  Längerfristiges Ziel ist die Charakterisierung dieser Bindung und der Nachweis einer eventuellen Endozytose mit Hilfe der konfokalen Mikroskopie.

1.5.1 Peptidmotivbestimmung des MHC-I Moleküls PD1 *(Sus scrofa)*

Eine genaue Kenntnis der Immunreaktion gegenüber Antigenen des Schweins gewinnt vor dem Hintergrund eines weltweit steigenden Organtransplantatbedarfs und der Entwicklung neuer Xenotransplantationstechniken eine zunehmende Bedeutung. Gleichzeitig besitzt das Miniaturschwein *(Sus scrofa)* eine relativ kleine MHC-Klasse I Genfamilie mit nur 7 Mitgliedern, wodurch es ein hervorragendes Modellsystem zur Untersuchung der Regulation von Genexpression und Antigenpräsentation ist (Singer et al., 1987). Im Rahmen eines Projekts, das die Interaktionen von MHC-I, β2m, Peptiden und Chaperonen im Verlauf des Klasse-I-Prozessierungsweges in virusinfizierten Zellen untersucht, wird in der vorliegenden Arbeit das Peptidmotiv des MHC-I Moleküls PD1 des Miniaturschweins bestimmt.

Die Infektion einer Zelle mit dem onkogenen Adenovirus Ad12 führt zur Herabregulation der Transkription von TAP und der LMP-Gene des Proteasoms, so daß weniger und eventuell missgeformte Peptide das endoplasmatische Retikulum erreichen (Rotem-Yehudar et al., 1996). Hierdurch wird der Aufbau vollständiger MHC-Peptidkomplexe sowie deren Präsentation auf der Zelloberfläche gestört. Die Untersuchung dieser Vorgänge erfordert die Kenntnis sowohl der intrazellulär produzierten als auch der für die Stabilität von MHC-Peptidkomplexen an der Zelloberfläche erforderlichen Peptide. Die Identifikation des Peptidmotivs des in diesem Projekt verwendeten MHC-Moleküls PD1 hat also Bedeutung für das Verständnis der Antigenpräsentation in virusinfizierten Zellen. Gleichzeitig ist sie ein Beitrag für weitere Untersuchungen von Abstoßungsreaktionen im Rahmen der Xenotransplantation.

2 Material und Methoden

2.1 Zellkultur

2.1.1 Zellinien

3DO	H-2^d-restringiertes $CD4^+$-T-Zellhybridom mit einem T-Zell-Rezeptor (TCR) spezifisch für das MHC-Klasse-II Epitop von Ovalbumin ($OVA_{323-339}$: ISQAVHAAHAEINEAGR) (Watts et al., 1984).
3DO-54.8	Klon des Hybridoms 3DO mit höherer Expression der Moleküle CD4 und TCR als die zuerst verwendete Linie 3DO. Zur Verfügung gestellt von A. Reske-Kunz, Mainz (Watts et al., 1984).
BO97	H-2^b-restringiertes $CD4^+$-T-Zellhybridom, TCR-Spezifität wie 3DO.
EG.7	mit dem Plasmid pAc-neo-OVA, das eine komplette Kopie der chicken ovalbumin (OVA) mRNA und das Neomycin (G418)-Resistenzgen trägt, transfizierte EL4-Zellen des Haplotyps H-2^b, entwickelt von M.J. Bevan (Moore et al., 1988). Die EL4-Linie entstammt einem chemisch in einer C57BL-Maus induzierten Lymphom.
D1	eine dendritische Zellinie des Haplotyps H-2^b. D1-Zellen sind unreife, aktivierbare DC, die zum Wachstum GM-CSF aus Kulturüberstand der Fibroblastenzellinie R1 benötigen. Da die leicht adherenten D1-Zellen auch durch beschichtetes Plastik aktiviert werden können, muß die Linie in unbeschichteten Kulturflaschen kultiviert werden. Zur Verfügung gestellt von P. Ricciardi-Castagnoli, Mailand (Winzler et al., 1997).
D2SC/1	eine DC-ähnliche Monozytenlinie aus DBA/2-Mäusen (H-2^d), die reife DC repräsentiert. Die Linie ist transfiziert mit GM-CSF. Zur Verfügung gestellt von P. Paglia, Mailand (Granucci et al., 1994).

FSDC eine DC-ähnliche Monozytenlinie aus C57BL/6-Mäusen (H-2^b), die durch Interferon-γ aktivierbar ist. Zur Verfügung gestellt von P. Ricciardi-Castagnoli, Mailand (Girolomoni et al., 1995).

A505 eine adherente mausembryonale Fibroblastenzellinie eines PD1-transgenen Mausstammes (C57BL/6 (H-2^b)). Die Zellinie ist zusätzlich mit dem adenoviralen E1A-Protein transfiziert. Zur Verfügung gestellt von Rachel Ehrlich, Tel Aviv.

PD1.1 eine nicht-adherente $CD8^+$ leukämische Zellinie aus einem PD1-transgenen C57BL/6 (H-2^b) Mausstamm, die durch die Inokulation von RadLV in den Thymus gewonnen wurde. Zur Verfügung gestellt von Rachel Ehrlich, Tel Aviv (Bashi and Ehrlich, 1995).

2.1.2 Kulturbedingungen

Medien und Medienzusätze:

α-MEM (Modified Eagle´s Medium, α-Modifikation (Sigma))
Zusätze: 10%FCS (PAA Laboratories), 2mM Glutamin, 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin, 50µM β-Mercaptoethanol

IMDM (Iscove´s Modified Dulbecco´s Medium (Biowittaker))
Zusätze: 10%FCS (PAA Laboratories), 2mM Glutamin, 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin, 50µM β-Mercaptoethanol, Natriumpyruvat, nicht-essentielle Aminosäuren

RPMI (Roswell Park Memorial Institute - Medium)
Zusätze: 5%FCS (PAA Laboratories), 2mM Glutamin, 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin, 50µM β-Mercaptoethanol, 2 mg/ml Natriumhydrogencarbonat, 2,4 mg/ml HEPES, pH 7,2

D1-Medium	IMDM mit 10% FCS (Gibco, australischer Ursprung), 25mM HEPES, 2mM Glutamin, 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin, 50µM β-Mercaptoethanol, 30% R1-Überstand
FCS	Foetales Kälberserum wurde im Wasserbad bei 37°C aufgetaut und anschließend bei 56°C für 45 min inaktiviert.

Die Zellinien 3DO, BO97, EG.7, D2SC/1, FSDC und A505 wurden bis zu einem Volumen von ca. 100 ml in α-MEM in Zellkulturflaschen (Greiner) unterschiedlicher Größe oder in 12-well Platten (Costar) kultiviert. Das 3DO-54.8 Hybridom wurde in IMDM kultiviert, da die Zellen zum Zeitpunkt des Erhalts an dieses Medium sowie an die Zugabe von Natriumpyruvat adaptiert waren. Für EG.7 Zellen wurde zwischenzeitlich zur Selektion 250 µg/ml G-418 (PAA Laboratories) zugesetzt. Größere Volumina zur Gewinnung einer für die Proteinaufreinigung notwendigen Zellmenge (EG.7, A505 und PD1.1) wurden in RPMI-Medium in Rollerflaschen (max. 1,5l/Flasche) gezüchtet. Die Kultur dendritischer Zellen aus Mäuseknochenmark (BMDC, siehe 2.1.5) erfolgte in RPMI mit 150 U/ml GM-CSF (PeproTech, London) in 24-well Platten. Alle Zellen wuchsen bei 37°C und 7,5% CO_2 in feuchtigkeitsgesättigter Atmosphäre.

Zellernte und Splitting:

Die Dichte der Zellen wurde im Mikroskop nach Erfahrungswerten und durch Zählen lebender Zellen nach Trypanblaufärbung (Merck) in einer Neubauer-Zählkammer beurteilt. Im Falle einer hohen Anzahl toter Zellen wurden diese in einem Falconröhrchen (13ml) durch Unterlegung mit ca. 2 ml Nycoprep (Dichte 1,077; 265 mOsm; Nycomed Pharma, Oslo) und anschließender Zentrifugation (Heraeus Megafuge, 800g, 10 min ohne Bremse) von den lebenden Zellen getrennt. Der Dichtegradient verhindert ein Abzentrifugieren der lebenden Zellen, die sich an der Grenzschicht Medium-Nycoprep sammeln.

Zellen aus Rollerflaschen (max. 1 x 10^6/ml) wurden zunächst in einer Sorvall-Zentrifuge (GS3-Rotor, 1800 U/min, 10 min, 4°C) abzentrifugiert. Die Pellets wurden in einigen ml PBS aufgenommen, in 50 ml Falconröhrchen gesammelt und diese erneut

zentrifugiert (Megafuge, 1600 U/min, 10 min, 4°C). Nach Verwerfen des Überstandes wurden die Zellpellets bei -80°C eingefroren.

Zellen in Gewebekulturflaschen wurden abhängig von Dichte und Wachstumsgeschwindigkeit im Volumenverhältnis 1:3 bis 1:20 in frischem Medium und einer neuen Flasche verdünnt. In 12-well Platten wurden die Zellen auf jeweils vier wells in einer absteigenden Verdünnung von 1:3 aufgeteilt.

Zur Ernte der sehr adherenten Zellinie A505 wurde zunächst das Medium abgeschüttet, die Flaschen einmal mit PBS gespült und anschließend mit 5 ml (Kulturflasche) oder 20 ml (Rollerflasche) 5mM EDTA in PBS für 15 min bei 37°C inkubiert. Die abgelösten Zellen wurden in 50 ml Falconröhrchen gesammelt, zweimal mit PBS gewaschen (Megafuge, 1600 U/min, 10 min, 4°C) und das Zellpellet bei -80°C eingefroren.

Zum Splitten adherenter Zellen (A505, FSDC, D2SC/1) wurden die Zellen mit 5mM EDTA in PBS abgelöst, zweimal in PBS gewaschen und in neuem Medium ausgesät.

D1-Zellen wurden spätestens bei einer Dichte von 6 x 10^5/ml gesplittet, da eine höhere Dichte die Zellen aktiviert. Zur Ablösung der leicht adherenten Zellen wurde mit 2,5 mg/ml Trypsin und 2mM EDTA bei Raumtemperatur inkubiert und die Zellen erneut in Petrischalen (2 x 10^5/ml) ausplattiert.

2.1.3 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Einfrieren:

Die Zellen wurden gezählt, in einem Falconröhrchen abzentrifugiert und auf eine Konzentration von 8 x 10^6/ml eingestellt. Es wurde dann das gleiche Volumen FCS, 20% DMSO langsam zugetropft und jeweils 1 ml des Gesamtvolumens (4 x 10^6/ml, FCS, 10% DMSO) auf Kryoröhrchen (Greiner) verteilt. Diese wurden in einer Kryobox (Greiner) zunächst bei -80°C gelagert und nach einem Tag in flüssigen Stickstoff überführt.

Auftauen:

Nach Entnahme aus einem Stickstofftank wurden die Zellen in der Hand erwärmt, bis sie im Außenbereich angetaut waren, das Zentrum des Röhrchens jedoch weiterhin ge-

froren war. Dieses wurde durch Zutropfen von Medium mit Raumtemperatur aufgetaut, die Zellen in 15-20 ml Medium aufgenommen und ausgesät (DMSO-Konz. < 1%).

2.1.4 Milz- und Lymphknotenkulturen

Mäuse zur Milz- und Lymphknotenentnahme wurden durch Genickbruch getötet. Sollten auch axilläre Lymphknoten entnommen werden, wurde die Maus in einem Behälter mit Trockeneis und einigen Lagen Zellstoff erstickt, um Verletzungen der Schulterregion und der dort befindlichen Lymphknoten zu vermeiden.

- Das Bauchfell des Tieres wurde gut mit Ethanol desinfiziert, entlang der Mittellinie eröffnet, vom Peritoneum freipräpariert und mit Nadeln gespannt.
- Die nun freiliegenden subkutanen und evtl. inguinalen Lymphknoten wurden entnommen, daraufhin das Peritoneum eröffnet und zunächst die mesenterialen und paraaortalen Lymphknoten soweit möglich, im Anschluß die Milz entnommen.
- Milz und Lymphknoten wurden getrennt mit dem Stempel einer 5 ml Spritze durch ein 40 µm Nylonsieb (Becton Dickinson) gerieben und so eine Einzelzellsuspension in Medium hergestellt.
- Nach Zentrifugation (1200 U/min, 3 min, 4°C) wurden die Milzzellen zur Entfernung der Erythrozyten für 4 min mit 3 ml ACT (160 mM Ammoniumchlorid (Roth), 170 mM Tris (Sigma), pH 7,2) auf Eis inkubiert, anschließend zentrifugiert und einmal gewaschen.
- Milz- und Lymphknotenzellen wurden gezählt und auf die benötigten Konzentrationen eingestellt. Milzzellen aus BALB/c und C57BL/6 Mäusen wurden, wenn sie nur in ihrer Funktion als APC gebraucht wurden, im Anschluß mit 33 Gy aus einer ^{137}Cäsium-Quelle (Gammacell 1000 Elite, Gammaster Radvice BV.) bestrahlt, um eine Proliferation zu verhindern.

2.1.5 Dendritische Zellen aus Mäuseknochenmark (BMDC)

Bei der Herstellung von BMDC (bone-marrow derived dendritic cells) wird zunächst Knochenmark gewonnen, dessen Monozyten anschließend mittels GM-CSF zur Entwicklung zu dendritischen Zellen stimuliert werden. Diese DC kommen den physiologisch vorkommenden DC in ihren Eigenschaften wesentlich näher als Zellinien. Im humanen System werden periphere Blutmonozyten durch Stimulation mit GM-CSF und IL-4 zur DC-Gewinnung verwendet.

- Femur und Tibia einer Maus (C57BL/6 oder BALB/c, je nach benötigtem Haplotyp) wurden freipräpariert, die Knochen auf Höhe der Epiphysen beidseits aufgeschnitten und das Knochenmark mit einer 25G Nadel (Sterican, Braun) und sterilem PBS in eine Petrischale ausgespült.
- Durch mehrmaliges Aufziehen (ca. 1 min) mit einer Pasteur-Pipette wurde eine Einzelzellsuspension hergestellt und diese in ein 15 ml-Falconröhrchen überführt .
- Nach Zentrifugation wurde das Zellpellet mit 1-2 ml ACT (s.o.) aufgenommen und für 4 min auf Eis inkubiert, um die Erythrozyten zu lysieren.
- Die Zellen wurden nach einmaligem Waschen nun in 5 ml RPMI, 10% FCS resuspendiert und durch ein Nylonsieb in ein neues 50 ml Röhrchen übertragen, gezählt, auf 1,5 x 10^6 Zellen/ml mit RPMI, 150 U/ml GM-CSF eingestellt und in eine 24-well Platte (1 ml/well) ausgesät (Tag 0).
- Das Medium wurde an den Tagen 2 und 4 vorsichtig abgenommen und durch 1 ml/well frisches Medium ersetzt.

Unreife DC exprimieren nach 6 Tagen CD11c sowie MHC-Klasse-II, jedoch kein CD14. Die Expression von B7.2 bietet einen Anhalt für den Grad der Aktivierung der Zellen. Dies wurde mit einer FACS-Färbung (siehe 2.2) getestet. Aus dem Knochenmark einer Maus konnten ca. 10 - 20 x 10^6 Zellen gewonnen werden.

2.1.6 Peritoneale Exsudat-Zellen (PEC)

Durch das Spülen des Peritoneums einer zuvor getöteten Maus mit eiskaltem Medium erhält man Zellen, die sich im wesentlichen aus zwei Populationen zusammensetzen:

CD14-positive Makrophagen sowie CD19- und CD5- positive (Ly-1) B-Zellen, eine Subpopulation peripherer B-Zellen, die sowohl in ihrer Entwicklung wie auch in funktioneller Hinsicht eine eigenständige Rolle spielen (siehe 3.3 und 4.3). Peritonealmakrophagen werden häufig zur Konditionierung von Medium verwendet, da sie ein Zytokincocktail an das Medium abgeben, das bestimmten Zellinien ideale Wachstumsvoraussetzungen bietet.

- Eine durch Genickbruch getötete Maus wurde in Rückenlage auf einem Styroporblock mit Nadeln befestigt, mit Ethanol desinfiziert und die Bauchhaut in der Mittellinie bis zum Halsansatz vorsichtig eröffnet, ohne das Peritoneum zu verletzen.
- Mit zwei Schnitten jeweils zur Axilla und zur Leiste wurde die Bauchhaut vollständig bis zur Wirbelsäule vom Peritoneum abgelöst und gespannt.
- 8-10 ml eiskaltes Medium wurden mit einer 25G-Nadel seitlich in das Peritoneum injiziert und das Peritoneum für einige Minuten manuell massiert.
- Im Anschluß wurde das Medium ebenfalls im seitlichen Unterbauch mit einer 10ml Spritze vorsichtig abgesaugt, so daß keine Blutgefäße oder Bauchorgane angesaugt oder verletzt wurden.
- Die so gewonnene Einzelzellsuspension wurde abzentrifugiert und gezählt (im Durchschnitt 1 - 2 x 10^6 Zellen).

2.2 Durchflußzytometrie (FACS)

Das Prinzip der Durchflußzytometrie beruht auf der Brechung des Lichts eines Laserstrahls, d.h. einer bestimmten Wellenlänge, sobald dieses auf eine Zelle trifft. Der Grad der Ablenkung des Laserstrahls sowie seiner Streuung durch die Zelle kann mit Photoelektroden gemessen werden und gibt Auskunft über die Größe (forward scatter, FSC) sowie die Granularität (side scatter, SSC) dieser Zelle. Zudem kann der Laserstrahl fluoresziierende Farbstoffe, die mittels z.B. fluoreszenzmarkierter Antikörper in eine Zelle eingebracht oder an eine Zelle gekoppelt werden, anregen. Das von diesen Farbstoffen emittierte Licht kann wiederum mittels Photoelektroden gemessen werden. Auf diese Weise lassen sich einzelne Zellen einer Population sehr genau charakterisieren und auf

bestimmte Eigenschaften, z.B. die Expression von Oberflächenmarkern, hin untersuchen. Das verwendete FACSCalibur-Gerät (Becton-Dickinson) besitzt einen Argon-Laser (488 nm) und Detektoren für die Emissionen der Farbstoffe FITC (Fluoresceinisothiocyanat, 518 nm, FL-1), TRITC (Tetramethylrhodaminisothiocyanat, 580 nm, FL-2), PE (Phycoerythrin, 575 nm, FL-2) sowie PI (Propidiumiodid, 650 nm, FL-3). Die Zellen werden mit einer Kapillare aus einer Suspension angesaugt und treffen einzeln auf den Laserstrahl. Es sind so Messungen von mehreren tausend Zellen/Sekunde möglich.

2.2.1 FACS-Färbung mit Zelloberflächenmarkern

Zur Überprüfung der Expression von Oberflächenmolekülen auf einer Zelle wird das gesuchte Antigen entweder an einen fluoreszenzmarkierten, spezifischen Antikörper gebunden (direkte Immunfluoreszenz) oder der spezifische Antikörper wird, sollte kein direkt markierter Antikörper zur Verfügung stehen, mittels eines markierten Zweitantikörpers, der gegen ein Epitop des Erstantikörpers gerichtet ist, nachgewiesen (indirekte Immunfluoreszenz). Zur Abschätzung der unspezifischen Bindung des Zweitantikörpers an die Zelloberfläche wird dieser auch direkt, d.h. ohne Erstantikörper, zu den Zellen gegeben. Zudem wird immer eine Kontrollfärbung mit einem Antikörper gleichen Isotyps wie der des markierten Antikörpers durchgeführt, um den Grad unspezifischer Bindung des Fc-Teils des Antikörpers an Fc-Rezeptoren auf der Oberfläche mancher Zellen einschätzen zu können. Die Antikörperbindung wird bei 4°C (auf Eis) durchgeführt, um eine Endozytose/Phagozytose der Antikörper zu verhindern.

- alle Färbungen wurden in 96-well Spitzbodenplatten (Greiner) durchgeführt.
- 1-5 x 10^5 Zellen/well wurden zunächst zweimal mit FACS-Puffer (PBS, 1% BSA, 0,02% Azid) gewaschen (Megafuge, 1500 U/min, 2 min).
- die Pellets wurden anschließend mit dem (Erst-) Antikörper, verdünnt in FACS-Puffer (Konzentration abhängig von der Affinität des Antikörpers, siehe Ergebnisteil), in 100µl Gesamtvolumen 30 min unter Alufolie (Lichtschutz) inkubiert.
- nun zweimaliges Waschen mit 180 µl/well FACS-Puffer.

- im Falle eines nicht-markierten Erstantikörpers folgte nun die Inkubation mit einem Zweitantikörper (verdünnt in 100µl FACS-Puffer) für 30 min, ansonsten wurden die Zellen in 300 µl FACS-Puffer aufgenommen, in FACS-Röhrchen überführt und sofort gemessen.

2.2.2 Intrazelluläre Zytokinfärbung

Bisherige Nachweisverfahren für von aktivierten Zellen produzierte Zytokine (z.B. ELISA, 2.6.5) lassen keine Aussage darüber zu, wieviele Zellen aus der stimulierten Population diese Zytokine produziert haben, d.h. durch den Stimulus tatsächlich aktiviert wurden. Die intrazelluläre Zytokinfärbung (wie auch der ELISPOT) beantwortet diese Frage, indem die Zellen zu einem bestimmten Zeitpunkt fixiert und ihre Membranen permeabilisiert werden, so daß die noch nicht an das Medium abgegebenen Zytokine für fluoreszenzmarkierte Antikörper zugänglich werden. Zusätzlich können Oberflächenmarker der Zellen angefärbt werden, die eine genaue Zuordnung und Charakterisierung einer Zelle innerhalb einer heterogenen Population zulassen. Diese Art des Nachweises entspricht jedoch einer Momentaufnahme des Zytokingehalts einer Zelle zum Zeitpunkt der Fixierung und setzt die ungefähre Kenntnis der Produktionskinetik der untersuchten Zytokine voraus.
T-Zellen wurden 12-16 Stunden bei 37°C in 96-well Rundbodenplatten stimuliert. 4 Stunden vor der eigentlichen Färbung wurde dem Medium 0,67 µl/ml Brefeldin A (Sigma) oder Monensin (Pharmingen) zugesetzt. Beide Substanzen inhibieren den intrazellulären vesikulären Transport und führen so zu einer Ansammlung der Zytokine im endoplasmatischen Retikulum und dem Golgi-Apparat. Der Effekt der Momentaufnahme wird dadurch abgeschwächt.

Material:

- PBS
- PBS, 0,2% Natrium-Azid, 0,5% BSA = „PBA“
- PBA, 0,1% Saponin (ein Detergens, dass Zellmembranen permeabilisiert; Sigma)
- PBA, 0,1% Saponin, 10% FCS

- PBS, 3,7% Formaldehyd (führt zu einer Quervernetzung zellulärer Strukturen)
- PBS, 1% Formaldehyd
- PBS, 1% BSA, 0,02% Natrium-Azid = „FACS-Puffer“

Durchführung: (in 96-well Spitzbodenplatten auf Eis)

- zweimaliges Waschen der Zellen mit PBS
- Oberflächenfärbung: die Zellen wurden 20-30 min mit einem entsprechenden Antikörper (z.B. α-CD4, α-CD8), verdünnt in 100µl FACS-Puffer, inkubiert und im Anschluß einmal gewaschen.
- Fixierung: es wurden 50 µl 3,7% Formaldehyd in PBS/well zugegeben, 4 min Inkubation
- einmaliges Waschen mit PBS
- einmaliges Waschen mit PBA, 0,1% Saponin
- Permeabilisierung: Zugabe von 50 µl PBA, 0,1% Saponin, 10% FCS/well, 10 min Inkubation.
- zweimaliges Waschen mit PBA, 0,1% Saponin
- Zytokin-Färbung: Zugabe eines anti-Zytokin-Antikörpers (z.B. α-IL-2, α-IFNγ) in 100µl FACS-Puffer/well, 20-30 min Inkubation.
- zweimaliges Waschen mit PBA, 0,1% Saponin und Resuspension in 100 µl PBS, 1% Formaldehyd.
- die Zellen wurden in FACS-Röhrchen überführt und sofort gemessen.

2.3 Mauszucht und -typisierung

Alle in dieser Arbeit verwendeten Mäuse wurden im äußeren Bereich (nicht SPF (specified pathogen free)) des Tierstalls des Verfügungsgebäudes der Universität Tübingen gehalten. Die Zucht erfolgte im Verhältnis 2 Weibchen : 1 Männchen, die Jungtiere wurden im Alter von 4 Wochen von der Mutter getrennt.

2.3.1 OT-I und -II Mäuse

OT-I und -II Mäuse wurden dem Labor zur Verfügung gestellt von Christian Kurts, Hannover. Es handelt sich um transgene Tiere (C57BL/6 J - TgN (OT-I) WHM und C57BL/6 J - TgN (OT-II) WHM), deren T-Zellen selektiv die vorarrangierten α- und β-Ketten des T-Zellrezeptors (TCR) exprimieren, der spezifisch ein Ovalbumin-Epitop auf MHC-Klasse-I (OT-I) oder MHC-Klasse-II (OT-II) erkennt. Die variablen Segmente der TCR-Ketten sind dabei für beide Stämme gleich ($V_\alpha 2$, $V_\beta 5$). Die Mäuse stammen von einem C57BL/6 Hintergrund (Haplotyp $H2^b$).

2.3.2 Schwanzblutentnahme und Typisierung

Bei Ankunft der Mäuse im Labor war der Stamm OT-II für das Transgen homozygot, der Stamm OT-I jedoch heterozygot. Um bei der OT-I Zucht auftretende nicht-transgene Tiere identifizieren zu können, wurde wie folgt vorgegangen:

- in eine 1ml-Spritze mit einer G27-Nadel wurde Heparin (Liquemin (Roche), 1:1000 verdünnt) aufgezogen und wieder in das Röhrchen zurückgespritzt, so daß Nadel und Spritze leicht mit Heparin benetzt waren.
- die Maus wurde in einen Restrainer eingebracht, ihr Schwanz desinfiziert und mit einer Rotlichtlampe 1-2 min erwärmt.
- mit einem Skalpell wurde die rechte oder linke Schwanzvene parallel leicht angeschnitten und das austretende Blut (50 -150 µl) mit einer 1 ml-Spritze und einer G27-Nadel aufgefangen.
- das Blut wurde mit 5 ml eiskaltem PBS gemischt und abzentrifugiert (1700 U/min, 5 min, 4°C).
- der Überstand wurde mit einer Pasteurpipette abgenommen, das Pellet in 3 ml ACT resuspendiert und 4 min auf Eis inkubiert, um eine Lyse der Erythrozyten zu bewirken.
- die Reaktion wurde mit 5 ml PBS gestoppt, die Zellen zweimal mit PBS gewaschen (1500 U/min, 3 min, 4°C) und der Überstand jeweils mit einer Pipette abgenommen.
- mit den so erhaltenen Zellen wurde eine FACS-Oberflächenfärbung mit den Antikörpern anti-$V_\alpha 2$-FITC, anti-$V_\beta 5$-FITC und anti-CD8-PE durchgeführt.

Anhand des prozentualen Anteils von $CD8^+$ T-Zellen an allen Lymphozyten läßt sich feststellen, ob die Maus transgen ist (siehe 3.1.3).

2.4 Proteinreinigung

Für eine Isolierung des Hitzeschockproteins Gp96 sind verschiedene Methoden abhängig vom Ausgangsmaterial (Organgewebe, Zellinien) in der Literatur beschrieben. Die Aufreinigung aus Zellinienpellets kann entweder mit einem an Cyanbromid-aktivierte Sepharose gekoppelten rekombinanten anti-Gp96-Antikörper erfolgen oder, wie hier, mittels ConcanavalinA (ConA) -Sepharose und Anionenaustauschchromatographie. Das zuerst genannte Verfahren hat den Vorteil, daß man ein sehr reines Protein erhält, jedoch ist die Ausbeute geringer als bei der zweiten Methode. Im zweiten Fall ist das Protein immer mit etwas ConcanavalinA, einem stark mitogenen Lectin, verunreinigt. In der Regel reicht dies jedoch nicht für einen zellaktivierenden Störeffekt aus.

2.4.1 Aufreinigung von Gp96 mit ConA-Sepharose und FPLC

Die Zellen des Pellets werden zunächst durch einen hypotonen Puffer weitgehend lysiert. Nichtlysierte Zellen und Mikrosomen werden in einem Dounce-Homogenisator vollends aufgeschlossen. Dabei sind Proteaseinhibitoren für den Schutz der Proteine vor freigesetzten Proteasen von entscheidender Bedeutung. Zusätzlich werden alle Schritte bei 4°C durchgeführt, um die proteolytische Aktivität möglichst gering zu halten. Durch Ultrazentrifugation und anschließende Filtration werden Membranreste und Zelldetritus von zellulären Proteinen und Molekülen getrennt.
Das Filtrat kann nun über eine ConA-Sepharose Säule gegeben werden, an die die enthaltenen Glykoproteine bindet. Mit α-Methylmannosid, das eine höhere Affinität zu ConA besitzt als Glykoproteine, werden diese von der Säule gewaschen. Als Vorbereitung für die Anionenaustauschchromatographie muß die Lösung nun denselben Anionengehalt erhalten wie der Puffer („Puffer A“), mit dem die Chromatographie-Säule

äquilibriert wird. Dies wird durch eine Dialyse der Lösung gegen mehrere Liter des entsprechenden Puffers erreicht.

Mittels einer FPLC-Apparatur (fast performance liquid chromatography; Amersham Pharmacia Biotech) werden die verbleibenden Glykoproteine auf eine Mono-Q Säule (Pharmacia) geladen, die eine Matrix aus positiv geladenen quartären Ammoniumionen besitzt, an die anionische Proteine binden. Mit einem langsam ansteigenden Anionengradienten (0M NaCl „Puffer A“ bis 1M NaCl „Puffer B“; Abb. 1), der zunächst schwach negativ geladene Proteine aus ihrer Bindung an die Säule verdrängt, lassen sich die Proteine in Abhängigkeit ihrer Ladung auftrennen und in Fraktionen sammeln. Gp96 eluiert bei etwa 0,4 - 0,45 M NaCl. Das gesuchte Protein wird anschließend anhand seiner Größe in einem SDS-Polyacrylamid-Gel (2.4.2), auf das alle Fraktionen des fraglichen Bereichs aufgetragen werden, nachgewiesen und in einem Dot Blot (2.4.3) eindeutig identifiziert.

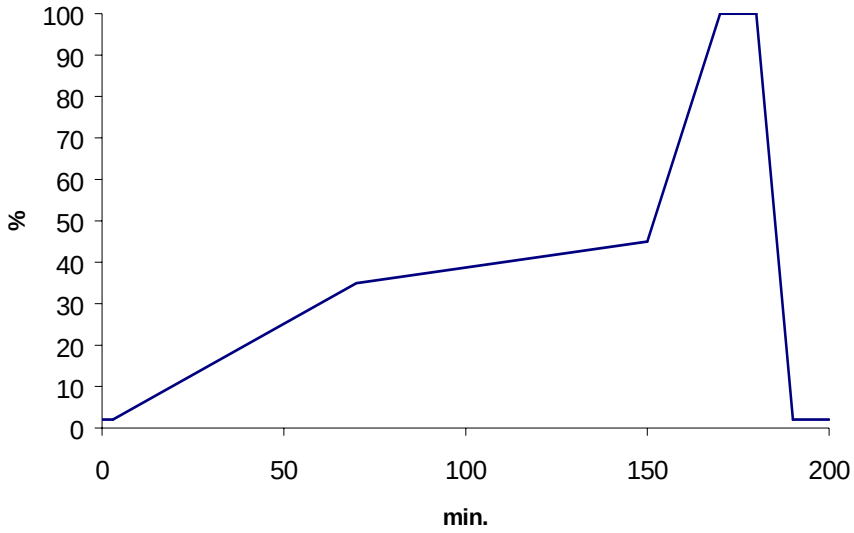


Abb. 1:
Der Anionengradient des FPLC-Programms „qlong“ in Prozent der Konzentration des „Puffers B“.

Material:

- hypotoner Lysepuffer: $NaHCO_3$ 30 mM, pH 7,1 mit Proteaseinhibitoren
- Proteaseinhibitoren: PMSF (Phenylmethylsulfonylfluorid): 0,2 mM; hemmt Serinproteasen
  Pepstatin: 2 µg/ml; hemmt Aspartatproteasen
  Leupeptin: 2 µg/ml; hemmt Serin- und Thiolpreoteasen

1 Complete-Tablette (Boehringer Mannheim)/50 ml Lysat; diese Tabletten enthalten eine Inhibitormischung

- Phosphat - Puffer: durch Mischen von 150 mM NaH_2PO_4 (sauer) mit 150 mM Na_2HPO_4 (basisch) wird der pH-Wert des Puffers auf 7,0 - 7,1 eingestellt.
- 10x ConA - PBS: 50 mM Phosphat - Puffer, 1,5 M NaCl, 20 mM KCl, 20 mM $MgCl_2$, pH 7,0 - 7,1
- ConA - Sepharose (Pharmacia)
- 6% α-D-Mannopyranosid (Sigma) in ConA - PBS
- Mono-Q Puffer A: 5 mM Phosphat - Puffer, pH 7,0
  Mono-Q Puffer B: 5 mM Phosphat - Puffer, 1M NaCl, pH 7,0

Durchführung:

- das bei -80 °C eingefrorene Zellpellet wurde angetaut, das 6-fache Volumen an hypotonem Lysepuffer hinzugegeben und mit einem Magnetrührer 30 min lang auf Eis gerührt.
- das Lysat wurde anschließend mit einem Dounce-Homogenisator (10x großer Kolben, 10x kleiner Kolben) im Kühlraum bearbeitet und in 50 ml Falconröhrchen zentrifugiert (4000 U/min, 20 min, 4°C).
- der Überstand wurde abgenommen und bei 100.000g für 60 min ultrazentrifugiert (40.000 U/min, 70 T_i - Rotor).
- der entstandene Überstand wurde nun mit einem Vorfilter (0,45 µm, Sartorius) filtriert.
- auf Eis wurde die Lösung nun 10:1 mit 10x ConA-PBS verdünnt und über eine zuvor im Kühlraum vorbereitete und mit ConA-PBS äquilibrierte ConA-Sepharose Säule (Gelbettvolumen ca. 1/4 des ursprünglichen Zellpelletvolumens) gegeben. Dazu wurde eine elektrische Pumpe mit einer Flußgeschwindigkeit von ca. 1 ml/min verwendet und die Lösung über Nacht zirkuliert.
- die Säule wurde anschließend so lange bei einer Flußrate von 1 ml/min mit ConA-PBS gewaschen, bis anhand der optischen Dichte des Durchflusses praktisch kein ungebundenes Protein mehr nachweisbar war (OD_{280} gegen ConA-PBS < 0,05).

- die gebundenen Glykoproteine wurden nun mit 6% α-D-Mannopyranosid eluiert und in 5 ml Fraktionen aufgefangen. Dabei wurde die Säule zunächst mit einem Hahn verschlossen und das Säulenmaterial ca. 10 min in 6% α-D-Mannopyranosid inkubiert. Es wurden 6 - 10 Fraktionen gesammelt.
- die optische Dichte jeder Fraktion bei 280 nm gegen 6% α-D-Mannopyranosid wurde bestimmt und Fraktionen mit einer $OD_{280} > 0{,}06$ gepoolt.
- dieser Pool wurde in einen Dialyseschlauch gefüllt und über Nacht gegen 4 l Mono-Q Puffer A dialysiert.
- eine Mono-Q 5/5 Säule wurde zunächst mit Wasser gewaschen, mit Mono-Q Puffer A äquilibriert (1 ml/min) und über ein Super-Loop System mit dem Dialysat beladen. Anschließend wurde die Säule mindestens 30 min gewaschen.
- mit dem beschriebenen NaCl-Gradienten (Abb. 1) des „qlong"-Programms wurde nun über ca. 160 min bei einer Flußrate von 1 ml/min eluiert und das Eluat ab der 60. Minute in 1 ml-Fraktionen gesammelt.
- die Säule wurde zum Abschluß mit einem pyramidenförmigen Gradienten („qwash"-Programm), dann mit Wasser und 20% Ethanol gewaschen und bei 4°C gelagert.
- die OD_{280} der fraglichen Fraktionen wurde bestimmt und diese und Nachbarfraktionen auf ein SDS-Gel aufgetragen. Alle Fraktionen wurden zudem im Dot Blot überprüft.
- Gp96 enthaltende Fraktionen wurden gepoolt, bei Bedarf aufkonzentriert, die Gp96-Konzentration anhand der OD_{280} bestimmt (Adsorptionskoeffizient 1,0) und die Proben bei -80°C eingefroren.
- eine Aufkonzentrierung fand mittels Zentrifugation in Centricon 10 (10 kDa Ausschlußgrenze; Amicon) bei 4000 U/min in der Tischzentrifuge statt. Die Centricons waren zuvor mit 0,1 M Glycin blockiert worden.

2.4.2 SDS - PAGE

Sodiumdodecylsulfat (SDS), ein Detergens, bindet an Proteine und verleiht ihnen so eine negative Ladung, aufgrund derer sie im elektrischen Feld wandern können (PAGE - Polyacrylamidgelelektrophorese). Die Wandergeschwindigkeit der Proteine im Gel wird dabei allein durch ihre Größe (entsprechend dem Molekulargewicht) bestimmt. Durch die Homogenität der SDS-Protein-Komplexe besteht ein linearer Zusammenhang zwischen der Wanderungsstrecke und dem Logarithmus der Proteingröße. Die Proteine werden durch SDS denaturiert, Di- und Multimere werden dann, vorrausgesetzt sie bestehen aus Ketten unterschiedlicher Größe (z.B. MHC-Klasse-II-Komplexe), als einzelne Banden sichtbar. Meist wird dem Polyacrylamidgel ein sog. Sammelgel aufgelagert, in dem die Proteine zunächst stark fokussiert werden und damit einheitlicher und schärfer ins Trenngel eintreten.

Material:

- 10% SDS in Wasser
- 30% Acrylamid / 0,8% N,N‘-Methylenbisacrylamid
- 10% Ammoniumpersulfat (APS); APS bildet Radikale
- N,N,N‘,N‘-Tetramethylethylendiamin (TEMED); beschleunigt die Quervernetzung
- Trenngel: 1,5 M Tris pH 8,6
  Sammelgel: 0,5 M Tris pH 8,6
- 2x SDS-Ladepuffer: 125 mM Tris pH 8,6, 3,5% SDS, 20% Glycerol, 10% β-Mercaptoethanol, 0,2% Bromphenolblau
- 10x SDS-Laufpuffer: 0,25 M Tris, 1,9 M Glycin, 1% SDS
- Low Molecular Weight - Marker (LMW, Pharmacia)

Durchführung:

- Trenngel: Unter ständigem Rühren auf einem Magnetrührer wurden zu 4 ml dH_2O 2,5 ml 1,5 M Tris, 0,1 ml 10% SDS und 3,3 ml 30% Acrylamid/0,8% Bis pipettiert (Gesamtvolumen ~10 ml). Im Anschluß wurden 50 µl 10% APS und 10 µl TEMED zugegeben.

- die Lösung wurde nun sofort zwischen zwei durch Abstandshalter getrennte und an drei Seiten abgedichtete Glasplatten gegossen, ohne dabei Luftblasen einzuschließen.
- mit einer Pipette wurde das Gel nun vorsichtig mit Buthanolwasser überschichtet, um eine glatte Oberfläche zu garantieren.
- Sammelgel: wie beim Trenngel wurden unter Rühren 6,1 ml dH_2O, 2,5 ml 0,5 M Tris, 0,1 ml 10% SDS sowie 1,3 ml 30% Acrylamid/0,8% Bis gemischt und im Anschluß 50 µl 10% APS und 10 µl TEMED zugegeben.
- da APS die Polymerisierungsreaktion der Lösung startet und TEMED diese beschleunigt, dürfen diese beiden Agenzien erst zugesetzt werden, wenn das Trenngel bereits polymerisiert ist, um ein Vermischen der beiden Lösungen zu vermeiden.
- das Sammelgel wurde eingefüllt und ein Kamm mit 10 Zinken eingesetzt.
- nach Polymerisation des Sammelgels wurde dieses in eine Gelkammer eingesetzt und diese mit Laufpuffer gefüllt. Der Kamm wurde entfernt und die Taschen mit einer Nadel gesäubert.
- 10 µl jeder Probe wurden mit 10 µl 2x Ladepuffer versetzt, 3 min bei 95°C denaturiert und in die Geltaschen pipettiert. Gleichzeitig wurden 2µl LMW-Marker mit 8µl dH_2O und 10 µl 2x Ladepuffer gemischt, denaturiert und ebenfalls auf das Gel geladen.
- die Elektrophorese wurde mit 20 mA während der Wanderung durch das Sammelgel und mit 40 mA durch das Trenngel durchgeführt.

2.4.3 Dot Blot

Der Dot Blot erlaubt, ähnlich wie der Western Blot, die eindeutige Identifizierung eines Proteins in einer Lösung mit einem spezifischen Antikörper und einer enzymatischen Farbreaktion. Zum Nachweis von Gp96 wurde der Antikörper anti-GRP94 (SPA-850, Stressgen) aus der Ratte als Erstantikörper sowie ein anti-Ratte IgG Alkalische Phosphatase (AP)-konjugierter Zweitantikörper (Sigma) verwendet.

Material:

- Nitrocellulose-Membran (Sartorius) mit einer Porengröße von 0,2 µm
- 4% Milchpulver in PBS
- Waschpuffer: 2% Milchpulver in PBS, 0,02% Tween 20
- AP-Waschpuffer: 150 mM NaCl, 50 mM Tris-Cl pH 7,5.
- AP-Entwicklungskit (Biorad) mit Lösung A, Lösung B und Entwicklungspuffer.

Durchführung:

- es wurden alle FPLC-Fraktionen geblottet. Die zukünftigen Punkte wurden mit einer Nadel auf der Membran markiert. Sämtliche Schritte wurden bei Raumtemperatur durchgeführt.
- 2 µl jeder Fraktion wurden auf die markierten Punkte aufgebracht.
- nach dem Eintrocknen wurden erneut 2µl jeder Fraktion auf die Punkte pipettiert.
- die Membran wurde für 45 min in 4% Milchpulver in PBS gelegt und somit blockiert.
- die Membran wurde nun in einer Erstantikörper-Verdünnung von 1:10000 in 4% Milchpulver in PBS 30 min unter leichter Agitation inkubiert.
- anschließend wurde die Membran 3 x 2 min mit Waschpuffer gewaschen.
- der Zweitantikörper wurde in einer Verdünnung von 1:5000 in 4% Milchpulver in PBS für 30 min zugegeben.
- erneutes Waschen: 3 x 2 min mit Waschpuffer.
- zweimaliges Waschen mit 150 mM NaCL, 50 mM Tris-Cl pH 7,5
- Farbreaktion: die Membran wurde in 25 ml Entwicklungspuffer + 250 µl Lösung A + 250 µl Lösung B 3 - 10 min im Dunkeln inkubiert. Die Reaktion wurde mit dH_2O gestoppt.

2.4.4 Coomassie-Färbung von SDS - Gelen

Zur Anfärbung der Proteine im SDS-Gel wurde Coomassie Brilliant Blue R-250 verwendet, ein Triphenylmethanfarbstoff, der den Nachweis sehr geringer Proteinmengen möglich macht.

- das Gel wurde ca. 1h unter sanftem Schütteln in die Färbelösung (0,2% Coomassie Brilliant Blue R-250 in Methanol, 20% Essigsäure) gelegt.
- die Entfärbung (in 50% Methanol, 40% dH_2O, 10% Essigsäure) erfolgte ebenfalls unter leichter Bewegung und benötigte ca. 3-4 Stunden.
- nach vollständiger Entfärbung des Gelhintergrundes wurde das Gel mit Wasser gewaschen, auf ein Filterpapier gelegt, mit Cellophan-Folie bedeckt und 120 min bei 65°C im Geltrockner getrocknet.

2.5 Proteinmarkierung

2.5.1 TRITC-Markierung von Hsp60

Der hier zur Proteinmarkierung verwendete Fluoreszenzfarbstoff TRITC (Tetramethylrhodaminisothiocyanat) bindet an die Aminogruppe der Lysine sowie an den N-Terminus des Proteins. Dazu muß die Aminogruppe unprotoniert, d.h. in basischem Milieu vorliegen (pH 8-9). TRITC hat ein Emissionsmaximum bei 580 nm und zwei Adsorptionsmaxima bei 520 und 550 nm. Es wird im FACS-Gerät im Fluoreszenzkanal 2 (FL-2) wie Phycoerythrin gemessen.

Material:

- 100 µl rekombinantes, humanes Hsp60 (Stressgen), 1 mg/ml oder 100 µl rekombinantes, chlamydiales Hsp60 (exprimiert in Bacillus subtilis, zur Verfügung gestellt von Eva Wahlström, Finnland).
- 5 - 10 µl 1M $NaHCO_3$ (pH 8 - 9)
- 10 µl TRITC, 1 mg/ml in DMSO, frisch angesetzt.
- 1M Tris, pH 8
- Sephadex G10 (Pharmacia) in PBS mit Azid

Durchführung:

- 100 µl Hsp60 wurden schrittweise mit 2-10 µg $NaHCO_3$ versetzt, bis der pH-Wert 8-9 betrug.

- TRITC wurde in 1 µl Schritten in einem Lichtschutz-Eppendorf-Gefäß zu Hsp60 gegeben, nach jeder Zugabe wurde gut gevortext.
- diese Mischung wurde ca. 90 min bei Raumtemperatur rotiert.
- durch Zugabe von 40 µl 1M Tris wurde die Reaktion gestoppt und nochmals 30 min rotiert.
- in der Zwischenzeit wurde in einer 5 ml Pipette ein Sephadex G10 - Gelfiltrationsbett gegossen (ca. 2 - 3 ml) und mit PBS äquilibriert.
- die TRITC-Hsp60-Lösung wurde vorsichtig auf die Säule gegeben und die als schwach-rötliche Bande durch das Gelmaterial wandernde Fraktion in einem Eppendorf-Gefäß aufgefangen.
- die Kopplungsausbeute wurde durch den Quotienten aus der OD_{575} (TRITC) und der OD_{280} (Protein) bestimmt und lag zwischen 0,4 und 1,0.

2.5.2 Proteinbestimmung nach Lowry

Konzentrationsbestimmungen für das Hsp60-Protein wurden nach TRITC-Markierungen vorgenommen, um den Verlust nicht-TRITC-markierten Proteins auf der Gelfiltrationssäule abschätzen zu können. Dabei wurde ein modifiziertes Protokoll nach Lowry verwendet (Bio-Rad Detergent Compatible Protein Assay - Kit).

- die Bestimmung wurde in 96-well Rundbodenplatten durchgeführt.
- zu 20 µl der Hsp60-Probe wurden zunächst 10 µl Reagenz A und dann 80 µl Reagenz B pipettiert.
- als Referenzprotein wurde eine Ovalbumin (Sigma) - oder BSA (Sigma) - Verdünnungsreihe (2 - 1,75 - 1,5 - 1,25 - ... - 0,25 - 0 mg/ml) pipettiert.
- nach 15 min Inkubation wurden die Proben bei 750 nm in einem ELISA-Reader gemessen.

2.5.3 Biotinylierung von Gp96

Die Biotinylierung von Gp96 wurde durchgeführt, um im Rahmen der Versuche zur Beladung von Gp96 mit exogenen Peptiden (2.7) verschiedene anti-Gp96 Antikörper auf ihre Fähigkeit überprüfen zu können, Gp96 unter ELISA-Bedingungen zu binden. Dazu wurde ein Protokoll des Herstellers des verwendeten Biotins (Boehringer Mannheim) modifiziert.

Material:

- 50µg Gp96 (entsprechend ~500 pmol), gelöst in 1 ml PBS in einem Eppendorf-Röhrchen
- D-Biotinoyl-ε-Aminocapronsäure-N-Hydroxysuccinimidester (NHS-Biotin) in 10-fachem molarem Überschuß (~1 nmol), gelöst in destilliertem DMF
- Glycin (pH 7,4)

Durchführung:

- zu dem in 1 ml PBS gelösten Gp96 wurden 50 µl NHS-Biotin pipettiert (Volumenverhältnis Biotin/Proteinlösung = 1:20)
- anschließendes Rühren der Lösung für 3h bei Raumtemperatur. Der pH-Wert wurde dabei wiederholt überprüft, da er nicht unter 7 absinken sollte.
- nach dem Rühren wurde ungebundenes NHS-Biotin durch die Zugabe von Glycin (Endkonzentration 20 mM) geblockt. Auf eine Dialyse zur Entfernung ungebundenen Biotins wurde verzichtet, da dieses im ELISA im ersten Waschschritt abgewaschen wird.

2.6 Aktivierungs- / Repräsentationsassays

Im Rahmen der Experimente dieses Teils der vorliegenden Arbeit wurde zum einen versucht nachzuweisen, daß an Gp96-assoziierte, postulierte MHC-Klasse-II Epitope ihren Weg auf den MHC-Komplex professioneller antigen-präsentierender Zellen finden (Repräsentationsassays) und dort von peptidspezifischen T-Zellen erkannt werden.

Zum anderen wurde auf die peptid-unabhängige Wirkung von Gp96 auf dendritische Zellen eingegangen (Aktivierungsassays), die einen wichtigen Einfluß auf die T-Zellaktivierung zu haben scheint.

Um eine Aktivierung von $CD4^+$ T-Zellen durch Gp96-assoziierte Peptide nachzuweisen, wurde auf das gut untersuchte Ovalbumin-Modellsystem zurückgegriffen. Vom Hühnereiweiß Ovalbumin ist sowohl ein MHC-Klasse-I Epitop (SIINFEKL) als auch ein MHC-Klasse-II Epitop (ISQAVHAAHAEINEAGR) bekannt. Mit EG.7-Zellen stand eine Quelle für Gp96 zur Verfügung, dessen Assoziation mit SIINFEKL beschrieben ist (Breloer et al., 1998). Als Effektoren wurden die T-Zellhybridome 3DO und BO97 sowie Lymphozyten aus OT-I und -II Mäusen verwendet. Schließlich stand mit verschiedenen antigenpräsentierenden Zellen (D1, FSDC, BMDC) ein in-vitro und mit OT-I und -II Mäusen ein in-vivo System der T-Zellaktivierung zur Verfügung. Die Aktivierung der T-Zellen wurde anhand ihrer Zytokinproduktion (IL-2 aus $CD4^+$ T-Zellen, IFNγ aus $CD8^+$ T-Zellen) bzw. ihrer Proliferation nachgewiesen. Abbildung 2 faßt den H-2^b-restringierten Teil des Modellsystems zusammen.

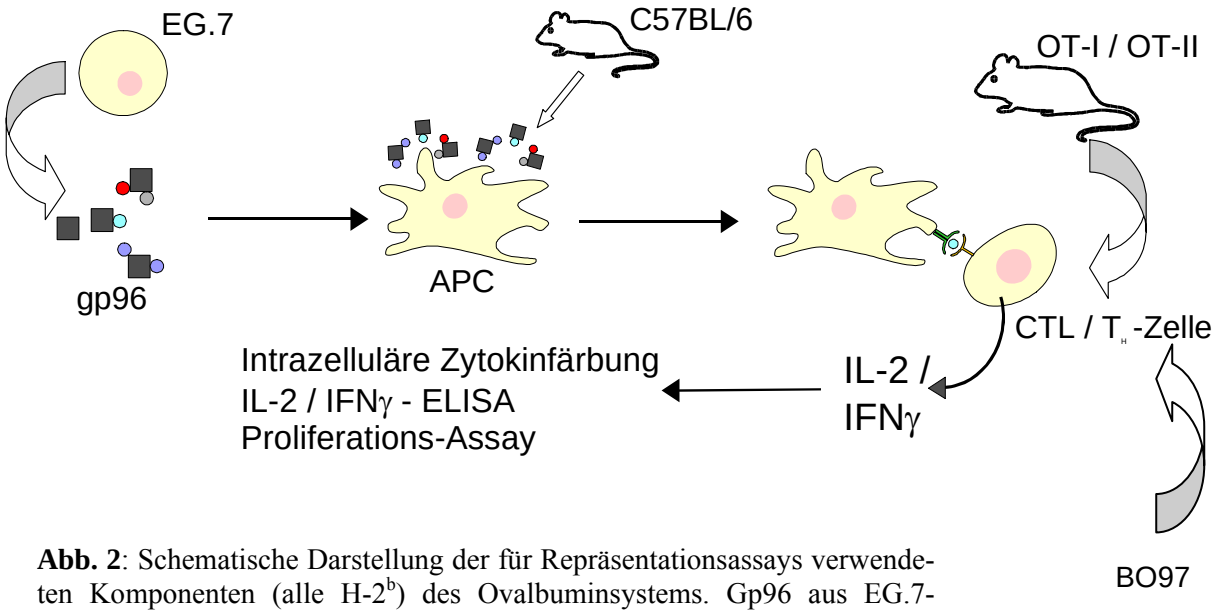


Abb. 2: Schematische Darstellung der für Repräsentationsassays verwendeten Komponenten (alle H-2^b) des Ovalbuminsystems. Gp96 aus EG.7-Zellen wird von APC aus C57BL/6-Mäusen (z.B. BMDC) endozytiert. Die OVA-spezifischen, an Gp96 assoziierten Peptide werden auf MHC-I und -II Molekülen repräsentiert und von Effektoren erkannt. Diese produzieren als Zeichen ihrer Aktivierung Zytokine, welche auf verschiedene Weise nachgewiesen werden können.

2.6.1 Immunisierung von Mäusen - in vivo-System

Die Immunisierung von Mäusen bietet den Vorteil, die Reaktion des Immunsystems auf ein Antigen unter physiologischen, aber dennoch kontrollierten und dadurch modellhaften Bedingungen untersuchen zu können. Im hier präsentierten Versuchsaufbau wurden OT-I-, OT-II- und C57BL/6-Mäuse zunächst mit Gp96 und Kontrollantigenen immunisiert. 10 Tage später wurden die Mäuse getötet und die lymphatischen Organe Milz und Lymphknoten entnommen. Innerhalb dieser Zeit war die Erkennung des Antigens durch den Organismus, seine Prozessierung und Präsentation durch APC und die Entwicklung antigen-spezifischer T-Zellen zu erwarten. Hatte dies in der Maus stattgefunden, so sollten diese (dann Gedächtnis-) T-Zellen durch erneute Konfrontation mit dem Antigen mittels APC aktivierbar sein. Die Restimulation erfolgte für 1-3 Tage in Kultur, die Aktivierung wurde durch Proliferationsassays (2.6.3), intrazelluläre Zytokinfärbung (2.2.2) oder ELISA (2.6.5) nachgewiesen.

Obwohl beinahe jede Substanz vom Organismus als Antigen erkannt werden kann, wird ihre Immunogenität entscheidend durch ihre Struktur, Herkunft, Komplexität und Größe bestimmt. Zudem entscheidet der Ort der Applikation und die Dosis des Antigens über die Art der hervorgerufenen Immunantwort (produzierter Immunglobulintyp, involvierte Zellen, etc.). Intraperitoneal und subkutan applizierte Antigene werden schnell in die Milz und in regionale Lymphknoten transportiert, wobei die subkutane Applikation zu einer kontinuierlichen Freisetzung des Antigens und zu einer starken Immunantwort führt. Sehr hohe wie auch sehr niedrige Dosen können jedoch eine Immunantwort unterdrücken (Toleranzentwicklung).

Peptide gelten als wenig immunogen. Eine mögliche Erklärung ist, daß sie zwar von Makrophagen phagozytiert werden, jedoch nicht die für eine T-Zellstimulation notwendige Expression kostimulatorischer Moleküle induzieren. Für eine erfolgreiche Immunisierung wird das Peptid daher in einem Adjuvans gelöst, das eine lokale, sterile Entzündungsreaktion auslöst und so für eine unspezifische Grundaktivierung des Immunsystems sorgt. Der adjuvante Effekt kann durch Einbringen des Antigens in Öl-in-Wasser- oder Wasser-in-Öl-Emulsionen, durch Bindung an Liposomen, Adsorption an krystalline oder amorphe Strukturen (Mineralsalze, $Al(OH)_3$, $AlPO_4$) oder gleichzeitige Gabe mikrobakterieller Produkte (LPS, hitzeinaktivierte Mykobakterien) erzielt werden. Die

meisten Adjuvantien binden dabei lösliche Antigene an partikuläre Strukturen, die leichter durch Makrophagen phagozytiert werden. Öl-Emulsionen haben zudem einen Depoteffekt.

Die folgenden Adjuvantien wurden verwendet:

- Freund's Adjuvant Complete (Sigma): enthält 1 mg/ml hitzeinaktiviertes Mycobacterium Tuberculosis; für Öl-Emulsionen;
- Freund's Adjuvant Incomplete (Sigma): enthält Paraffin-Öl für Wasser-in-Öl-Emulsionen
- Titermax Gold (Sigma): enthält ein Copolymer, Squalen (ein metabolisierbares Öl) und einen Stabilisator; für Wasser-in-Öl-Emulsionen;

Durchführung:

- 0,5 ml Peptid (1 mg/ml in PBS) wurde mit 0,5 ml Adjuvans gemischt. Dazu wurden beide Phasen wiederholt zwischen zwei mit einem Dreiwegehahn verbundenen 5 ml - Spritzen hin- und hergedrückt, um eine Emulsion herzustellen.
- 30 µg Gp96 wurden in 400 µl PBS aufgenommen.
- die Peptid-Emulsionen wurden den Mäusen subkutan entweder an der Schwanzwurzel (tail-base) oder am Nacken (neck) injiziert. (Injektionsmenge ca. 0,1 - 0,2 ml)
- Gp96 wurde ohne Adjuvans intraperitoneal appliziert.
- nach 10 Tagen wurden den Mäusen Milz- und Lymphknoten entnommen (2.1.4). In einer 96-well Flachbodenplatte wurden 3 x 10^5 und 1 x 10^5 Zellen/well mit unterschiedlichen Peptidkonzentrationen für 1 - 3 Tage inkubiert (Gesamtvolumen: 200 µl/well). Zusätzlich wurden die Zellen zur Kontrolle mit unterschiedlichen Konzentrationen ConA stimuliert.
- für die Kultur von $CD4^+$ T-Zellen wurde dem Medium 10% Pferdeserum anstelle 10% FCS zugesetzt.

2.6.2 Repräsentationsassay - in vitro-System

Repräsentationsassays wurden nach einem einheitlichen Protokoll, jedoch mit verschiedenen Kombinationen aus APC (D1, BMDC, FSDC) und Effektoren (3DO, OT-I/-II T-Zellen) durchgeführt. Dabei wurden auch verschiedene APC : Effektor - Mengenverhältnisse getestet. Eventuelle Abweichungen vom unten beschriebenen Protokoll sind bei den Ergebnissen detailliert aufgeführt.

- verschiedene Mengen APC (z.B. 5000, 25000 und 50000 D1-Zellen) wurden mit unterschiedlichen Konzentrationen Gp96 (2,5 , 5 und 10 µg) in 96-well Rundbodenplatten (50 µl Volumen/well) für 2 Stunden bei 37°C inkubiert.
- die APC wurden daraufhin 4 mal mit Medium gewaschen. Die Wells wurden dafür mit Medium gefüllt, die Platten dekantiert und auf einem mit Ethanol getränkten Tuch abgewischt. Da alle verwendeten APC adherent waren, gingen beim Dekantieren keine Zellen verloren.
- einer zuvor getöteten Maus wurde die Milz entnommen und eine Zellsuspension vorbereitet. Alternativ wurden Effektoren aus der Zellkultur verwendet. Die Zellen wurden gezählt und so eingestellt, daß sich in 100 µl Medium die gewünschte Zellzahl befand. Bei Zellen aus OT-I/-II Mäusen, bei denen aus FACS-Analysen der ungefähre Prozentsatz an T-Lymphozyten in der Milz bekannt war, wurden eine Zellzahl verwendet, die auf die gewünschte Zahl T-Lymphozyten pro well schließen ließ (z.B. 6,25 x 10^5 Milzzellen/well entsprechend 2,5 x 10^5 T-Zellen).
- die Effektoren wurden in 100 µl Medium zu den APC gegeben und 12 Stunden inkubiert.
- zunächst wurden 100 µl Medium/well abgenommen und für einen späteren Zytokin-ELISA eingefroren.
- anschließend wurden 100 µl Medium mit Brefeldin A oder Monensin (0,67 µl/ml) pro well pipettiert und die Zellen erneut für 3 - 5 Stunden bei 37°C inkubiert.
- im Anschluß wurde eine intrazelluläre Zytokinfärbung durchgeführt (2.2.2).

2.6.3 Zellproliferationsassays mit BrdU

Proliferierende Zellen synthetisieren DNA. Die bislang am häufigsten verwendete Methode, dies zum Nachweis proliferierender Zellen auszunützen, ist die Inkorporation von radioaktiv-markiertem Thymidin ([^{3}H]-Thymidin) während der DNA-Synthese. Um die Arbeit mit Radioaktivität zu umgehen, besteht auch die Möglichkeit, 5-Brom-2'-Desoxyuridin (BrdU), ein Pyrimidin-Analogon, anstelle von Thymidin in die DNA einbauen zu lassen. Die Zellen werden anschließend fixiert und ihre DNA denaturiert, so daß ein Peroxidase-markierter anti-BrdU Antikörper an das inkorporierte BrdU binden kann. Dies wird schließlich durch eine enzymatische Reaktion nachgewiesen. Es wurde der Cell Proliferation ELISA, BrdU (colorimetric) - Kit (Boehringer Mannheim) verwendet.

- nach Stimulierung der Zellen in 96-well-Platten wurden zu 150 µl Medium/well 15 µl BrdU labeling-Lösung pipettiert. Es folgten 22 Stunden Inkubation.
- die Zellen wurden im Anschluß zentrifugiert (1500 U/min, 10 min) und der Überstand verworfen. Die Zellen gingen dabei nicht verloren.
- die Platten wurden 60 min in einem Ofen bei 56°C getrocknet.
- anschließend wurden 200 µl/well FixDenat-Lösung zugegeben, 30 min bei Raumtemperatur (RT) inkubiert und der Überstand verworfen.
- es wurden nun 100 µl/well anti-BrdU-POD (1:100 Verdünnung einer 1000x-Stammlösung) pipettiert und 2 Stunden bei RT inkubiert.
- es erfolgte dreimaliges Waschen mit 200 µl/well Wasch-Lösung.
- 100 µl/well Substrat-Lösung wurden zugegeben und die Platten nach 30 min Inkubation bei RT in einem ELISA-Reader bei 370 nm gemessen.

2.6.4 Aktivierung dendritischer Zellen

Dendritische Zellen (DC) sind die potentesten antigen-präsentierenden Zellen des Immunsystems. Im nativen Zustand dienen sie der Antigenaufnahme, durch die sie gleichzeitig aktiviert werden und reifen, um dann ausschließlich der Antigenpräsentation zur

Verfügung zu stehen. In Zusammenarbeit mit Harpreet Singh und Norbert Hilf aus der Arbeitsgruppe wurde die Wirkung von Gp96 auf die Aktivierung von DC untersucht. Dazu wurde hier speziell das Zytokinmuster Gp96-aktivierter DC bestimmt.

- humane DC (hergestellt von H.Singh) sowie BMDC wurden in 96-well Platten mit unterschiedlichen Konzentrationen Gp96 inkubiert.
- um eine Verunreinigung der Gp96-Proben durch Endotoxine (z.B. LPS) auszuschließen, wurden Kontrollaktivierungen mit gekochtem Gp96 (20 min, 95°C) sowie LPS (aus Salmonella typhimurium, Sigma) durchgeführt. LPS ist hitzestabil und sollte durch Kochen der Probe nicht zerstört werden.
- nach Inkubation der DC wurden 100 µl Überstand abgenommen und mittels ELISA auf verschiedene Zytokine hin untersucht.
- durch Zugabe von BAPTA-AM (Sigma), einem intrazellulären Ca^{++}-Chelator, zum Inkubationsmedium (N.Hilf) wurde die Abhängigkeit der DC-Aktivierung vom intrazellulären Calcium-Gehalt bestimmt.

2.6.5 Sandwich - ELISA zum Zytokinnachweis

Für diesen Zytokinnachweis wurde zu Anfang für (m)-IL-2 ein Kit (Biotrak) und anschließend für IL-2 und alle anderen gemessenen Zytokine (IL-6, IL-10, IL-12(p40), IFN-γ, TNF-α) ein eigenes Protokoll verwendet. Das Prinzip beruht auf der Bindung eines Antikörpers (Capture) an eine speziell beschichtete 96-well Platte (NUNC Maxisorb) und der anschließenden Blockierung noch vorhandener Bindungsstellen. Das zu untersuchende Medium wird zugegeben, so daß die darin enthaltenen Zytokine an den Antikörper binden können. Nicht gebundene Moleküle werden abgewaschen und ein ebenfalls zytokinspezifischer, biotinylierter Zweitantikörper (Detection) zugegeben. Dieser kann mittels Streptavidin, an das eine Peroxidase gekoppelt ist, in einer enzymatischen Reaktion nachgewiesen werden. Substrat ist ABTS (2,2‘-Azino-bis (3-Ethylbenzthiazoline) -6-Sulfonsäure, Sigma), ein Diammonium Salz, das bei 415 nm gemessen wird. Um die geeigneten Antikörper-Konzentrationen zu finden, wurden verschiedene Verdünnungskombinationen von Capture- und Detection-Antikörper sowie

der Streptavidin-Peroxidase mit einem Standard (rekombinantes Zytokin) getestet (Daten nicht gezeigt). Dabei stellten sich folgende Verdünnungen als optimal heraus:

Capture-AK: 1:500 entsprechend 1-4 µg/ml Konz.
Detection-AK: 1:1000 entsprechend 0,25 - 2 µg/ml Konz.
Streptavidin-Peroxidase: 1:750 (keine Konzentrationsangabe des Herstellers)

Alle Antikörperpärchen, die rekombinanten Standards sowie die Streptavidin-Horseradishperoxidase (HRP) stammten von Pharmingen.

Material:

- Bindungspuffer: 0,1 M Na_2HPO_4, pH 9,6
- Blockierungspuffer: PBS, 1% BSA (frisch angesetzt)
- Waschpuffer: 0,5 ml Tween 20 in 1 l PBS
- Blockierungspuffer / Tween: 0,5 ml Tween 20 in 1 l Blockierungspuffer
- Substrat-Puffer: 150 mg ABTS in 500 ml 0,1 M Zitronensäure in dH_20, pH 4,35; 11 ml Aliquots wurden bei -20°C gelagert.
- 30% H_2O_2 (Sigma)

Durchführung:

- Coating: der Capture-Antikörper wurde in Bindungspuffer verdünnt und 50 µl/well auf die Platte pipettiert. Inkubation über Nacht bei 4°C.
- 4 x Waschen der wells mit 200 µl Waschpuffer. Dazu wurden die Wells gefüllt, die Platte über dem Ausguß ausgeschleudert und auf einem Tuch ausgeklopft.
- nun wurden 200 µl/well Blockierungspuffer zugegeben. Inkubation 1 Stunde, 37°C.
- 3 x Waschen der wells (s.o.)
- die Verdünnung der Standards (8, 4, 2, ..., 0,016, 0,008, 0 ng/ml) erfolgte in dem Medium, in dem auch die Zellen inkubiert worden waren. Zugabe von 50 µl/well, Inkubation 2 Stunden bei 37°C.
- 4 x Waschen der wells (s.o.)
- Detection: der Detection-Antikörper wurde in Blockierungspuffer / Tween verdünnt und 50 µl/well pipettiert. Inkubation 1 Stunde bei Raumtemperatur.
- 6 x Waschen der wells (s.o.)

- Streptavidin-HRP wurde in Blockierungspuffer / Tween verdünnt und 100 µl/well zugegeben. Die Platten wurden so 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert.
- 8 x Waschen der wells (s.o.)
- 20 Minuten vor Gebrauch wurde ein Aliquot ABTS-Substrat-Lösung pro Platte aufgetaut. Es wurden 10 µl 30% H_2O_2 zu einem Aliquot Substrat-Lösung pipettiert, kurz gevortext und sofort 100 µl/well auf die Platte pipettiert. Nach ca. 30 min lichtgeschützter Inkubation wurde die Farbreaktion bei 415 nm gemessen. Da die Reaktion nicht gestoppt wurde, wurden Messungen 30, 40 und 50 Minuten nach Substratzugabe durchgeführt.

2.7 Gp96 - Beladungsassay

Die Beladung des Hitzeschockproteins Gp96 mit exogenen Peptiden unter Verwendung radioaktiv-markierter Peptide ist in der Literatur beschrieben (Blachere 1997). Der Gp96-Beladungsassay setzt sich zusammen aus der eigentlichen Beladung sowie einem Nachweis, daß das Peptid auch tatsächlich an Gp96 gebunden hat. Es wird angenommen, daß die von Gp96 unter physiologischen Bedingungen gebundene Peptidmenge pro Molekül mit 1-2 ng sehr gering ist (1.4.2). Um eine derart geringe Menge Peptid bei gleichzeitiger Vermeidung von Radioaktivität nachweisen zu können, wurde hier ein Europium ELISA - System gewählt, mit dem bereits Peptidbindungsstudien an MHC-Molekülen durchgeführt wurden (Jensen 1998). In Anlehnung an Blachere 1997 wurde folgendes Protokoll für die eigentliche Beladung entworfen:

- 10 pmol Gp96 (~ 1 µg) wurden mit 25, 75 und 125 pmol des biotinylierten Ovalbumin MHC-Klasse-II Epitops in einem Bindungspuffer (20 mM Hepes, pH 7,2, 20 mM NaCl, 2mM $MgCl_2$) 1:1 gemischt (10 µl Gp96, 10 µl Peptid).
- dieses Gemisch wurde 10 min auf einem Rüttler auf 60°C erhitzt und anschließend für 30 min bei Raumtemperatur abgekühlt. Dies sollte zunächst die endogen gebundenen Peptide von Gp96 lösen, so daß während der Abkühlphase die im Überschuß vorhandenen markierten Peptide binden konnten.

- in der Zwischenzeit wurden 3 Microcons 50 (Amicon) mit 400 µl 0,2 M Glycin zentrifugiert (Minifuge, 12000 U/min, 8 min) und so unspezifische Bindungsstellen blockiert.
- das Gp96-Peptidgemisch wurde in jeweils 400 µl Bindungspuffer aufgenommen, auf die Microcons überführt und zentrifugiert (12000 U/min, 4 min)
- es folgte 5-maliges Nachpuffern mit je 400 µl Bindungspuffer.
- Gp96 wurde von der Membran der Microcons nun mit 200 µl Bindungspuffer abgenommen und auf eine ELISA-Platte überführt (siehe Europium-ELISA).

2.7.1 Europium - ELISA (time-resolved fluorometry)

Der Europium-ELISA ist ein Sandwich-ELISA, bei dem durch Europium-markiertes Streptavidin ein biotinyliertes Protein oder Peptid auf einer ELISA-Platte nachgewiesen wird. Die Vorteile des Lanthanids Europium liegen in folgenden Punkten:

- Lanthanide haben einen großen Stoke's Shift, d.h. Exzitationswellenlänge und Emissionswellenlänge liegen weit auseinander. Zudem besitzen sie einen sehr scharfen Emissionspeak. Auf diese Weise sind beide Lichtimpulse für ein Meßgerät gut zu unterscheiden.
- Das an Streptavidin gebundene Europium hat in gebundenem Zustand praktisch keine fluoreszenten Eigenschaften. Durch Zugabe einer Lösung niedrigen pH's dissoziiert Europium jedoch innerhalb weniger Minuten von Streptavidin und bildet stabile Chelate innerhalb schützender Mizellen mit Komponenten der Lösung. Die Fluoreszenz des Chelats ist dabei um das Ein-Million-fache verstärkt.
- Ein spezielles Fluoreszenzmeßgerät (DELFIA-Fluorometer, Wallac) mißt die Fluoreszenzimpulse zwischen 400 und 800 µs nach der Exzitation (time-resolved fluorometry). Zu diesem Zeitpunkt ist kurzlebige, unspezifische Fluoreszenz bereits abgeklungen. Dies erhöht die Sensitivität der Messung.

Für die Durchführung wurde DELFIA Wash concentrate, DELFIA Eu-Labelled Streptavidin, DELFIA Assay Buffer sowie DELFIA Enhancement Solution verwendet (Wallac).

Durchführung:

- eine mit anti-Gp96-Antikörper gecoatete 96-well-Platte wurde 2x mit 200 µl/well Waschpuffer gewaschen. Als Antikörper wurden anti-GRP94 (Stressgen) sowie anti-Gp96 (Klon B10C oder G12D, (Arnold-Schild et al., 2000)) getestet.
- unspezifische Bindung wurde geblockt durch Zugabe von 200 µl/well Blockierungsreagenz für ELISA (Boehringer Mannheim) oder PBS, 1% BSA. Inkubation 1 Stunde bei 37°C.
- 2 x Waschen (s.o.)
- mit einem biotinylierten Peptid beladenes Gp96 sowie reines biotinyliertes Peptid (Positivkontrolle des Assay) wurden in 100 µl/well zugegeben und 2 Stunden bei 37°C inkubiert.
- 4 x Waschen (s.o.)
- Eu-Streptavidin wurde 1:1000 in Assaypuffer verdünnt (entspricht 5 ng/well) und 100 µl/well zugegeben. Inkubation 90 min bei Raumtemperatur.
- 4 x Waschen (s.o.)
- nun wurden 100 µl/well Enhancement Solution pipettiert und die Ansätze nach 2 min bei 615 nm gemessen.

2.8 Peptidextraktion von MHC-Klasse-I Molekülen und ihre Analyse

Die Aufreinigung des Schweine-MHC-Klasse-I Moleküls PD1 und die Extraktion der gebundenen Peptide erfolgte nach einer Modifikation des klassischen Verfahrens nach Rammensee, Falk und Rötzschke (Falk et al., 1991).

Ein Detergenzlysat PD1-exprimierender Zellen (A505, PD1.1) wurde mit einem PD1-spezifischen Antikörper versetzt. Anschließend wurde das Lysat über eine ProteinA-Sepharose Affinitätschromatographie-Säule zirkuliert, an die der Antikörper bei pH 8 bindet. Das Staphylococcus aureus - Oberflächenprotein A bindet mit hoher Affinität den Fc-Teil vieler Antikörperklassen. Die Elution erfolgte bei saurem pH (pH 3). Die gebundenen Peptide wurden mit 25% Trifluoressigsäure (TFA) von den MHC-Molekülen gelöst und mittels Filtration (10 kDa Centricons) von höhermolekularen Bestandteilen (MHC, Antikörper) getrennt. 50 µl des ersten Eluats der Säule wurden abge-

nommen, so daß durch ein Ansequenzieren der ersten fünf Aminosäuren der enthaltenen Proteine auf die Menge an im Eluat vorhandenen MHC-Molekülen geschlossen werden konnte. Das Peptidgemisch wurde nun entsalzt und dann entweder mit einer RP-HPLC (SMART-System, Pharmacia) fraktioniert (Identifikation von Einzelliganden) oder als Peptidpool durch Edman-Abbau sequenziert (Bestimmung des Bindungsmotivs).

2.8.1 Aufreinigung von PD1 mit ProteinA-Sepharose

Material:

- 2 x Aufschlußpuffer (AP): PBS / 1,2 % CHAPS / 6 „complete“-Proteinaseinhibitortabletten (Boehringer Mannheim)
- Elutionspuffer: PBS / 50 mM Na-Citrat / 0,02 % Azid / pH 3
- 25 % Trifluoressigsäure (TFA)

Durchführung: (alle Schritte bei 4°C)

- 45 ml Zellpellet wurden aufgetaut, 1:1 mit 2 x AP versetzt und 30 min gerührt. Im Anschluß wurden nochmals 45 ml AP zugegeben.
- das Lysat wurde in einem Dounce-Homogenisator so lange homogenisiert, bis der kleine Kolben (S) leichtgängig war und dann weitere 60 min gerührt.
- nach Zentrifugation (Megafuge, 4000 U/min, 20 min, 4°C) wurde der Überstand in Ultrazentrifugen-Röhrchen gefüllt und erneut zentrifugiert (40000 U/min, 60 min, 4°C, Rotor Ti-45).
- der Überstand wurde mit einem 0,2 µm-Filter steril filtriert.
- in einem Erlenmeyerkolben wurde zum Lysat nun 3 ml Mausaszitesflüssigkeit (enthält den anti-PD1-Antikörper PT85 (IgG2a), zur Verfügung gestellt von Rachel Ehrlich, Tel Aviv; (Oleksiewicz et al., 2002)) zugegeben und 30 min gerührt.
- in der Zwischenzeit wurde eine ProteinA-Sepharose Säule vorbereitet (ca. 4 ml Säulenvolumen) und mit Aufschlußpuffer äquilibriert.
- das Lysat wurde über Nacht mit einer elektrischen Pumpe über die Säule zirkuliert (Fließgeschwindigkeit 2 ml/min).
- die Säule wurde nun ca. 20 min mit PBS gewaschen.

- zur Elution wurden 3 ml Elutionspuffer auf die Säule gegeben. Beim Durchlauf wurden die ersten 0,5 ml verworfen und der Rest in 15 ml Falconröhrchen gesammelt.
- 50 µl wurden zum Ansequenzieren abgenommen, der Rest mit 20 µl 25 % TFA versetzt und auf ein Centricon aufgetragen. Dieses wurde ca. 2 Stunden bei 4000 U/min in der Tischzentrifuge zentrifugiert und anschließend bei -20°C eingefroren.
- der Filter des ersten Centricons ließ sich mit einem heißen Skalpell ausschneiden, zerkleinern und in SDS-Probenpuffer (2.4.2) 3 min kochen. Das so erhaltene Proteingemisch wurde in verschiedenen Verdünnungen auf ein 10 % SDS-Gel aufgetragen.
- nach der Elution wurde die Säule 30 min mit AP gespült und erneut beladen. Insgesamt wurden drei Zyklen durchgeführt.
- zum Entsalzen des Centricon-Filtrats wurde eine RP-C18 Säule zunächst mit 0,5 ml 50% Acetonitril/0,1% TFA gewaschen und anschließend mit 0,5 ml H_2O/0,1% TFA äquilibriert. Jede der drei Proben wurde je zweimal auf die Säule geladen. Nach zweimaligem Waschen mit 0,5 ml H_2O/0,1% TFA wurde mit 0,1 ml 50% Acetonitril/0,1% TFA eluiert. Für den SMART-HPLC-Lauf wurde das Eluat nun 1:5 mit H_2O/0,1% TFA verdünnt.

2.8.2 Poolsequenzierung der extrahierten Peptide

Je nach Expression der MHC-Moleküle auf der Zelloberfläche und der damit korrelierenden Menge der extrahierbaren Peptide kann entweder eine Einzelligandenbestimmung versucht oder eine Bestimmung des Bindungsmotivs mittels Poolsequenzierung angestrebt werden. Im Falle der A505-Zellen zeigte bereits das Ansequenzieren des MHC-Peptid-Antikörpergemischs nach der ersten Elution lediglich verschwindend geringe Mengen MHC-Moleküle, so daß direkt eine Poolsequenzierung ohne vorherige HPLC-Auftrennung angeschlossen wurde. Das Peptidgemisch wurde dazu in einer speed-vac (Vacuum Concentrator, Bachofer, Reutlingen) eingeengt und einem automatisierten Edman-Abbau auf einem „pulsed liquid“ Proteinsequenator 494A „Procise“ (Applied Biosystems, Weiterstadt) unterzogen.

2.8.3 Bestimmung natürlicher PD1-Liganden

Aufgrund der höheren PD1-Expression der PD1.1-Zellen (siehe 3.4.1) wurde das Eluat aus der Aufreinigung aus diesem Zelltyp nach dem Entsalzen einer Fraktionierung durch eine reversed-phase HPLC zugeführt. Dazu wurde eine µRPC C2/C18, SC 2.1/10 -Säule (Pharmacia) sowie die Puffer „A“ (0,1% TFA in Wasser) und „B“ (80% Acetonitril, 0,08% TFA in Wasser) verwendet. Die Flußrate betrug 150 µl/min, der Gradient ist in Tabelle 1 dargestellt und auf dem Chromatogramm in Abb. 25 zu sehen.

Tabelle 1: Gradient für SMART RP-HPLC

Zeit (min)	Konzentration Puffer „B“ (%)
0	10
25	20
45	40
55	60
60	75
65	75
70	100
80	100

Äquilibriert wurde mit 10% Puffer „B“ bis die Absorption bei 214 nm konstant war. Fraktionen mit einem deutlichen Peak im Chromatogramm wurden anschließend in einer speed-vac eingeengt, in 50% Methanol/50% H_2O, 1% Ameisensäure gelöst und über Nanoflow-ESI-Q-Tof-Massenspektroskopie analysiert (durchgeführt von Toni Weinschenk, Tübingen). Die Datenaufnahme und Prozessierung erfolgte über die Software MassLynx NT.

2.9 Verzeichnis verwendeter synthetischer Peptide

Die verwendeten, unten aufgeführten synthetischen Peptide wurden im Labor von Dr. Stefan Stevanovic mit einem Peptidsynthesizer 432A (Applied Biosystems, Weiterstadt) nach der Fmoc / tBu - Strategie hergestellt.

Tabelle 2: synthetische Peptide im single amino acid letter code (siehe Anhang)

Peptid	**Herkunft**
SIINFEKL	Ovalbumin (257-264)
ISQAVHAAHAEINEAGR	Ovalbumin (323-339)
RGYVYQGL	Vesicular stomatitis Virus (52-59)
ISQAVHAAHAEINEAGR - biotinyliert	Ovalbumin (323-339)

3 Ergebnisse

3.1 Versuche zum Nachweis von Gp96-assoziierten MHC-II Epitopen

3.1.1 Isolierung von Gp96

Im Verlauf der Arbeit wurden zwei Gp96-Isolierungen aus EG.7-Zellen durchgeführt: Aufreinigung 1 erbrachte 3 mg Gp96 aus 44 ml Zellpellet. Stellvertretend auch für Aufreinigung 2, die 1,62 mg Gp96 aus 42 ml Zellpellet erbrachte, sind das FPLC-Chromatogramm (OD_{280}) und das dazugehörige SDS-Gel der Aufreinigung 1 dargestellt (Abb. 3-4). Das Profil zeigte in dem für Gp96 typischen Bereich einen hohen Peak (Fraktionen 29-34), der sich bis Fraktion 41 weiterzieht. Das SDS-Gel wies Gp96 in den Fraktionen 30-34 in den höchsten Konzentrationen nach, die Fraktionen 35-41 enthielten graduell weniger Gp96. Die Verteilung über einen breiten Fraktionsbereich läßt auf unterschiedliche Glykosilierungsmuster und Peptidbindungen des Proteins schließen. Im SDS-Gel waren unter den Fraktionen 30-34 Degradationsbanden sichtbar. Im Bereich von 27 kDa war eine Untereinheit des ConA-Tetramers zu sehen. Die Fraktionen 30 und 31 (ca. 1,8 mg) sowie 32-36 (ca. 1,25 mg) wurden gepoolt, aliquotiert und eingefroren.

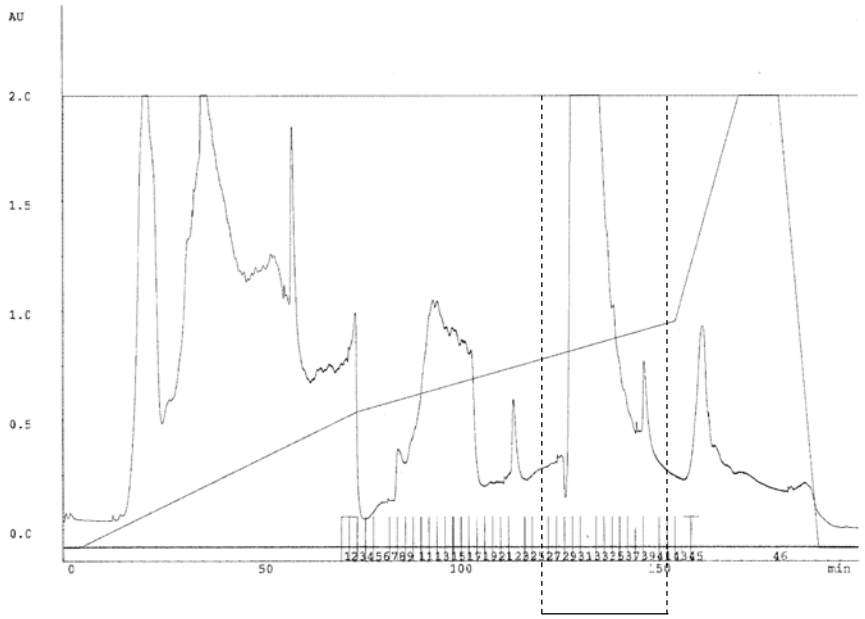


Abb. 3:
FPLC-Profil der Aufreinigung 1 (OD_{214} gegen Elutionszeit). Markiert ist der Bereich der Fraktionen 26-41, die auf das SDS-Gel aufgetragen wurden. Überlagert ist der Gradient des Puffers B.

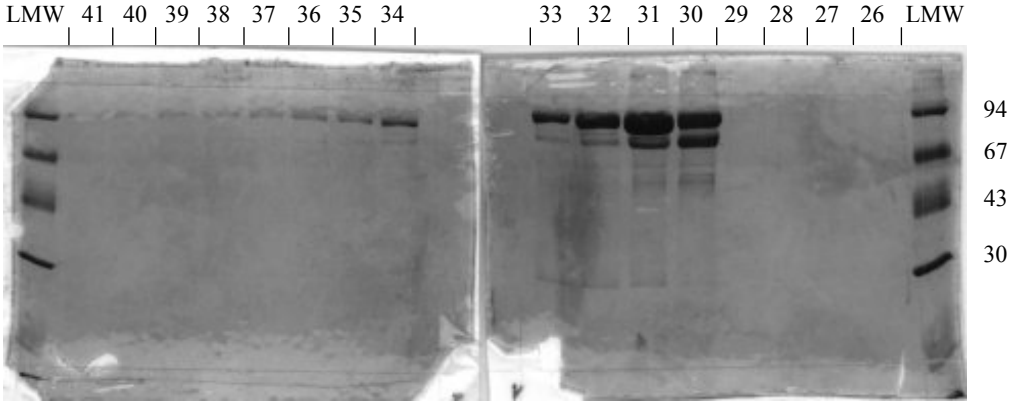


Abb. 4: 10% SDS-Gel der Fraktionen 26-41. Degradationsbanden sind besonders in den Fraktionen 30-34 sichtbar. Die Fraktionen 31-33 zeigen ConA-Banden. LMW = low molecular weight marker

3.1.2 Schwache Aktivierbarkeit der T-Zellhybridome 3DO und BO97

Da die T-Zellhybridome 3DO und BO97 als Effektoren des Modellsystems Gp96-assoziierte, von APC repräsentierte Peptide auf MHC-Klasse-II Molekülen erkennen sollten, wurde zunächst ihre Aktivierbarkeit durch mit synthetischem Peptid beladene APC getestet. Diese Stimulation war die Positivkontrolle der späteren Repräsentationsassays. Es zeigte sich jedoch, daß sich beide Hybridome nur wenig zur IL-2 Produktion anregen ließen (Abb. 5). 2 x 10^5 Milzzellen (C57BL/6 bzw. BALB/c) wurden hierfür 24 Stunden mit 1 x 10^5 Hybridomzellen und einer Titration des $Ova_{323-339}$ -Peptids inkubiert. IL-2 wurde mittels ELISA in den Überständen der Ansätze gemessen. 3DO-Zellen zeigten dabei eine stärkere Antwort als das Hybridom BO97. Insgesamt war diese Antwort jedoch sehr gering vor dem Hintergrund der Überlegung, daß wahrscheinlich nur wenig Gp96-assoziiertes Peptid repräsentiert wird, die verwendete Peptidmenge im Vergleich dazu hier jedoch sehr hoch (100 µM) war. Das Peptid alleine führte zu keiner Milzzellproliferation. ConA, das durch eine Vernetzung der T-Zellrezeptoren wirkt, aktivierte die Hybridome im selben Versuch nicht, die Milzzellen dagegen stark (nicht gezeigt).

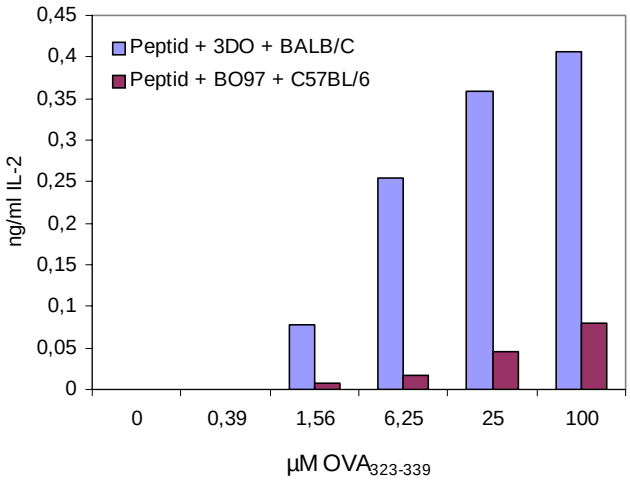
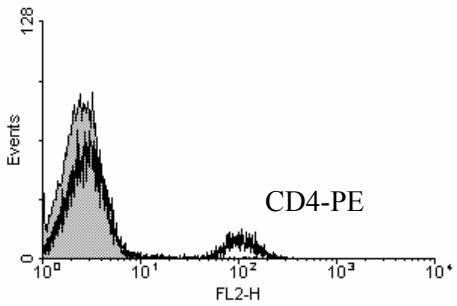


Abb. 5: IL-2 Produktion von 1 x 10^5 peptidstimulierten Hybridomzellen. ConA-Stimulation der Milzzellen führte zu Werten bis 3 ng/ml. Gezeigt sind Mittelwerte von Doppelbestimmungen

Diese geringe Aktivierbarkeit ließ sich durch eine FACS-Färbung der Oberflächenmarker CD4 (-PE) und αβ-TCR (T-Zell-Rezeptor, -FITC) erklären. Es zeigte sich eine deutlich niedrige Expression dieser beiden für eine erfolgreiche Aktivierung notwendigen Moleküle auf 3DO-Zellen (Abb. 6) und BO97-Zellen (identisch, daher nicht gezeigt). Viele Zellen exprimierten weder CD4 noch den TCR. Zu einem späteren Zeitpunkt konnte ein Klon des Hybridoms 3DO (3DO-54.8) von A. Reske-Kunz, Mainz übernommen werden, der CD4 sowie den TCR wesentlich besser exprimierte und in den darauffolgenden Versuchen eingesetzt wurde (Abb. 7).



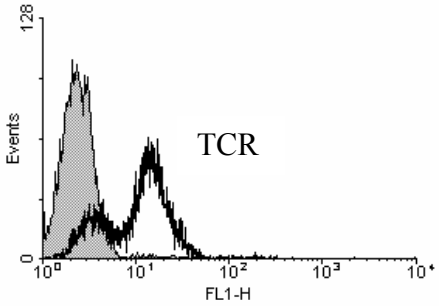
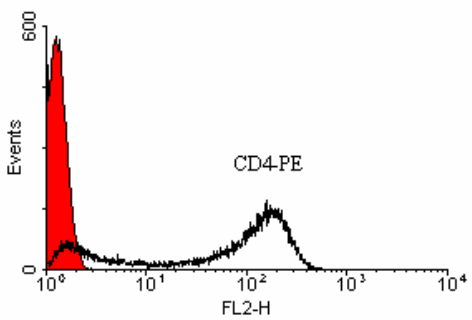


Abb. 6: niedrige Expression der Marker CD4 und TCR auf 3DO-Zellen.



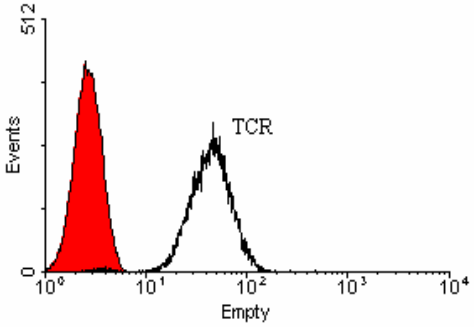


Abb. 7: alle 3DO-54.8 Zellen exprimierten den TCR (αβ), ca. 60% waren $CD4^+$.

3.1.3 Das T-Zellrepertoire von OT-I und -II Mäusen

Die im Rahmen der Zucht durchgeführten FACS-Färbungen von Lymphozyten aus Schwanzblut der Mäuse dienten der Überprüfung der Transgenität der Tiere. Zudem gaben sie einen Überblick über die Anzahl Ovalbumin-spezifischer T-Lymphozyten in diesen Mäusen. Abb. 8 zeigt Einfach- und Doppelfärbungen der Lymphozytenpopulationen im Blut von OT-I und -II Mäusen mit den Markern CD8-PE, CD4-PE, $V_\alpha 2$-FITC und $V_\beta 5$-FITC. Homozygote OT-II Mäuse besaßen zwischen 32 und 45% $CD4^+$ T-Zellen, die gleichzeitig den Ovalbumin-spezifischen T-Zellrezeptor exprimierten. Die meisten OT-I Mäuse hatten Expressionen der Kombination CD8 / $V_\alpha 2$ oder $V_\beta 5$ von 27 bis 45 %, jedoch gab es einige Mäuse, bei denen bis zu 96% der Lymphozyten diese Kombination exprimierten. Es ist nicht klar, ob dieser Unterschied Rückschlüsse auf die Hetero- oder Homozygotie zuläßt. Die CD4-Population transgener OT-I Mäuse betrug 3% der Lymphozyten. Normale C57BL/6-Mäuse hatten ca. 28% $CD4^+$ T-Lymphozyten im Blut, davon exprimieren ca. 5% CD4 und $V_\alpha 2$ und 2% CD4 und $V_\beta 5$ (Daten nicht gezeigt).

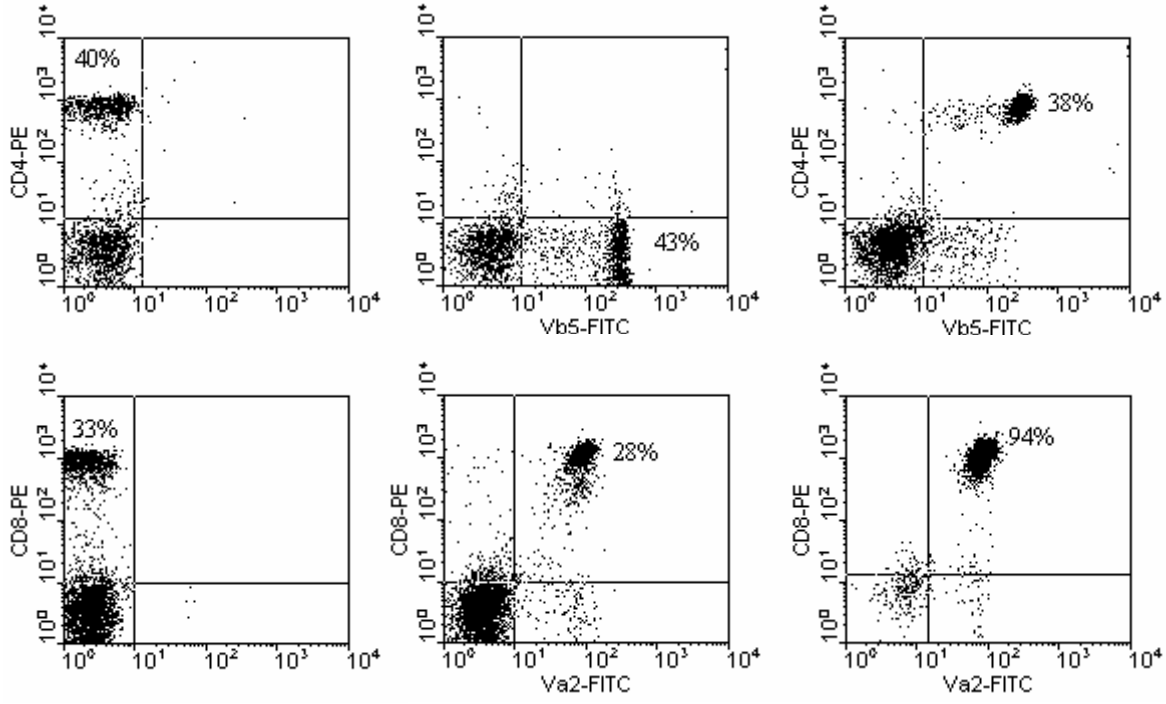


Abb. 8: unterschiedliche prozentuale Lymphozytenverteilungen im Blut transgener OT-II (obere Reihe) und OT-I Mäuse (untere Reihe). Der dot-plot rechts unten zeigt eine der im Text angesprochenen OT-I Mäuse mit über 90% $CD8^+/V_\alpha 2^+$ T-Zellen.

3.1.4 Festlegung der Immunisierungsbedingungen

Um die optimalen Bedingungen für eine Immunisierung, die nachfolgende Stimulation von Milz- und Lymphknotenzellen in Kultur und die ideale Nachweismethode für die Zellaktivierung zu bestimmen, wurden zunächst zwei C57BL/6 Mäuse mit dem OVA$_{323-339}$ Peptid immunisiert. Davon erfolgte die Injektion des Peptids (ca. 50 µg) bei einer Maus an der Schwanzwurzel (tailbase), bei der anderen im Nacken (neck). Nach 10 Tagen wurden 1 x 10^5 und 3 x 10^5 Milzzellen der Mäuse sowie einer nicht-immunisierten Kontrollmaus (mit PBS-immunisierte Mäuse wurden in späteren Experimenten als Kontrollen verwendet) in Kultur genommen und mit verschiedenen Peptidkonzentrationen ein, zwei und vier Tage lang stimuliert. Mit einem BrdU-Proliferations-ELISA wurde die Aktivierung der Zellen nachgewiesen.

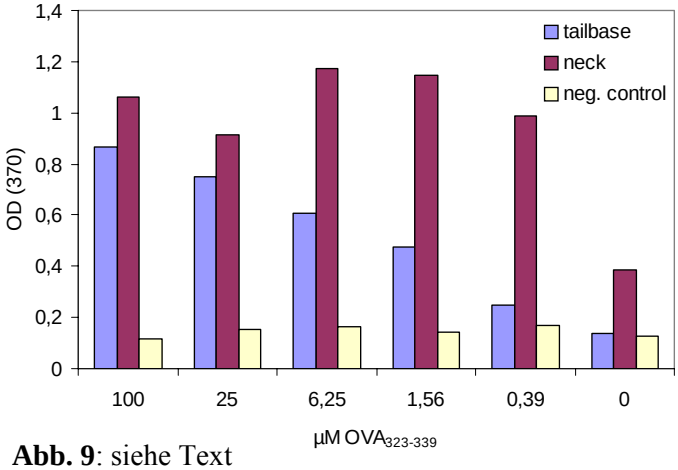


Abb. 9: siehe Text

Abb. 9 zeigt die Proliferation von 1 x 10^5 Milzzellen an Tag 4. Die im Nacken immunisierte Maus zeigte eine hohe Proliferation unabhängig von der hier verwendeten Peptidkonzentration. Dies war bereits nach ein und zwei Tagen zu sehen, so daß dieser Applikationsort als ungeeignet gewertet wurde. Die an der Schwanzwurzel immunisierte Maus zeigte eine Proliferation mit entsprechender Abhängigkeit von der Peptidkonzentration, die nach zwei Tagen noch weniger deutlich war. Die nicht immunisierte Maus zeigte erwartungsgemäß keine Proliferation. Alle Ansätze mit 3 x 10^5 Zellen hatten eine sehr hohe unspezifische Hintergrundproliferation, die sich im BrdU-ELISA nicht von spezifischer Proliferation unterscheiden ließ (Daten nicht gezeigt). Der später eingesetzte IL-2 ELISA war zudem dem BrdU-ELISA an Sensitivität überlegen (Peptidtitration in niedrigere Bereiche nachweisbar). Für weitere Immunisierungsexperimente wurden daher folgende Bedingungen gewählt:

- Injektion an der Schwanzwurzel
- Stimulation von 1 x 10^5 Zellen für drei Tage
- IL-2 ELISA und / oder BrdU-Proliferationsassay als Read-Out

3.1.5 Immunisierung von OT-II Mäusen mit Gp96

Fünf OT-II Mäuse wurden wie folgt immunisiert:

Maus # 1:	PBS in Freund's Incomplete Adjuvant (FIA), tailbase
Maus # 2:	$OVA_{323-339}$ in Freund's Incomplete Adjuvant, tailbase
Maus # 3:	$OVA_{323-339}$ in Titermax Gold, tailbase
Maus # 4:	$OVA_{323-339}$ in Freund's Complete Adjuvant (FCA), tailbase
Maus # 5:	Gp96 in PBS, intraperitoneal

10 Tage nach Immunisierung wurden Milz und Lymphknoten entnommen und 1 x 10^5 Zellen in 96-well Platten mit $OVA_{323-339}$ für 3 Tage inkubiert. Anschließend wurde sowohl ein BrdU-ELISA als auch ein IL-2 ELISA zum Vergleich durchgeführt. Beide Read-Out-Systeme entsprachen sich in ihren Ergebnissen in bezug auf die Lymphknotenkulturen, jedoch führte die Proliferation der Milzzellen durch ihre größere Heterogenität im BrdU-Assay zu einem starken Hintergrundssignal (nicht gezeigt). Hier zeigte die Messung der IL-2-Produktion als zellspezifischerem Marker deutliche Vorteile, so daß in weiteren Versuchen dieses System als Read-Out verwendet wurde.
Dargestellt ist die IL-2-Sekretion der Lymphknotenzellen der jeweiligen Mäuse (Abb. 10). Es zeigte sich kein wesentlicher Unterschied zwischen den einzelnen Adjuvantien. Auch die Zellen der mit Gp96 immunisierten Maus waren peptidspezifisch stimuliert worden. Jedoch fiel auf, daß die mit PBS immunisierte Kontrollmaus (#1) ein identisches Aktivierungssignal zeigte. Es wurde daher vermutet, daß Lymphozyten aus OT-II Mäusen allein durch die Inkubation mit Peptid, unabhängig von einer vorherigen Immunisierung, aktivierbar sind (sog. „in-vitro priming“, siehe 3.1.6).

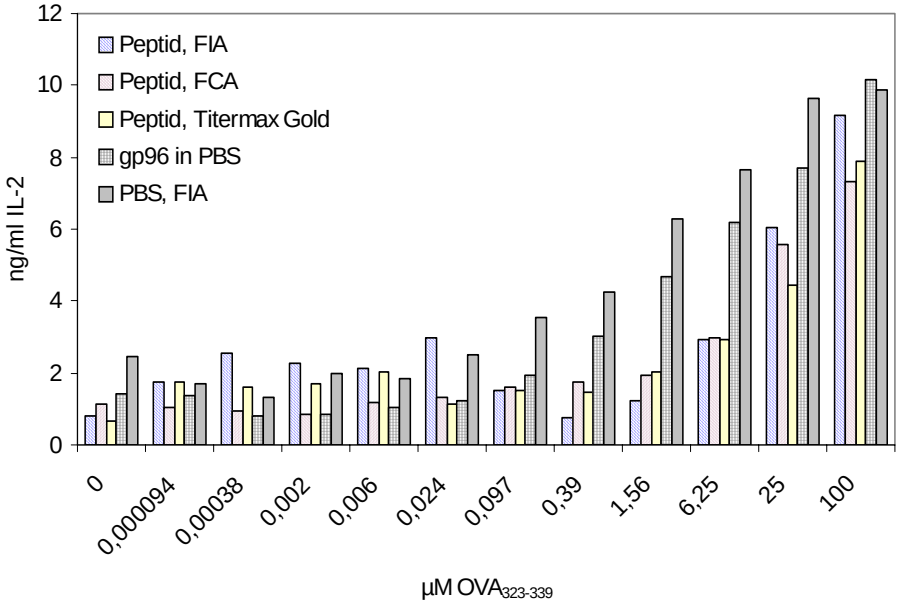


Abb. 10:

IL-2 Produktion von 1 x 10^5 Lymphknotenzellen, gemessen an Tag 3. Auch die Lymphozyten der mit PBS immunisierten Maus wurden aktiviert.

3.1.6 Aktivierung Ovalbumin-spezifischer T-Zellen durch Peptid aber nicht durch Gp96

Um das oben beschriebene Phänomen des in-vitro priming von transgenen T-Zellen zu bestätigen, wurden Milz- und Lymphknotenzellen aus OT-II und OT-I Mäusen ohne vorherige Immunisierung der Mäuse mit $OVA_{323-339}$ bzw. SIINFEKL unter den unter 3.1.5 beschriebenen Bedingungen inkubiert. Zudem wurden zwei OT-II Mäuse unterschiedlichen Alters gewählt (4 und 10 Wochen), um einen eventuellen Einfluß des Alters auf den Aktivierungszustand der T-Zellen beobachten zu können. Als Kontrolle diente eine C57BL/6-Maus. Abb. 11 zeigt die erwartete direkte Aktivierung von OT-II Lymphknotenzellen. Bereits Zellen der vier Wochen alten Maus produzierten stark IL-2, die Werte der Negativkontrolle lagen um Null. Zellen aus OT-I Mäusen verhielten sich identisch (Abb. 11), hier gezeigt mit einer intrazellulären IFN-γ Färbung.

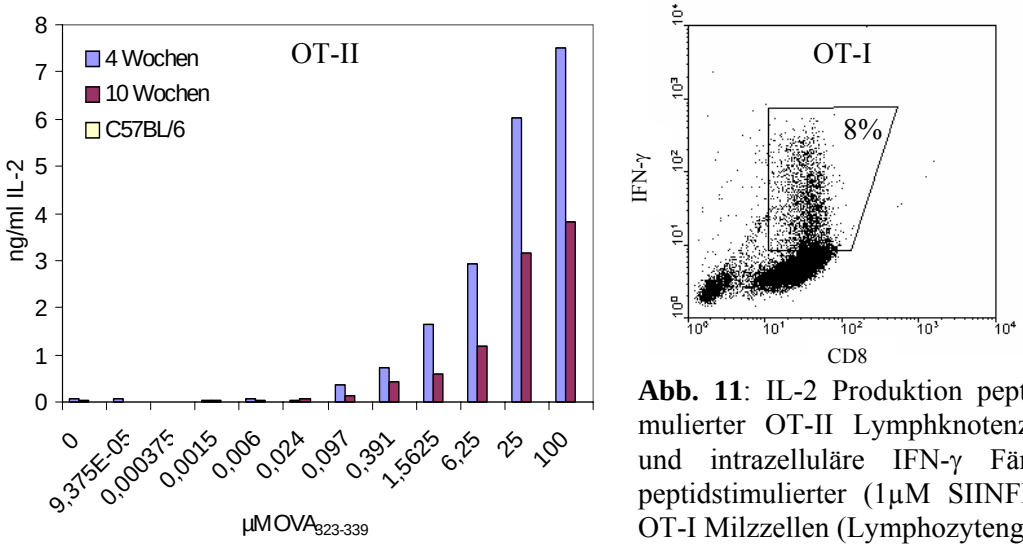


Abb. 11: IL-2 Produktion peptidstimulierter OT-II Lymphknotenzellen und intrazelluläre IFN-γ Färbung peptidstimulierter (1µM SIINFEKL) OT-I Milzzellen (Lymphozytengate).

Aufgrund dieser Daten standen die transgenen Mäuse nicht mehr für Immunisierungsexperimente zur Verfügung. Jedoch waren nun mit OT-I und -II Milzzellen potente Effektoren für in-vitro Experimente gefunden.

Weiter wurde untersucht, ob Gp96, direkt zu frischen Milz- oder Lymphknotenzellen aus OT-II Mäusen gegeben, in der Lage wäre, diese Zellen spezifisch zu stimulieren. Dies wäre z.B. möglich, wenn Gp96 von in der Milz vorhandenen APC aufgenommen und die Peptide prozessiert würden. Gp96 aus EG.7 Zellen wurde daher mit frischen OT-II Milzzellen inkubiert (Abb. 12). Als Kontrollen dienten Gp96 aus RMA-S Zellen (isoliert von S.Fuchs. Tübingen), ConA (nicht gezeigt) sowie $OVA_{323-339}$.

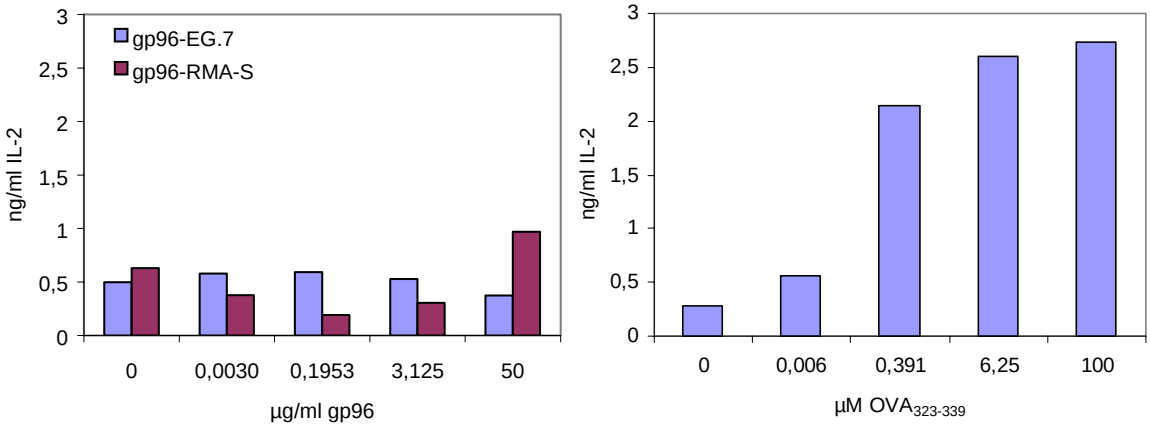


Abb. 12: direkte Stimulation von OT-II Milzzellen durch Peptid (rechts), jedoch nicht durch Gp96 (links).

Eine direkte T-Zellaktivierung durch Gp96 fand nicht statt. Die geringe Aktivierung durch Kontroll-Gp96 ist wahrscheinlich auf eine ConA-Verunreinigung zurückzuführen, die in dieser Aufreinigung höher war als in der aus EG.7 Zellen. Wegen der geringen Menge an Gp96-gebundenen Peptids wurden Gp96-Konzentrationen von bis zu 250 µg/ml getestet, die aber ebenso keine T-Zellaktivierung zur Folge hatten. Das Experiment wurde zusätzlich mit OT-I Milzzellen durchgeführt. Auch hier erfolgte keine Aktivierung (nicht gezeigt).

3.1.7 Versuch der Repräsentation Gp96-assoziierter Peptide durch antigenpräsentierende Zellen (APC)

Verschiedene Kombinationen aus antigenpräsentierenden Zellen und Effektoren wurden getestet. Dabei wurde versucht, sowohl das MHC-Klasse-I Epitop SIINFEKL, dessen Assoziation mit Gp96 bekannt ist, wie auch das Klasse-II Epitop $OVA_{323-339}$ nachzuweisen.

FSDC und OT-II Zellen:

Abbildung 13 zeigt einen Versuch mit der Zellinie FSDC als APC und frischen OT-II Milzzellen als Effektoren. Das gewählte Verhältnis 25.000 APC zu 300.000 Milzzellen entspricht einer APC:Effektor Ratio von 1:5, da von ca. 40-50% $CD4^+$-T-Zellen in der Milz ausgegangen wurde. Es fand keine Aktivierung der Effektoren durch Gp96 aus EG.7 Zellen statt. Die leichte Aktivierung durch Gp96 aus RMA-S Zellen ist nicht sicher zu erklären. Da die APC nach der Vorinkubation mit Gp96 viermal gewaschen wurden, ist ein Con A-Effekt unwahrscheinlich. Allerdings ist auch beschrieben, daß Gp96 direkt T-Zellen und APC aktivieren kann (4.1.2) (Breloer et al., 1998).

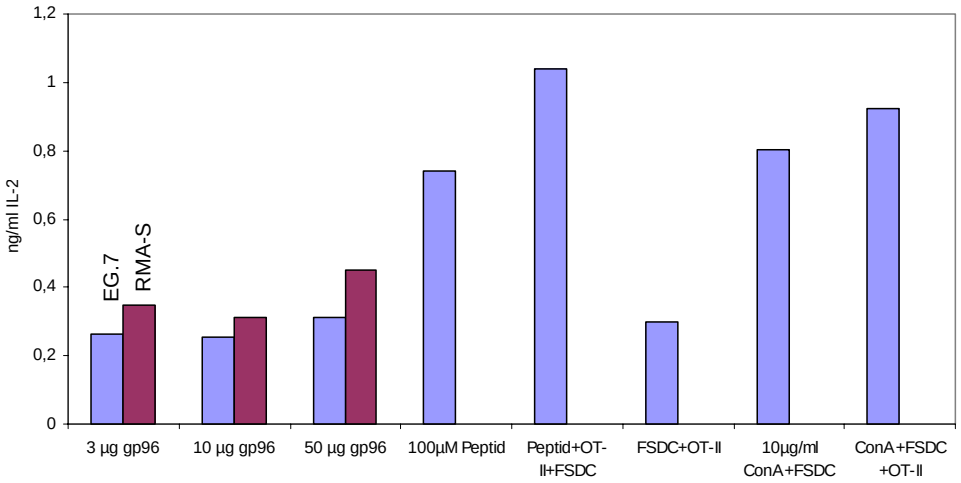


Abb. 13:

Repräsentationsassay mit der Zellinie FSDC als APC und OT-II Milzzellen als Effektoren (Ratio 1:5) an Tag 1.

<u>D1 und OT-I Zellen:</u>

Zum Nachweis von SIINFEKL wurden D1-Zellen und OT-I Zellen verwendet. Hier wurde zusätzlich das APC : Effektor Verhältnis variiert. Als Zytokin wurde IFN-γ als der von $CD8^+$-T-Zellen primär produzierte Botenstoff gemessen (Abb.14). Die gleich starke Aktivierung der T-Zellen durch synthetisches Peptid bei Konzentrationen von 1 bis 100 µM läßt vermuten, daß in diesem Bereich bereits eine Sättigung der Aktivierbarkeit vorliegt. Die Aktivierung durch Gp96 aus EG.7 Zellen lag noch unter den Werten der Negativkontrolle und somit im Hintergrundsbereich.

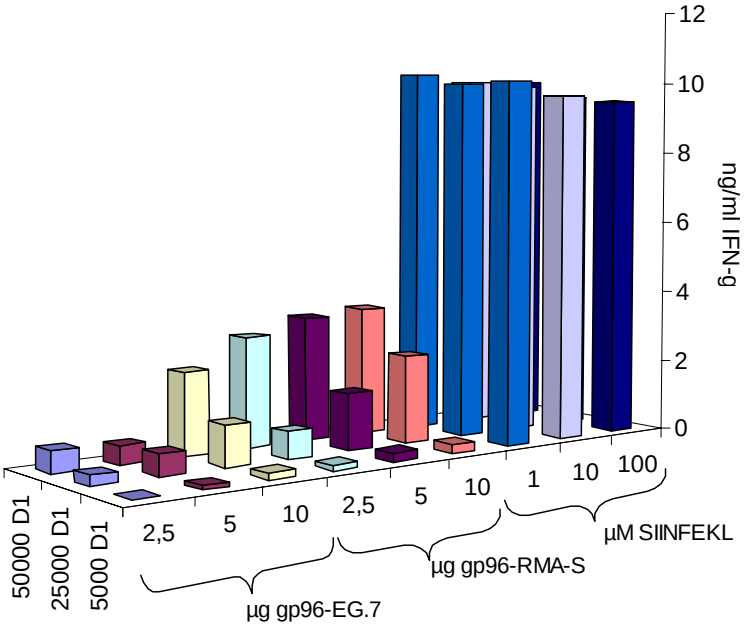


Abb. 14:

IFN-γ Produktion nach 12 Stunden, gemessen im ELISA. Die Menge an produziertem IFN-γ ist höher als die IL-2 Produktion von OT-II Zellen nach vergleichbarer Zeit.

BMDC und das Hybridom 3DO-54.8:

Ein weiterer Repräsentationsassay wurde mit BMDC aus einer BALB/c Maus (Haplotyp $H2^d$) und dem Hybridom 3DO-54.8 durchgeführt (Abb.15). Es wurden Gp96-Konzentrationen bis 20 µg verwendet, das gemessene Zytokin war IL-2. Die IL-2-Produktion der mit Gp96-EG.7 stimulierten Zellen war nur unwesentlich höher als in der Negativkontrolle.

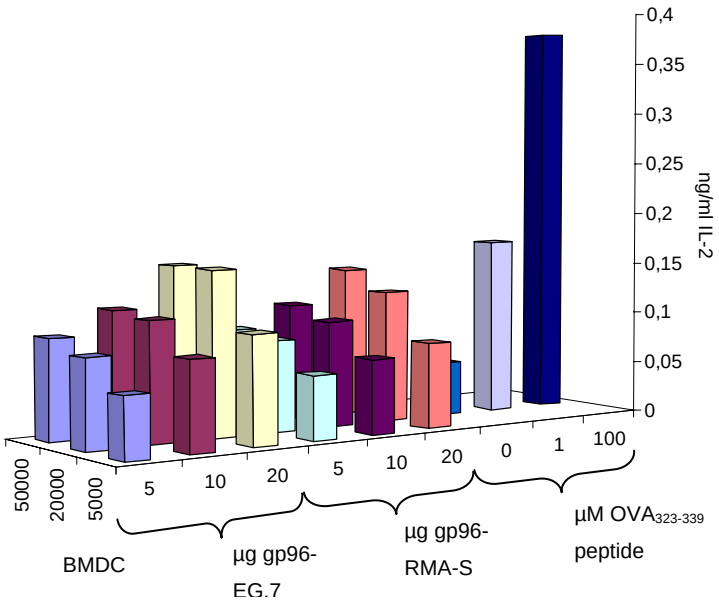


Abb. 15:

IL-2 Produktion nach 12 Stunden Inkubation von mit Gp96 und Peptid vorinkubierten BMDC und dem Hybridom 3DO-54.8.

3.1.8 Assay zur Beladung von Gp96 mit exogenen Peptiden

Da sich anhand der Ergebnisse der Repräsentationsassays nicht klären ließ, ob am verwendeten Gp96, eventuell durch die Aufreinigung bedingt, zu wenige oder keine Peptide assoziiert waren, wurde der Schwerpunkt nun auf die Etablierung eines Assay zur Beladung von Gp96 mit exogenen Peptiden gelegt. Für den Aufbau des Beladungsassay wurden zunächst Versuche durchgeführt, die die optimalen Bedingungen für den Nachweis der an Gp96 gebundenen, biotinylierten Peptide mit einem Europium-ELISA bestimmen sollten.

Zunächst wurden verschiedene anti-Gp96 Antikörper auf ihre Fähigkeit hin untersucht, Gp96 auf einer ELISA-Platte zu binden. Es standen Antikörper der Klone 9G10 (Stressgen, SPA-850), G12D und B10C zur Verfügung. Diese wurden auf eine NUNC-Maxisorb-Platte gecoated und mit biotinyliertem Gp96 inkubiert (Abb. 16). Als Positiv-

kontrolle für den ELISA wurde biotinyliertes $OVA_{323-339}$ direkt auf der Platte nachgewiesen. Dies war bis zu 10 fmol Peptid möglich, einer Menge, die den Nachweis der erwarteten sehr geringen Menge Gp96-assoziierten Peptids erlauben sollte. Der Klon B10C zeigte die besten Gp96-Bindungseigenschaften und wurde fortan als Capture-Antikörper verwendet.

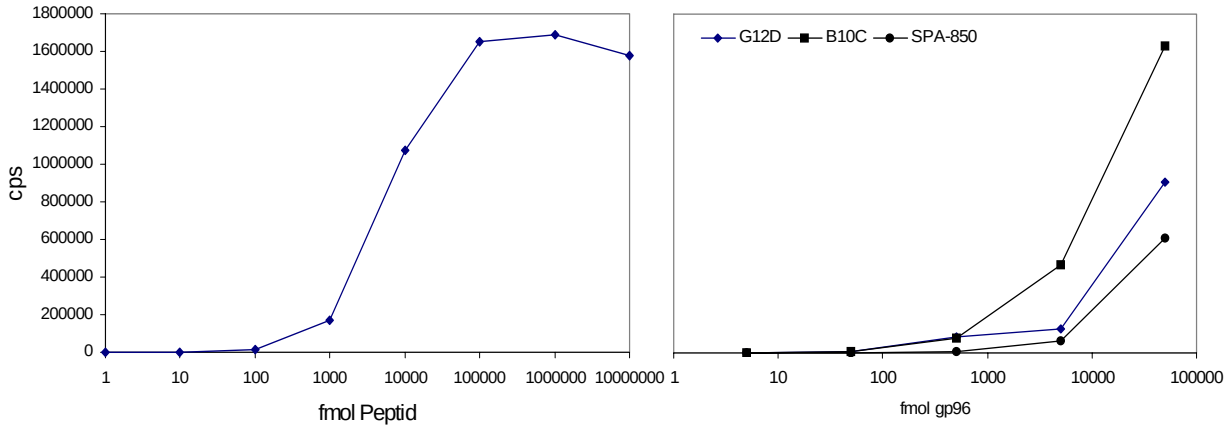


Abb. 16: die verschiedenen anti-Gp96 Antikörper (4µg/ml) binden biotinyliertes Gp96 unterschiedlich gut (rechts). Biotinyliertes Peptid ist mit Streptavidin-Europium bis in den fmol-Bereich nachweisbar (links). Die höchste gezeigte Peptidkonzentration entspricht 10 nmol.

Zur Kontrolle wurde auch ein nicht-Gp96-spezifischer Antikörper (K9-18) getestet. Auch hier war ein Signal messbar, welches nicht von freiem, unzureichend blockiertem NHS-Biotin aus der Biotinylierungsreaktion von Gp96 stammte (Abb. 17). Es wurde daher angenommen, daß Gp96 auch unspezifisch an den Boden der ELISA-Platte band.

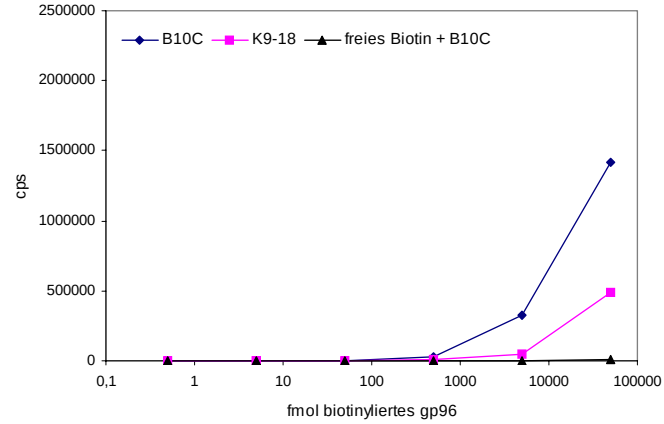


Abb. 17:

die unspezifische Bindung von Gp96 wird anhand der Bindung an einen unspezifischen Antikörper (K9-18) deutlich. Bedingungen wie bei Abb. 16.

Aus diesem Grunde wurde versucht, die Blockierung unspezifischer Bindungsstellen auf der Platte zu verbessern. Experimente mit PBS, 1% BSA und PBS, 4% Milchpulver

zeigten, daß die Blockierung mit Milchpulver jegliche Bindung an einen Antikörper stark reduziert (nicht gezeigt).

Es wurde zusätzlich ein kompletter Beladungsassay mit den unter 2.7 angegebenen Werten durchgeführt. Sämtliches Gp96 blieb jedoch hierbei im Filter des Microcon hängen, obwohl dieser mit Glycin blockiert war. Für weitere Experimente sollten daher deutlich größere Gp96 Mengen beladen werden, um derartige Verluste zu verhindern. Eventuell kann auch ein Microcon verwendet werden, dessen Membran zuvor mit Gp96 gesättigt wurde (siehe Diskussion).

3.2 Aktivierung dendritischer Zellen durch Gp96

3.2.1 Das Zytokinmuster aktivierter dendritischer Zellen

BMDC und humane DC (hergestellt von H. Singh, Tübingen) wurden mit verschiedenen Gp96-Konzentrationen 24 Stunden lang inkubiert und die entsprechenden Zytokine im Überstand mittels ELISA gemessen. Zur Kontrolle einer Kontamination der Gp96-Proben durch Endotoxine wurden gekochtes Gp96, LPS und gekochtes LPS verwendet. Die Proben waren zusätzlich von H.Singh mit einem *Limulus* Amebocyte Lysate Kit (QCL-1000, BioWhittaker) auf den Endotoxingehalt hin untersucht worden, der immer < 0,05 EU/µg Gp96 war.

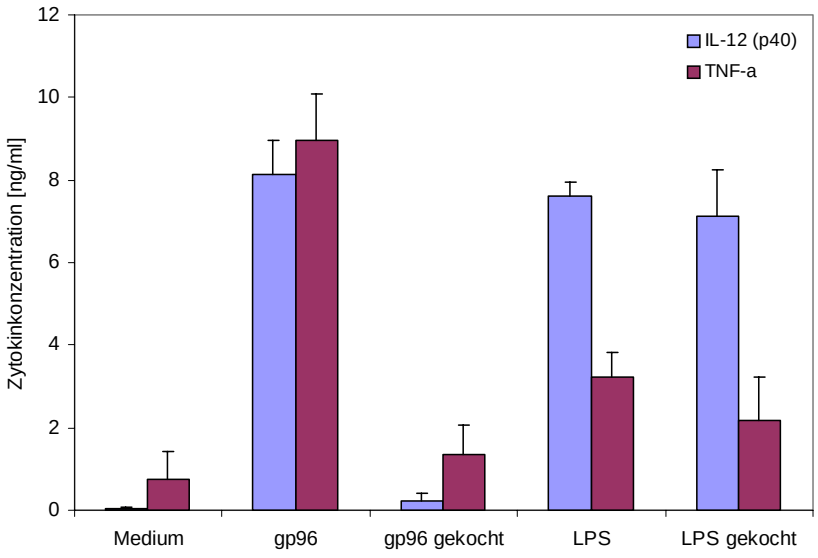


Abb. 18: siehe Text

Abb. 18 zeigt die IL-12 und TNF-α Produktion von C57BL/6-BMDC. Gp96 induzierte die Synthese beider Zytokine in etwa gleichem Maße und übertraf den durch LPS erzielten Effekt. Die Wirkung

von Gp96, nicht jedoch der LPS-Effekt, konnten durch Kochen der Probe unterdrückt werden.

Im weiteren wurden humane DC in gleicher Weise untersucht. Gemessen wurden IL-6, IL-10, IL-12 und TNF-α (Abb. 19). Humane DC reagierten auf Gp96 mit einer starken Produktion an IL-6, IL-12 und TNF-α, jedoch wurde nur wenig IL-10 produziert. Dieser Effekt war titrierbar und erreichte zwischen 100 und 200 µg/ml Gp96 den Grad der Sättigung. Durch 10 µg/ml LPS wurde ein deutlich anderes Zytokinmuster induziert, bei dem vor allem mehr IL-10 produziert wurde.

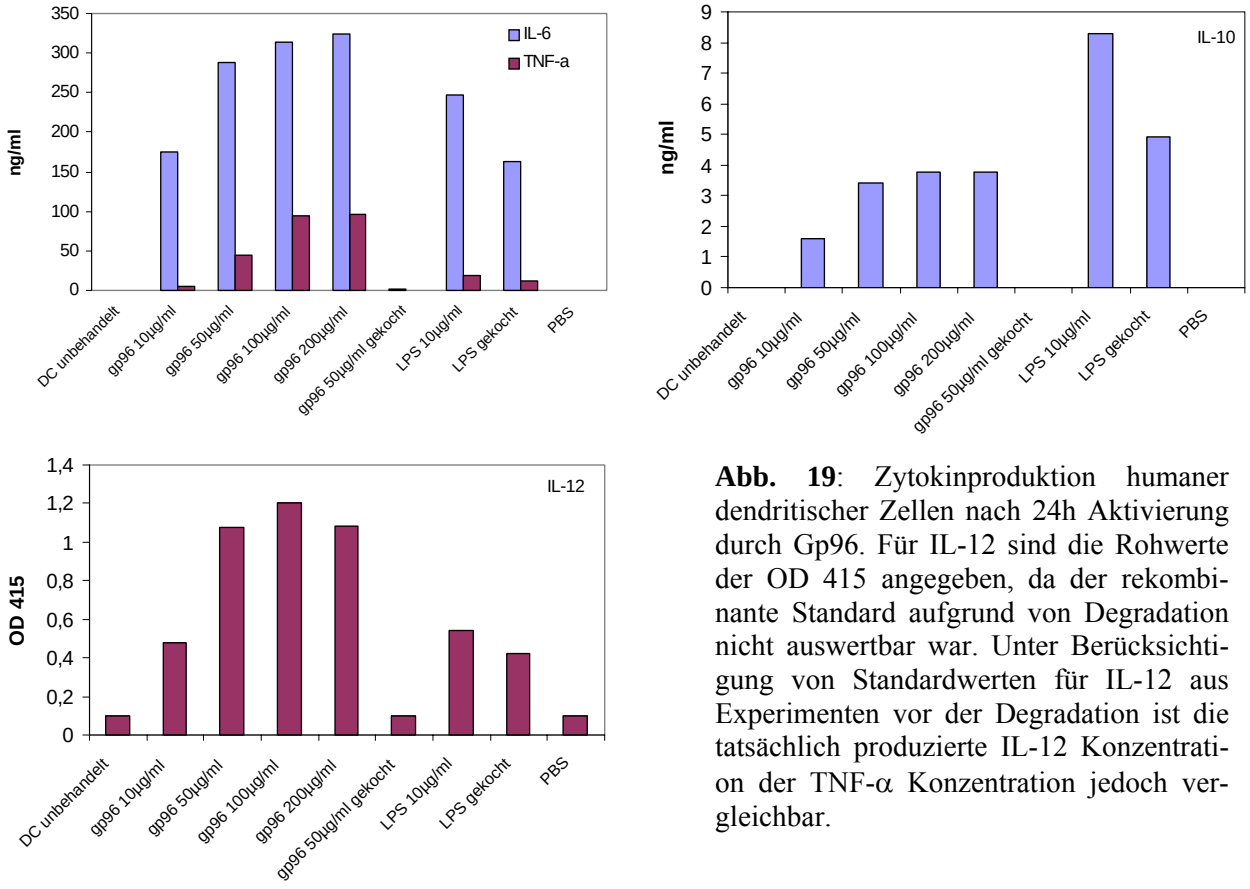


Abb. 19: Zytokinproduktion humaner dendritischer Zellen nach 24h Aktivierung durch Gp96. Für IL-12 sind die Rohwerte der OD 415 angegeben, da der rekombinante Standard aufgrund von Degradation nicht auswertbar war. Unter Berücksichtigung von Standardwerten für IL-12 aus Experimenten vor der Degradation ist die tatsächlich produzierte IL-12 Konzentration der TNF-α Konzentration jedoch vergleichbar.

3.2.2 Die Aktivierung dendritischer Zellen durch Gp96 ist Ca^{++}-abhängig

BAPTA-AM, ein intrazellulärer Ca^{++}-Chelator, der Calcium-abhängige Signalwege in einer Zelle blockiert, wurde gemeinsam mit Gp96 zu BMDC gegeben. Die IL-12 Produktion durch Gp96 wie auch durch LPS wurde von BAPTA-AM bei einer Konzentration von 10 µM unterdrückt. Konzentrationen von 1 µM reichten dazu nicht aus.

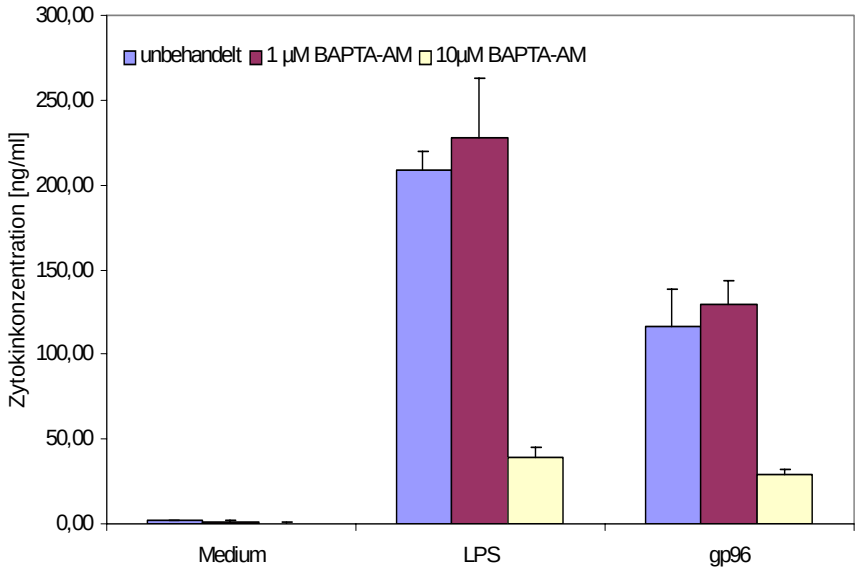


Abb. 20:

BMDC-Aktivierung durch Gp96 unter Zugabe von BAPTA-AM. BAPTA-Konzentrationen von 10µM, nicht jedoch von 1µM, blockieren die Gp96-induzierte IL-12 Produktion.

3.3 HSP60 - Bindungsstudien

Für diese FACS-Bindungsstudien wurden mehrere, im folgenden aufgeführte Hsp60-TRITC Markierungen (Lots) durchgeführt. Die Effizienz der Markierung wurde mit Hilfe des Quotienten OD575 / OD280 beurteilt, der im Idealfall bei 0,6 lag. Lots mit kleineren Quotienten waren für FACS-Färbungen zu schwach markiert, stärkere Markierungen zeigten meist unspezifische Bindungen. (hu = humanes Hsp60, chl = Hsp60 aus Chlamydia)

Tabelle 3: Hsp60-TRITC-Markierungen

	OD575 / OD280	Bindung an Zellen
Lot 1 (hu)	H. Singh	+
Lot 2 (hu)	0,61	+
Lot 3 (hu)	0,68	+ und unspezifisch
Lot 4 (hu)	0,4	-
Lot 5 (hu)	0,5	(+)
Lot 6 (hu)	0,5	-
Lot 7 (hu)	0,44	-
Lot 1 (chl)	0,62	+

Gezeigt sind im folgenden Bindungsexperimente an verschiedenen Zelltypen:

Bindung an BMDC:

BMDC verlieren im Laufe ihrer Entwicklung CD14. Am Boden der Kulturplatte einer BMDC-Präparation wachsen jedoch adherente, $CD14^+$ Zellen, die unter speziellen Kulturbedingungen zu Makrophagen ausdifferenzieren. Nach Abnehmen der nicht-adherenten DC wurde diese Zellschicht abtrypsiniert und gefärbt. Es zeigt sich im Dot-plot eine heterogene Population, in der sich trotz Abnehmens der DC noch $CD11c^+$ Zellen befinden (Abb. 21). Dabei läßt sich keine ausschließlich $CD14^+$ oder $CD11c^+$ Population abgrenzen. Hsp60 bindet jedoch nur an einen bestimmten Zelltyp (erkennbar an den zwei peaks der Bindungskurve), der in den gezeigten Gates unterschiedlich stark vertreten ist und mit der Zahl $CD14^+$ Zellen korreliert. In R1 exprimieren vergleichsweise viele Zellen CD14. Gleichzeitig ist hier die Hsp60-Bindung stark. In R2 ist die CD14-Expression schwach. Ebenso ist der spezifische Peak der Hsp60-Kurve gering.

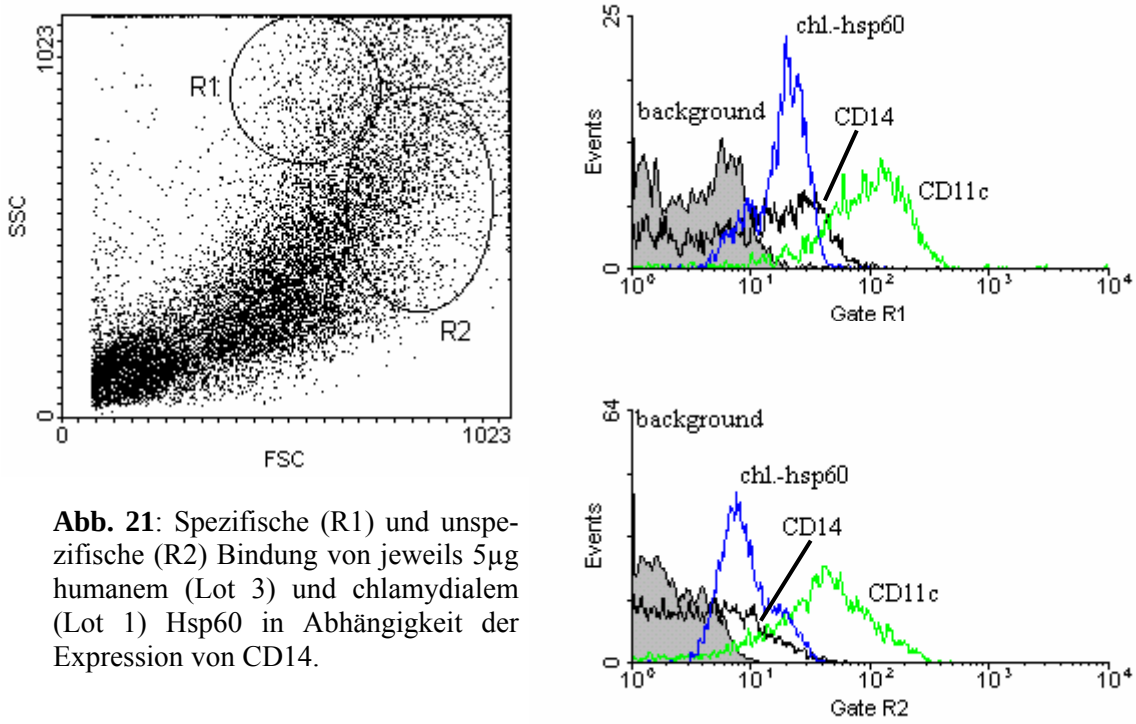


Abb. 21: Spezifische (R1) und unspezifische (R2) Bindung von jeweils 5µg humanem (Lot 3) und chlamydialem (Lot 1) Hsp60 in Abhängigkeit der Expression von CD14.

Bindung an D2SC/1-Zellen:

10 µg humanes Hsp60 (Lot 2) bindet spezifisch an D2SC/1 Zellen (Abb. 22). Hier lassen sich im Dot-plot zwei Populationen abgrenzen (entsprechend R1 und R2), von de-

nen nur eine (in R1) Hsp60-bindende Zellen enthält. Aufgrund der geringen Mengen markierten Hsp60 je Lot war eine Wiederhohlung des Versuchs mit Lot 2 zur Charakterisierung dieser Zellen nicht möglich.

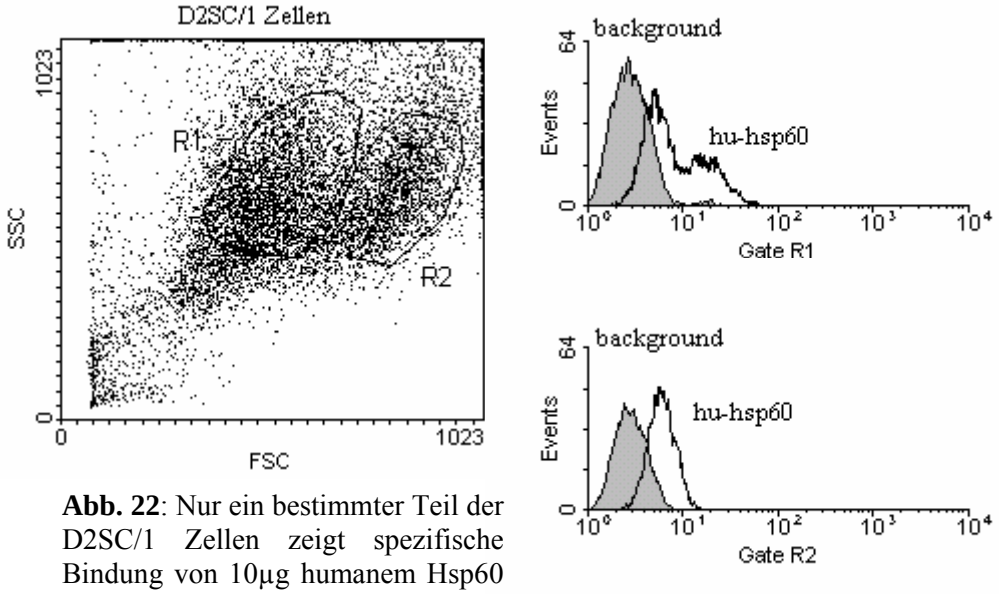


Abb. 22: Nur ein bestimmter Teil der D2SC/1 Zellen zeigt spezifische Bindung von 10µg humanem Hsp60 (Schulter der Bindungskurve in R1).

Bindung an PECs:

Im Peritonealexsudat von Mäusen fanden sich zwei große Zellpopulationen (Abb. 23): $CD14^+$ Makrophagen (R1) sowie $CD19^+$, $CD14^-$ B-Zellen (R2 und R3). In mehreren Bindungsexperimenten mit den Lots 2 (5 µg) und 5 (5 µg, nicht gezeigt) zeigt sich eine schwache Bindung von Hsp60 an B-Zellen und nicht an Makrophagen. Diese Beobachtung kann nicht sicher als spezifische Bindung gewertet werden, da es sich auch um eine unspezifische Bindung an die etwas größeren B-Zellen handeln könnte. Sie bietet jedoch einen interessanten Ausgangspunkt für weitere Experimente (siehe 4.3). Auf D2SC/1 Zellen hatte Lot 2 spezifische Bindung gezeigt.

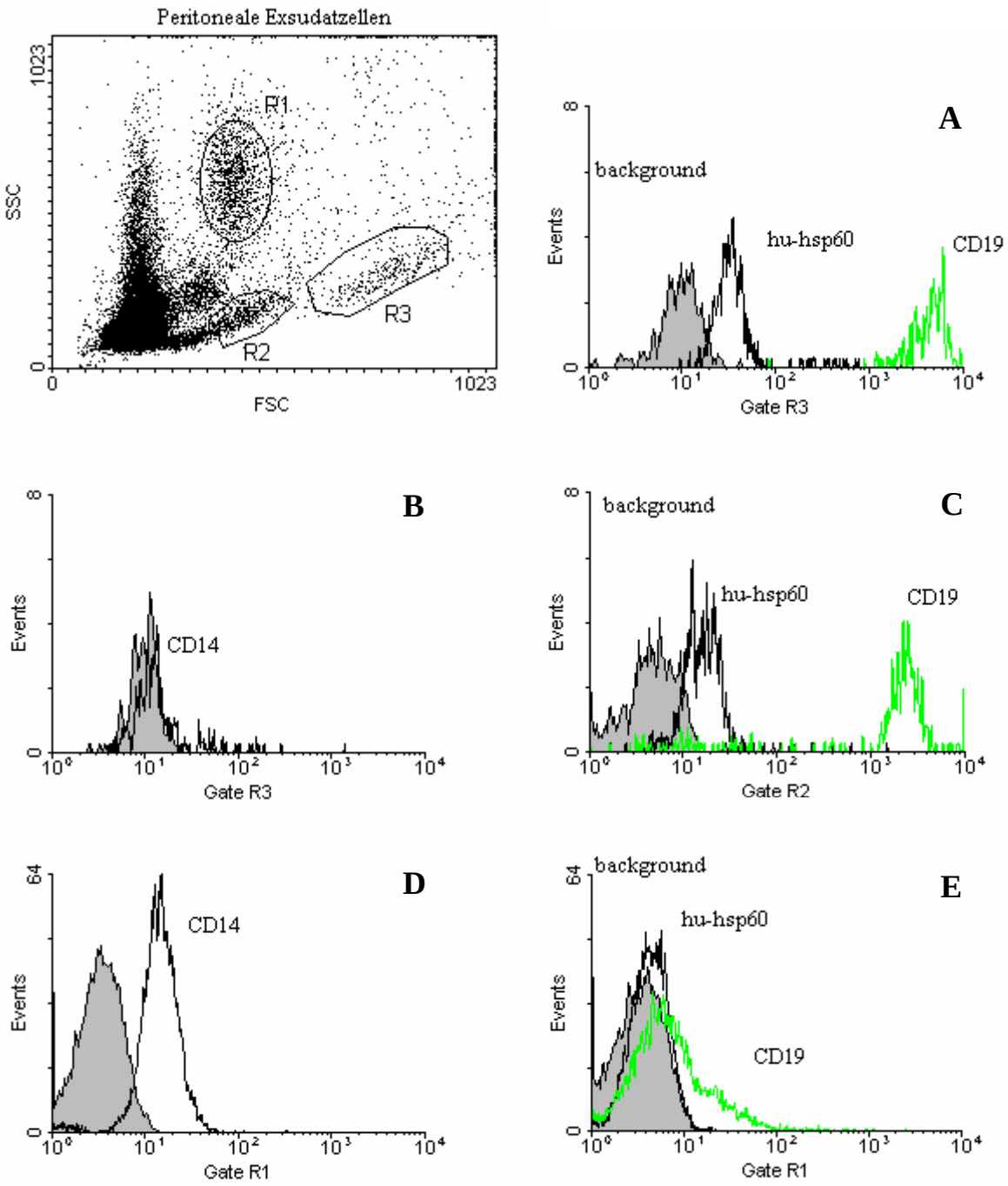


Abb. 23: Hsp60 bindet an $CD19^+$ B-Zellen aber nicht an $CD14^+$ Makrophagen im Peritonealexsudat von C57BL/6 Mäusen. Diagramm A zeigt die Hsp60-Bindung an Zellen des Gates R3, die stark CD19 exprimieren, jedoch $CD14^-$ sind (B). Das gleiche trifft für Zellen im Gate R2 zu (C). Dagegen sind die Zellen im Gate R1 $CD14^+$ (D), binden jedoch kein Hsp60 und sind $CD19^-$ (E). Die Bindung von chlamydialem Hsp60 (nicht gezeigt) entspricht der von humanem Hsp60.

3.4 Peptidmotiv und Liganden des Schweine-MHC-I Moleküls PD1

3.4.1 PD1 Expression auf A505 und PD1.1 Zellen

Für die Bestimmung des Peptidmotivs und natürlicher Liganden des Schweine-MHC-I Moleküls PD1 standen zwei Zellinien zur Verfügung, deren PD1-Expression in FACS-Analysen verifiziert wurde. Dazu wurde PT85 (2.9.1) als Primär- und ein FITC markierter goat-anti-mouse-Ig als Sekundärantikörper verwendet. Die PD1-Expression der zu Beginn der Arbeit vorhandenen Zellinie A505 ist im Vergleich zur später erhaltenen Linie PD1.1 deutlich geringer (Abb. 24).

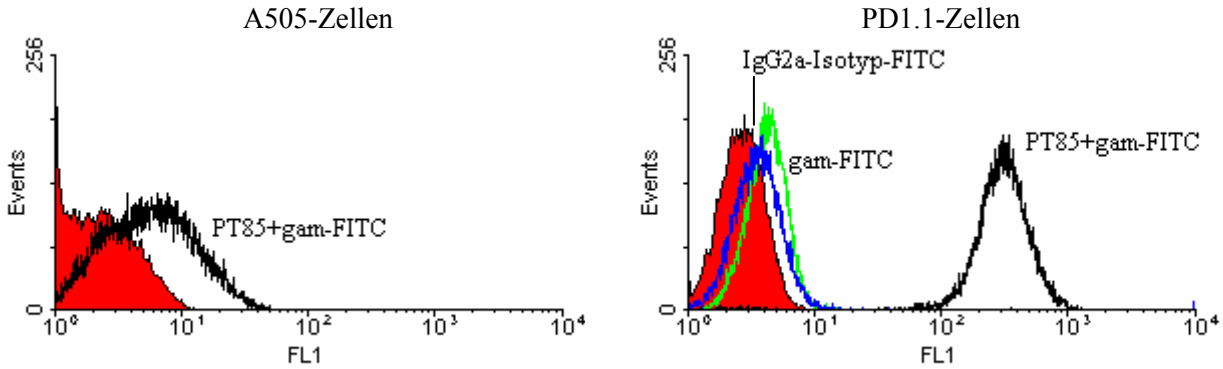


Abb. 24: PD1-Expression der Zellinien A505 (links) und PD1.1 (rechts). Im rechten Histogramm sind zusätzlich Kontrollfärbungen mit einem IgG2a-Isotyp-Antikörper und dem goat-anti-mouse-Antikörper zur Darstellung der Hintergrundfluoreszenz gezeigt. Die ausgefüllte Kurve stellt ungefärbte Zellen dar. Es wird die sehr viel stärkere PD1-Expression der PD1.1-Zellen und die hohe Spezifität des PT-85 Antikörpers deutlich.

3.4.2 Motivbestimmung mit A505-Zellen

In einem ersten Versuch wurde ein 45ml Zellpellet der Linie A505 verwendet. Nach Elution der MHC-Peptid-Komplexe von der Protein-A Sepharose Säule wurden 50µl Eluat abgenommen, um mittels Ansequenzierung dieser Probe auf den Gehalt an MHC-Molekülen schließen zu können. Nach 5 Zyklen war jedoch lediglich die schwere Kette des PT85-Antikörpers (EVQLQ) aber keine deutliche MHC-spezifische Sequenz im Eluat nachweisbar (Daten nicht gezeigt). Aus diesem Grund wurde von vorneherein auf eine Auftrennung der Peptide mittels HPLC verzichtet und der gesamte Pool des Eluats

mittels speed-vac eingeengt und sequenziert. Das aus den Poolsequenzierungsdaten ableitbare Peptidmotiv ist in Tabelle 4 dargestellt.

Tabelle 4: Daten der Poolsequenzierung (10 Zyklen) und ableitbares Peptidmotiv. Die angegebenen Werte entsprechen der Menge der Aminosäure im jeweiligen Zyklus in pmol. Als relevant wurden Werte mit einem mind. 20%igen Anstieg gegenüber dem vorhergehenden Zyklus gewertet (fettgedruckt). Das daraus abgeleitete Peptidmotiv mit Ankern und Hilfsankern ist im unteren Teil dargestellt.

Aminosäure	**1**	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**7**	**8**	**9**	**10**
A	59.46	19.69	10.45	8.03	**12.49**	9.14	**16.77**	8.35	7.32	3.74
D	31.45	10.12	**70.52**	26.22	19.52	13.90	12.65	8.31	7.69	5.35
E	35.64	7.73	10.72	9.84	8.82	5.68	**8.31**	5.57	4.61	2.80
F	21.60	6.22	5.95	5.94	5.68	6.71	**9.28**	6.06	**14.09**	5.85
G	53.20	32.17	25.60	25.00	27.03	20.48	15.92	11.37	9.05	8.17
H	15.87	6.11	5.13	3.21	3.90	2.53	**4.11**	2.47	2.05	1.26
I	20.32	**37.92**	11.32	10.87	8.56	**13.64**	8.33	4.99	3.88	2.13
K	22.78	12.03	8.01	**12.53**	12.21	6.79	8.71	6.31	5.05	3.90
L	15.49	**30.07**	8.59	9.23	11.33	**16.33**	11.63	6.51	5.71	2.90
M	0.00	7.51	3.21	2.15	**5.09**	2.76	**3.72**	1.88	1.39	0.90
N	21.63	5.91	4.87	3.24	**8.40**	**8.41**	7.63	6.44	4.78	2.22
P	8.85	5.44	5.72	**17.74**	**21.69**	13.54	8.97	3.86	3.50	2.66
Q	11.94	10.40	4.12	5.24	6.54	6.41	7.15	7.87	4.90	2.91
R	11.29	5.20	4.30	5.96	5.46	3.92	**6.89**	6.26	4.67	3.59
S	45.77	21.28	10.21	8.13	9.84	6.13	7.31	4.96	3.35	2.03
T	19.34	23.48	6.67	6.33	8.83	7.46	8.30	5.90	0.00	1.78
V	26.28	**42.32**	12.26	11.08	9.23	**16.63**	11.31	5.99	4.45	2.49
W	0.00	5.01	3.40	1.99	1.99	1.81	1.81	1.25	1.41	0.62
Y	16.53	4.40	5.64	5.59	4.94	4.12	**6.42**	5.12	**10.05**	6.84

Anker			**D**						**Y**	
			(E)						**F**	
Hilfsanker	**L**									
	I									
	V									

	(T)				
	(M)				
bevorzugt		K	A	I	A
		P	M	L	E
			N	V	F
			P	(N)	H
					M
					R
					Y

3.4.3 Ligandenbestimmung mit PD1.1 Zellen

Für einen zweiten Versuch der Bestimmung von PD1-Liganden wurde ein 45ml Zellpellet der Linie PD1.1 verwendet, deren hohe PD1-Expression auf eine bessere Ausbeute bei der Peptidextraktion hoffen ließ. Bereits beim Ansequenzieren einer Probe des ersten Eluats von der Protein-A Säule war außer der schweren und leichten Kette des Antikörpers die Sequenz des Schweine-MHC-Moleküls erkennbar (Tabelle 5). Es wurde daher eine RP-HPLC-Fraktionierung auf einem SMART-System durchgeführt (Abb. 25).

Tabelle 5: Ergebnis des Ansequenzierens des ersten Eluats der Protein-A Säule, in dem sowohl die Sequenzen der Antikörper als auch die PD1-Sequenz erkennbar waren. Die gezeigten Daten sind Auswertungen der Rohdaten eines automatisierten Edman-Abbaus.

D	V	L	M	T	Q	T	PT85 κ-Kette
E	V	Q	L	Q	Q	S	PT85 λ-Kette
M	G	P	G	A	L	F	PD1

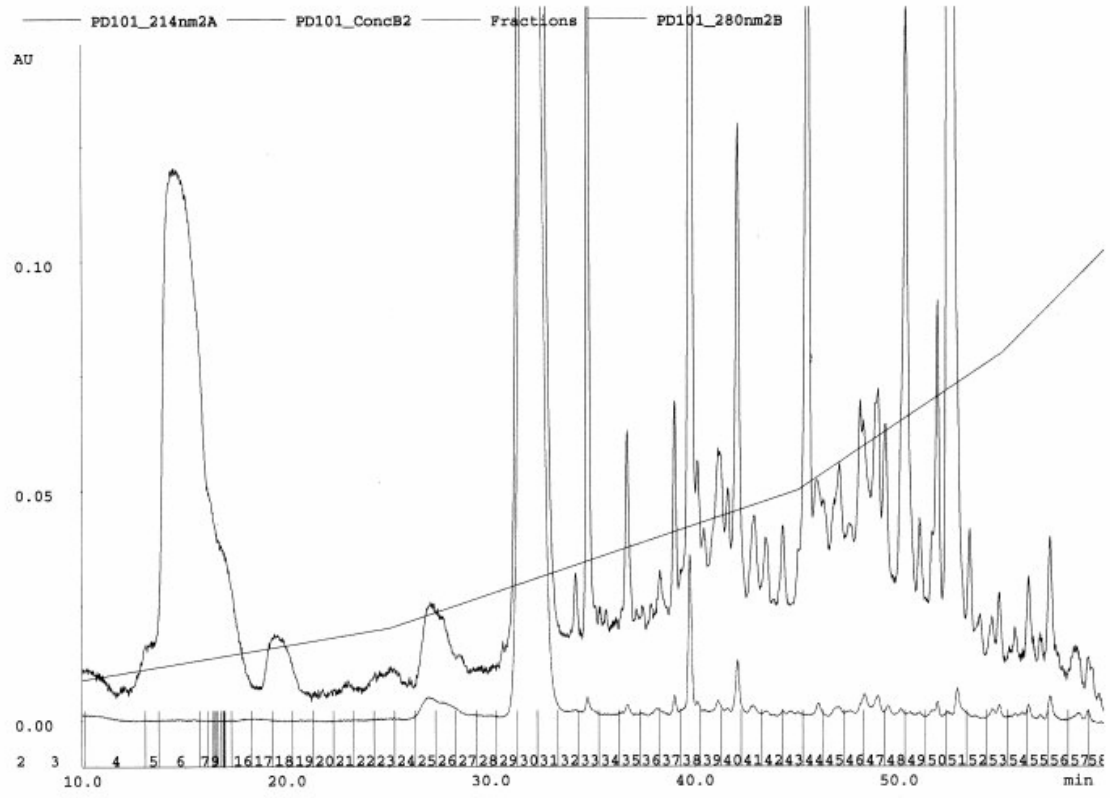


Abb. 25: Chromatogramm der SMART RP-HPLC Auftrennung bei 214 nm. Überlagert ist der Gradient des Puffers „B“ sowie die Absorption bei 280 nm (untere Kurve nahe 0.00 mit nur wenigen peaks).

Die Fraktionen 32-41 wurden nun massenspektroskopisch von Toni Weinschenk, Tübingen untersucht. Dabei waren in den Fraktionen 38 und 39 folgende Liganden aus Proteinen der Maus nachweisbar:

Tabelle 6: Liganden des Schweine-MHC-I Moleküls PD1

Ligand	**Herkunft**
V L D P R G I Y L	T-cell surface glycoprotein CD3 delta chain precursor
E Q D S L L T A F	brain protein E46

In einigen Fraktionen fand sich eine hohe Kontamination durch Polyethylenglykol (PEG), welches bei der Verwendung von TFA aus Pipettenspitzen und Plastikröhrchen gelöst wird. Aus diesem Grund war die Bestimmung weiterer Liganden in diesen Fraktionen nicht möglich.

4 Diskussion

4.1 Gp96-induzierte Immunität und $CD4^+$ T-Zellen

4.1.1 Interpretation der Ergebnisse

Im Verlauf der Versuche zum Nachweis Gp96-assoziierter MHC-II Epitope (3.1) waren diverse Modifikationen am ursprünglichen Modellsystem notwendig. Die ursprünglich für in-vitro Experimente vorgesehenen Hybridome 3DO und BO97 erwiesen sich durch niedrige Expression des spezifischen TCR und CD4 als nur schwach aktivierbar (3.1.2). Gleichzeitig zeigten Milz- und Lymphknotenzellen von OT-I und -II Mäusen eine starke in-vitro Aktivierbarkeit durch die Ovalbuminepitope SIINFEKL bzw. ISQAVHAAHAEINEAGR ohne vorheriges Priming in-vivo (sog. in-vitro priming, 3.1.4 bis 3.1.6). OT-I/-II Mäuse standen daher für Immunisierungen mit Gp96 nicht zur Verfügung. Vielmehr wurden sie nun als Donatoren Ovalbumin-spezifischer T-Zellen verwendet und diese, zusammen mit dem Hybridom 3DO-54.8, in in-vitro Experimenten eingesetzt. Als geeignetes Read-out System wurde ein Zytokin-ELISA etabliert. Alternativ wurde für IFN-γ die intrazelluläre Zytokinfärbung verwendet. Für Gp96-Immunisierungen hätte die Möglichkeit des adoptiven Transfers von OT-I/-II Zellen in C57BL/6 Mäuse bestanden (nicht realisiert).

Trotz dieser Modifikationen ließen die unter 3.1.7 gezeigten Repräsentationsassays den eindeutigen Nachweis Gp96-assoziierter MHC-II Epitope nicht zu. Bei keiner der verwendeten APC-Effektor-Kombinationen übertraf die T-Zell-Aktivierung durch Gp96 aus EG.7 signifikant die Aktivierung durch irrelevantes Gp96. Dies traf auch für den als Positivkontrolle gedachten Nachweis von SIINFEKL durch OT-I Zellen zu. Um die Möglichkeit einer unspezifischen T-Zell-Aktivierung durch ConA-Verunreinigungen auszuschließen, wurde versucht, den Gp96-EG.7 Effekt durch irrelevantes Gp96 zu kompetitieren. In einem Repräsentationsassay mit BMDC als APC und OT-I Zellen als Effektoren zeigte dies jedoch im IFN-γ ELISA weder Kompetition noch Verstärkung (Daten nicht gezeigt).

Kritisch zu bewerten ist auch die in-vitro Aktivierung von OT-I/-II Zellen durch die jeweiligen Peptide. In der intrazellulären IFN-γ Färbung von SIINFEKL-stimulierten OT-I Zellen produzieren lediglich ca. 8% der $CD8^+$ Zellen dieses Zytokin (3.1.6). Da der IFN-γ ELISA keine Aussage über die Herkunft des Zytokins zuläßt, könnte es sich bei diesen um reaktivierte Memory-Zellen handeln. Versuche der Charakterisierung aktivierter Zellen im Vergleich zu frisch isolierten Milzlymphozyten mit Oberflächenmarkern wie CD44, CD62L, CD11b und CD49d (Zimmerman et al., 1996) ergaben jedoch keine zuverlässige Möglichkeit der Zuordnung (Daten nicht gezeigt).

Der zuverlässige Nachweis Gp96-assoziierter Peptide ist bislang nur durch Repräsentationsassays oder Immunisierung von Mäusen möglich. Jedoch schließt ein negatives Ergebnis einer Immunisierung die Assoziation des Peptids an Gp96 nicht aus (H. Schild, persönliche Mitteilung), so daß nur ein positves Ergebnis eine sichere Aussage erlaubt. Um sicherzustellen, daß die fehlende Repräsentation nicht durch eine fehlende Assoziation von Gp96 mit SIINFEKL bedingt ist, konzentrierte sich das weitere Vorgehen deshalb auf die Etablierung eines Assay zur Beladung von Gp96 mit exogenen Peptiden. Dazu wurde eine nicht-radioaktive Modifikation der Methode nach Blachere et al. (Blachere et al., 1997) gewählt, zu der die Ergebnisse erster Versuche gezeigt sind (3.1.8). Da Gp96 als Chaperon und Glykoprotein für die Bindung von Peptiden und Proteinen „gebaut“ ist, wird die Etablierung eines quantifizierbaren ELISA durch hohe unspezifische Gp96-Bindung erschwert. Dies spiegelt sich auch am hohen Verlust von Gp96 in Filtermembranen wieder. Versuche der Blockierung der ELISA-Platte mit unterschiedlichen Reagenzien brachten inkonsistente Ergebnisse. Da es sich bei dem als Capture-Antikörper verwendeten B10C um ein (kleines) scFv-Fragment und nicht um einen vollständigen AK handelt, könnten auch dessen Bindungsstellen durch die Blockierungsreagenzien beeinflußt werden. Um diese Schwierigkeiten zu umgehen, wäre der vorübergehende Verzicht auf einen quantifizierbaren ELISA, d.h. die direkte Bindung von Gp96 an die ELISA-Platte, denkbar. Außerdem dürften wesentlich höhere Konzentrationen an Gp96 und Peptiden als die bislang nach Blachere et al. verwendeten eine Beladung in diesem System künftig möglich machen.

4.1.2 Pro und Contra einer T-Zell-Hilfe für Gp96

Die Th_1-Subpopulation der T-Helferzellen ist durch die Produktion der Zytokine TNF-β und IFN-γ direkt an der Induktion zellulärer Immunantworten beteiligt (1.2.4). Für die Aktivierung (priming) CD8-positiver CTL sind sowohl CD4-abhängige wie auch CD4-unabhängige Mechanismen beschrieben. Die Induktion spezifischer CTL gegen extrazelluläre Antigene (Cross priming) benötigt die Anwesenheit von T-Helferzellen (Bennett et al., 1997). Da $CD8^+$ T-Zellen im Gegensatz zu B-Zellen keine MHC-II Moleküle exprimieren, sind sie nicht wie diese in der Lage, spezifisch die Aufmerksamkeit von T-Helferzellen auf sich zu lenken. Die T-Zell-Hilfe für CTL wird deshalb durch MHC-I und -II exprimierende APC (besonders DC) vermittelt. CTL und T-Helferzellen kommunizieren dabei mit der gleichen dendritischen Zelle. Eine zentrale Rolle in diesem Vorgang nimmt die DC-Aktivierung durch die Interaktion von CD40Ligand (auf T-Helferzellen) und CD40 (auf DC) ein. Blockierung von CD40 unterbindet die Effekte der T-Zell-Hilfe, welche durch CD40-agonistische Antikörper rekonstituiert werden können. Eine derartige DC-Aktivierung führt zu längerem Überleben der DC, höherer Expression kostimulatorischer Moleküle und zur Produktion von IL-12, dem wichtigsten Zytokin für die Differenzierung naiver T-Helferzellen in Th_1-Zellen (den Haan and Bevan, 2000; Constant and Bottomly, 1997).

Im Gegensatz dazu sind vor allem Viren in der Lage, CTL ohne bzw. mit nur geringer Hilfe CD4-positiver T-Zellen oder kostimulatorischer Moleküle (CD40, CD28, LFA-1) zu aktivieren. Neben LCMV und dem Vaccinia-Virus induzieren das Influenza-Virus und VSV spezifische CTL in MHC $II^{-/-}$, $CD40^{-/-}$ und CD4-depletierten Mäusen (Ruedl et al., 1999), wenn auch mit zum Teil abgeschwächter zytolytischer Aktivität. Obwohl die zugrundeliegenden Mechanismen noch unklar sind, scheint die hohe Antigenität der Viren gegenüber dem angeborenen Immunsystem von Bedeutung zu sein. Viele invariable Strukturen (PAMPs) wie virale dsRNA induzieren ebenso wie CD40L in DC Reifung, Expression kostimulatorischer Moleküle und die Produktion proinflammatorischer Zytokine (Bachmann et al., 1998; Cella et al., 1999). Außerdem können antivirale CTL selbst die Aktivierung von DC vermitteln. Die Injektion eines LCMV-Peptids (p33) in transgene Mäuse, die einen MHC-I restringierten TCR für dieses Peptid exprimieren, führt innerhalb von 24 Stunden zur Reifung von DC (Ruedl et al., 1999). Eine direkte

Virusinfektion der DC ist für die Reifung also nicht notwendig. Der gleiche Effekt wird in-vitro an $CD40^{-/-}$ DC in Abwesenheit von $CD4^+$ T-Zellen beobachtet.
Neben spezifischen Zellinteraktionen durch Rezeptoren und Liganden scheint auch das lokale Zytokin- und Lymphokinmilieu einen großen Einfluß auf die jeweilige CTL-Aktivierung zu haben. Der T-Zellhilfe werden daher mindestens drei Komponenten zugeschrieben: eine CD40-vermittelte DC-Aktivierung, eine CD40-unabhängige DC-Aktivierung sowie die direkte Kommunikation zwischen $CD4^+$ und $CD8^+$ T-Lymphozyt mittels Lymphokinen (Lu et al., 2000).

Stärkstes Argument für die essentiell notwendige Beteiligung der T-Zell-Hilfe an der Gp96-vermittelten CTL-Aktivierung sind Immunisierungsexperimente in CD4-depletierten sowie MHC $II^{-/-}$-Mäusen. In beiden Systemen konnte bislang keine spezifische, durch Gp96-assoziierte Peptide vermittelte CTL-Induktion nachgewiesen werden ((Tamura et al., 1997); H Schild, persönliche Mitteilung). Gleichzeitig sind die Effekte von Gp96-Vakzinierungen dosisabhängig. Hohe Dosen Gp96 führen zu einer Unterdrückung der Immunantwort, welche durch $CD4^+$ T-Zellen vermittelt ist und durch diese adoptiv transferriert werden kann (Chandawarkar et al., 1999). Die in diesen Experimenten zum Transfer verwendeten Zellen aus Milzen von Mäusen, welche mit hohen Gp96-Konzentrationen immunisiert wurden, bestanden jedoch nur zu >90% aus $CD4^+$ T-Zellen. Der gleichzeitige Transfer anderer Zellen mit immunologischer Wirkung ist daher nicht auszuschließen. Zudem sind diese T-Helferzellen bislang nicht genauer charakterisiert. Der in der vorliegenden Arbeit angestrebte Nachweis Gp96-assoziierter MHC-II Epitope steht weiter aus, die Beteiligung von $CD4^+$ T-Zellen an Gp96-vermittelter Immunität ist aber aufgrund der beschriebenen Hinweise naheliegend.

Jedoch muß die absolute Notwendigkeit einer T-Zell-Hilfe für Gp96 fraglich erscheinen, da dieses Molekül letztlich alle für eine erfolgreiche CTL-Aktivierung geforderten Fähigkeiten in sich vereint (Schild and Rammensee, 2000a). Da es sich um ein hochkonserviertes, phylogenetisch altes Molekül handelt, ist die Existenz eines noch nicht identifizierten, signalvermittelnden Rezeptors auf APC, wie kürzlich für Hsp60 und Hsp70 gezeigt (1.4.2), anzunehmen. Wie unter 3.2 gezeigt, induziert Gp96 in DC Reifung, Expression kostimulatorischer Moleküle und die Produktion proinflammatorischer

Zytokine (3.2.1; 4.2; (Singh-Jasuja et al., 2000a)). Diese Signale zeigen eine Abhängigkeit von intrazellulärem Ca^{++} (3.2.2). Weiterhin bindet Gp96 spezifisch an T- und B-Zellen (Singh-Jasuja et al., 2000b). In davon unabhängigen Experimenten wurde gezeigt, daß Gp96 CTL-Linien zur Produktion von TNF-α und IFN-γ anregt (Breloer et al., 1998). Auch B-Zellen werden durch die Gp96-Bindung, zumindest in-vitro, aktiviert (Singh-Jasuja, persönliche Mitteilung).

Gp96 ist also sowohl Teil des angeborenen Immunsystems als auch Trägermolekül für die spezifische, zelluläre Immunität. Seine Fähigkeiten der APC-Aktivierung, der Induktion von Zytokinen sowie der CTL- und B-Zellaktivierung sind klassische Domänen der T-Zell-Hilfe. Möglicherweise kommt T-Helferzellen daher nur unterstützende, aber keine essentielle Bedeutung für Gp96 zu. Außerdem machen evtl. die lokalen physiologischen Bedingungen am Ort der CTL-Induktion (Lymphknoten oder periphere Gewebe) und die jeweilige Kombination aus APC (Makrophagen oder DC) und T-Zellen ein unterschiedliches Ausmaß an T-Zell-Hilfe notwendig.

4.2 Das proinflammatorische Zytokinmuster Gp96-aktivierter DC

Die unter 3.2.1 gezeigten Experimente belegen die Aktivierung von DC des Menschen und der Maus durch Gp96 in-vitro. Die gemessene Zytokinproduktion ist nicht durch Endotoxin-Verunreinigungen in den Gp96-Proben bedingt, da die Wirkung des Proteins durch Denaturierung (Kochen) zerstört wird. Der LPS-Effekt bleibt dagegen erhalten. Dendritische Zellen der Maus produzieren ungefähr gleiche Mengen IL-12 und TNF-α. Humane DC sezernieren große Mengen IL-6, IL-12 und TNF-α. Die Produktion von IL-10 dagegen ist gering. Damit entspricht der durch Gp96 induzierte Zytokincocktail der inflammatorischen Reaktion phagozytierender Zellen auf eine Infektion.

Dendritische Zellen werden aufgrund ihrer Herkunft und Oberflächenmarker in myeloische (MDC) und lymphoide (LDC) DC unterteilt (1.3.4). Die unterschiedlichen Subpopulationen steuern mit Hilfe der Zytokinproduktion die Differenzierung der T-Zellantworten (Reid et al., 2000). Die genaue Kenntnis dieser Immunmodulation hat entscheidende Bedeutung für die Entwicklung von DC-Vakzinen. $CD8\alpha^-$-MDC der Maus induzieren in T-Helferzellen die Produktion von IL-4, IL-5 und IL-10, d.h. die

Ausbildung einer Th_2-Antwort. $CD8\alpha^+$-LDC sezernieren IL-12 und steuern so die Differenzierung von T-Helferzellen zu IL-2- und IFN-γ-produzierenden Th_1-Zellen. Im Gegensatz zu den Verhältnissen in der Maus induzieren humane MDC Th_1- und humane LDC Th_2-Antworten. Die CD40-vermittelte Aktivierung stellt für humane DC das wichtigste Reifungssignal dar. MDC reagieren darauf mit der Sekretion von IL-1α und β, IL-6, IL-8, IL-10 und IL-12, wohingegen LDC nur IL-8 produzieren.

Die in den vorliegenden Experimenten verwendeten DC aus Mäuseknochenmark werden der myeloiden Reihe zugerechnet (Inaba et al., 1992). Sie sind $CD8\alpha^-$, $CD11c^+$, $CD11b^+$, $CD80^+$, $CD86^+$, $CD40^+$ und exprimieren hohe Mengen MHC II. Die humanen DC wurden aus $CD14^+$ Monozyten des peripheren Bluts unter Zugabe von GM-CSF und IL-4 gezüchtet und gehören ebenfalls zu den MDC. Dies zeigt, daß das durch Gp96-vermittelte Signal weitgehend der CD40-vermittelten DC-Aktivierung entspricht und die Ausbildung einer Th_1-Antwort favorisiert, welche für die Aktivierung von CTL im Rahmen des Cross-priming wichtig ist (Bennett et al., 1997). Die Untersuchung der Gp96-vermittelten Aktivierung von DC anderer Herkunft steht in beiden Organismen noch aus.

Dendritische Zellen sind zunehmend Bestandteile neuer Vakzinierungsstrategien gegen Tumoren, Infektionen und Autoimmunkrankheiten. Die subkutane Injektion peptidbeladener DC führt im Menschen zur effektiven Induktion spezifischer CTL und T-Helferzellen (Dhodapkar et al., 1999). Hybride aus Tumorzellen und DC bewirken Regression und in manchen Fällen Elimination des metastasierenden Nierenzellkarzinoms (Kugler et al., 2000). Ähnliche Erfolge beim malignen Melanom zeigen Vakzine mit DC, die mit Tumorzellysaten oder Melanom-Peptiden vorinkubiert wurden (Nestle et al., 1998). Ein anderer Ansatz ist die Verwendung dendritischer Zellen, die mit Genen von Zytokinen oder Tumorantigenen transfiziert wurden. Im Maussystem ist die erfolgreiche Tumoreradikation mit Exosomen aus mit Tumorpeptiden inkubierten DC beschrieben (Zitvogel et al., 1998). Durch den Einsatz bestimmter DC-Subpopulationen können außer einer stimulierenden Wirkung auch immunsuppressive Effekte erzielt werden. Mit IL-10 vorbehandelte DC können in Mäusen Toleranz auslösen (Steinbrink et al., 1997). Die spezifische Unterdrückung der T-Helferzellantworten durch DC-Subpopulation bei Allergien stellt ein weiteres Anwendungsgebiet für DC-Vakzine dar.

Die erfolgreiche Vakzinierung mit DC setzt deren hohe Fähigkeit zur Antigenpräsentation, d.h. ihre Aktivierung voraus. Abhängig unter anderem vom Antigen und der Antigenkonzentration führt die CTL-Induktion durch DC in peripheren Lymphknoten zur Entwicklung von Immunität oder Toleranz. Injektion von löslichen Proteinantigenen ohne Adjuvans z.B. führt zur Proliferation antigenspezifischer CTL ohne lytische Aktivität in sekundären lymphatischen Organen (Lefrancois et al., 1999). Durch die systemische Gabe hoher Dosen eines Peptids des LCMV-Glycoproteins GP entstehen areaktive CTL, die keinen Schutz vor späterer LCMV-Infektion bieten. CD40-vermittelte DC-Aktivierung durch antigenspezifische T-Helferzellen kann solche Toleranz in CTL-Aktivierung umwandeln, so daß die Anwesenheit von $CD4^+$ T-Zellen die Ausbildung von Immunität unterstützt. Dieser Effekt kann durch Antikörper gegen CD40 imitiert werden und so die Wirksamkeit von normalerweise Toleranz-induzierenden Vakzinen erheblich steigern (Diehl et al., 1999).
Die beschriebenen Ansätze der DC-Vakzinierung konzentrieren sich also zum einen auf die Aktivierug von DC. Zum anderen wird versucht, durch Beladung mit Peptiden oder Transfektion von Proteingenen der Vakzine eine spezifische Komponente zu verleihen. Das Hitzeschockprotein Gp96 besitzt daher als Träger spezifischer Peptide auf der einen Seite und als potenter Aktivator dendritischer Zellen auf der anderen Seite ein einzigartiges Potential für die Entwicklung neuer Vakzinierungsstrategien.

4.3 Hsp60-Bindung und Autoimmunität

Die gezeigten FACS-Bindungsstudien mit TRITC-markiertem Hsp60 sind erste direkte Nachweise spezifischer Hsp60-Bindung an verschiedene Zelltypen. Die Spezifität der Bindung variiert in Abhängigkeit von der Stärke der TRITC-Markierung. Zu stark markierte Moleküle (OD > 0,6) zeigen im FACS hauptsächlich unspezifische Bindung, so daß nur Ergebnisse mit bestimmten Lots auswertbar waren (3.3). Da CD14 neben Tlr4 als Rezeptor für Hsp60 beschrieben ist (Kol et al., 2000), wurden zunächst CD14-exprimierende Zellinien und Frischkulturpräparationen untersucht. Dabei konnte eine Korrelation der Hsp60-Bindung (Lot 3) mit der CD14-Expression in einer Population aus DC und adherenten Makrophagen bzw. deren Vorläufer gezeigt werden (Abb. 21).

Für eine klare Abgrenzung der $CD14^+$ Zellen sind in weiteren Experimenten jedoch CD14/Hsp60-Doppelfärbungen notwendig. 10 µg Lot 2 zeigten spezifische und unspezifische (ersichtlich an den zwei Peaks der Bindungskurve) Bindung an die DC-Vorläuferlinie D2SC/1 (Abb. 22), welche zum Teil CD14 exprimiert (nicht gezeigt). Keine Hsp60-Bindung ließ sich jedoch in mehreren Experimenten mit Lot 2 und 5 (nicht gezeigt) an die $CD14^+$ Population peritonealer Exsudat-Zellen nachweisen. Eine mögliche Erklärung dafür wäre die Existenz verschiedener Splice-Varianten von CD14. Anstelle der CD14-abhängigen Bindung wurde jedoch eine, wenn auch schwache, Hsp60-Bindung an die Population $CD19^+$ B-Zellen beobachtet. Die relative Schwäche dieser Bindung legt nahe, daß es sich lediglich um eine unspezifische Bindung an die größeren B-Zellen handelt. Tatsächlich steigt die Intensität der Bindung zu den größeren Zellen hin an (R2 zu R3). Jedoch zeigen auch die B-Zellen in R2, die die gleiche Größe wie die nicht-bindenen $CD14^+$ Zellen in R1 besitzen, eine Hsp60-Bindung. Dies spricht für die Spezifität der Bindung. Bei den $CD19^+$ B-Zellen des murinen Peritoneums handelt es sich zum größten Teil um sog. B-1 Zellen. B-1 Zellen sind eine Subpopulation konventioneller B-Zellen, die sich durch die Expression von CD5, einer hohen IgM-, sehr geringen IgD- und B220-Expression und dem Fehlen von CD23 auszeichnen (Hayakawa and Hardy, 2000). Sie produzieren hauptsächlich IgM- und IgG3- Antikörper mit geringer Affinität und häufiger Autoreaktivität, die eine breite Spezifität gegen bakterielle Polysaccharide, Lipide und Autoantigene wie ssDNA und IgG aufweisen (Sato et al., 1996). Aufgrund dieser Eigenschaften wird ihnen eine Rolle als Mediatoren der angeborenen Immunität zugesprochen. Kreuzreaktive Antikörper gegen bakterielle Hsp60-Moleküle werden im Rahmen verschiedener Autoimmunkrankheiten des Menschen gefunden (siehe unten). Vor diesem Hintergrund ist die weitere Charakterisierung der gezeigten Hsp60-Bindung an B-Zellen der Bauchhöhle ein interessanter Aspekt in der Pathogenese Hsp60-vermittelter Autoreaktivität.

Aufgrund der hohen Homologie von menschlichem Hsp60 mit Hsp60-Molekülen pathogener Mikroorganismen (60% Homologie zu z.B. mykobakteriellem Hsp60) sind kreuzreagierende Antikörper und T-Zellen relativ häufig. Solche auf dem Boden molekularen Mimikris entstehenden Effektoren werden als ein wichtiger pathogenetischer Faktor für die Entwicklung von Autoimmunkrankheiten angesehen (Zugel and Kaufmann, 1999). Antikörper gegen körpereigenes Hsp60 finden sich unter anderem in Pati-

enten mit Borelliose *(Borrelia burgdorferi)*, Lepra *(Mykobakterium leprae)* und Chlamydia trachomatis-Infektionen.

4.4 Peptidmotiv und Liganden des Schweine-MHC-I Moleküls PD1

4.4.1 Peptidmotiv

Aufgrund der niedrigen Oberflächenexpression des PD1-Moleküls war mit den zuerst verwendeten A505-Zellen lediglich eine Bestimmung des Peptidmotivs möglich. Die gezeigten Poolsequenzierungsdaten (2.8.2) bestätigten und ergänzten hierbei frühere Ergebnisse von John Gatfield, Tübingen mit der gleichen Zellinie (Gatfield, 1998). Zwei Ankerpositionen wurden erneut deutlich durch starke Signale von Asparaginsäure (D) an P3 sowie der aromatischen Aminosäuren Tyrosin (Y) und Phenylalanin (F) an P9. An P2 sind auf Grund der Signalstärke Leucin, Isoleucin und Valin als Hilfsanker anzunehmen. Weitere Präferenzen wurden an P6 für L, I und V sowie an P4 für K und P erkennbar. Betrachtet man die an der Bildung der D-Tasche beteiligten Aminosäuren des PD-1 Moleküls und vergleicht sie mit den polymorphen Aminosäuren von D-Taschen humaner MHC-Allele, so erklärt sich die Präferenz für Peptide mit saurem Rest an P3 (Tabelle 7). HLA-A*0101 besitzt hier drei basische Aminosäuren, A*0201, A*1101 sowie B*3801 haben jeweils lediglich zwei basische Reste, wohingegen die Sequenz von PD1 derer vier aufweist. Unter Verwendung eines dreidimensionalen Molekülmodells von HLA-A2 wird deutlich, daß Arginin in Position 156 den direkten Kontakt zum Liganden herstellt, während weitere R in den Positionen 114 und 163 für die notwendige basische Umgebung in der Tasche sorgen (Stefan Stevanovic, persönliche Mitteilung). HLA-A1, das wie PD1 D und E als Ankeraminosäuren in P3 benötigt, besitzt ebenfalls Arginin an den Positionen 114, 156 und 163 seiner Sequenz. HLA-A11 hingegen, das Asparagin nicht als Anker verwendet, fehlt das R an Position 156, nicht jedoch an P114 und P163. Insgesamt ist das PD1-Peptidmotiv damit ein klassisches Motiv eines MHC-I Allels mit der größten Ähnlichkeit zum humanen HLA-A1-Motiv.

Tabelle 7: Vergleich der D-taschenbildenden Aminosäuren verschiedener MHC-Allele. Wie PD1 findet sich eine besondere Ansammlung basischer Aminosäuren bei HLA-A1, HLA-A2 und HLA-B*3801. Erstere benötigen wie PD1 Asparaginsäure an P3 als Anker, HLA-B3 bevorzugt D an dieser Position als Hilfsanker.

Allel	7	9	62	66	70	97	99	113	114	152	155	156	159	160	163
A*0101	Y	F	Q	N	H	I	Y	Y	**R**	A	Q	**R**	Y	L	**R**
B*3801	Y	Y	**R**	I	N	**R**	Y	H	N	V	Q	L	Y	L	T
A*0301	Y	F	Q	N	Q	I	Y	Y	**R**	**E**	Q	L	Y	L	T
A*1101	Y	Y	Q	N	Q	I	Y	Y	**R**	A	Q	Q	Y	L	**R**
A*0201	Y	F	G	K	H	**R**	Y	Y	**H**	V	Q	L	Y	L	T
A*2401	Y	S	E	K	H	M	F	Y	**H**	V	Q	Q	Y	L	T
B*5101	Y	Y	R	I	N	T	Y	H	N	**E**	Q	L	Y	L	L
A*2601	Y	Y	R	N	H	**R**	Y	Y	Q	**E**	Q	W	Y	L	**R**
PD1	Y	Y	E	K	N	S	F	Y	**R**	**E**	**R**	**R**	Y	L	**R**

Quelle der PD1-Sequenz: (Sullivan et al., 1997)
Quelle der humanen HLA-Sequenzen: (Rammensee et al., 1997)

4.4.2 Liganden

Durch Verwendung der Zellinie PD1.1, die eine hohe Expression des PD1-Moleküls aufweist, war ergänzend zum Peptidmotiv auch die Bestimmung zweier Einzelliganden möglich (2.8.3). Beide Liganden weisen den postulierten Anker Asparaginsäure an Position 3 in der Peptidsequenz auf. Im Peptid EQDSLLTAF findet sich zudem auch das im Peptidmotiv erkennbare Phenylalanin an P9 als zweiter Anker. Beide Peptide stammen ihrer Herkunft nach aus zwei Proteinen der Maus, deren Peptide häufig als Liganden anderer MHC-Moleküle gefunden werden. VLDPRGIYL ist Teil des CD3-Proteins, welches als T-Zell-Rezeptor auf der Oberfläche von T-Zellen exprimiert wird. Da es sich bei der verwendeten Zellinie PD1.1 um eine $CD8^+$ leukämische T-Zellinie handelt, ist die Präsentation eines Peptids des T-Zellrezeptors folglich gut erklärbar.

Das Verständnis der humanen Immunantwort auf Xenoantigene hat entscheidende Bedeutung für die erfolgreiche Verwendung von Transplantaten über Speziesgrenzen hinweg. In den letzten Jahren sind wichtige Erkenntnisse über die Mechanismen von Abstoßungsreaktionen des menschlichen Immunsystems gegenüber Gewebe aus Schweinen gewonnen worden. Dabei konnten sowohl humorale wie auch zelluläre Reaktionen identifiziert werden, die zu unterschiedlichen Zeiten ablaufen. Auf der humoralen Seite

aktiviert ein Disaccharid mit einer gal-α1-3-gal Verbindung auf der Oberfläche von Schweinezellen direkt das Komplementsystem, wodurch es zu einer hyperakuten Abstoßungsreaktion kommt (Fodor et al., 1994). Auf der zellulären Seite führen Sequenzunterschiede zwischen dem humanen und dem Schweine-MHC-Molekül (SLA = swine lymphocyte antigen) zu direkter Zellyse durch NK-Zellen. Humane MHC-Moleküle vermitteln NK-Zellen ein inhibitorisches Signal, das die Lyse körpereigener Zellen verhindert. Sequenzanalysen zeigten, daß sich Schweine-MHC-Moleküle an für die Bindung der sogenannten „NK-cell inhibitory receptors“ entscheidenden Positionen von HLA-Molekülen unterscheiden (Sullivan et al., 1997). Neben der direkten Zellyse sezernieren NK-Zellen verschiedenste Zytokine, die ihrerseits Einfluß nehmen auf eine weitere zelluläre, T-zellvermittelte, Abstoßungsreaktion. Von Untersuchungen an allogenem Gewebe ist bekannt, daß die meisten T-Zellen allogene MHC-Moleküle in Verbindung mit den von diesen präsentierten Peptiden erkennen, wobei aber auch Peptid-unabhängige Erkennungsmechanismen beschrieben sind (Xu et al., 2001). Kürzlich konnte gezeigt werden, daß auch xenogene MHC-Moleküle sowohl allel-spezifisch als auch Peptid-abhängig von zytotoxischen T-Zellen erkannt werden (Xu et al., 1999). Unter Verwendung zweier verschiedener Zellinien aus Yucatan-Inzucht-Schweinen (Endothel- und lymphoblastische Zellen) wurde nachgewiesen, daß beide Zellinien SLA-restringierte, peptidspezifische CTL-Reaktionen induzieren. Die gewebespezifischen Peptide beeinflussen darüber hinaus die Vβ-Genverteilung des xenoreaktiven T-Zellrepertoires (Xu et al., 2001). Diese Ergebnisse unterstreichen die Bedeutung der durch SLA-Komplexe präsentierten Peptide für die Entwicklung einer zellulären Abstoßungsreaktion. Die Kenntnis der Peptidmotive von SLA-Molekülen und deren Liganden ist deshalb ein wichtiger Beitrag für Xenotransplantationsstudien.

4.5 Fragestellungen und Ausblick

Gp96:

Der wichtigste nächste Schritt für eine erfolgreiche Beantwortung der Frage nach Gp96-assoziierten MHC-II Epitopen ist die reproduzierbare Peptidbeladung von Gp96. Unter Verwendung des hier vorgestellten Europium-ELISA-Protokolls konnte dies in der Zwischenzeit von Petra Schwarzmeier, Tübingen, realisiert werden. Damit sollte es möglich sein, mittels Repräsentationsassays festzustellen, ob MHC-II Epitope prinzipiell durch Gp96 in den Klasse-II Antigenprozessierungsweg gelangen können. Erst in-vivo Experimente werden jedoch zeigen, ob dies auch im jeweiligen lokalen Umfeld einer Gp96-Freisetzung aus Zellen/ Gp96-Immunisierung eine funktionelle Relevanz für eine effektive CTL-Antwort hat. Die gezeigte Aktivierung dendritischer Zellen durch Gp96 macht diese jedoch eventuell zu einem wichtigeren Instrument zur Beeinflussung und Steuerung der CTL-Antwort. Im Hinblick auf die Rolle der Hitzeschockproteine bei der Ausbildung von Autoimmunität und allergischen Reaktionen ist die Kenntnis der T-Helferzellfunktion jedoch von unvermindert wichtiger Bedeutung.

Hsp60:

Im Hinblick auf die Charakterisierung der Hsp60-Bindung an verschiedene Zelltypen stellt die hier beobachtete, wenn auch schwache, Bindung an $CD19^+$ B-Zellen aus Peritonealexsudat von Mäusen einen interessanten Ausgangspunkt für weitere Bindungsstudien dar. Doppelfärbungen und der Bindungsnachweis im konfokalen Fluoreszenzmikroskop sind hier wichtige nächste Schritte.

PD1:

Interessant ist hier die Frage, ob die gefundenen Liganden auch in-vivo Bedeutung haben. Um das Motiv zu bestätigen, sollten Peptide aus Erregern vorhergesagt werden, um spezifische CTL zu generieren. Gleichzeitig kann untersucht werden, ob die Peptide in der Lage sind, PD1-Komplexe auf Zellen mit niedriger TAP-Expression und folglich niedriger PD1-Expression zu stabilisieren.

5 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden:

- Gp96 aktiviert humane und murine dendritische Zellen und induziert die Produktion der Zytokine IL-6, IL-10, TNF-α und IL-12. Diese Aktivierung ist Calcium-abhängig.
- die Bindung von humanem und chlamydialem TRITC-markiertem Hsp60 an $CD14^+$ D2SC/1-Zellen sowie die Korrelation von CD14-Expression und Hsp60-Bindung auf BMDC. Die beobachtete Hsp60-Bindung an $CD19^+$ B-Zellen im Peritonealexsudat von Mäusen ist schwach, stellt jedoch einen interessanten Ausgangspunkt für weitere Bindungsstudien dar.
- erste Versuche zur Etablierung eines nicht-radioaktiven Assay für die Beladung von Gp96 mit exogenen Peptiden.
- die erfolgreiche Bestimmung zweier natürlicher Liganden des für die Xenotransplantation wichtigen Schweine-MHC-I-Moleküls PD1 und deren Übereinstimmung mit dem zuvor bestimmten Peptidmotiv.

Der angestrebte Nachweis der Aktivierung MHC-II restringierter T-Zellen durch Gp96-assoziierte Peptide konnte im verwendeten Modellsystem bislang nicht erbracht werden. Mit Hilfe des Beladungsassays für Gp96 sollte dies jedoch in Zukunft möglich sein.

6 Anhang

6.1 Literatur

Albert,M.L., Pearce,S.F., Francisco,L.M., Sauter,B., Roy,P., Silverstein,R.L., and Bhardwaj,N. (1998a). Immature dendritic cells phagocytose apoptotic cells via alphavbeta5 and CD36, and cross-present antigens to cytotoxic T lymphocytes. J. Exp. Med. *188*, 1359-1368.

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

Alper,T., Cramp,W.A., Haig,D.A., and Clarke,M.C. (1967). Does the agent of scrapie replicate without nucleic acid? Nature *214*, 764-766.

Amigorena,S., Drake,J.R., Webster,P., and Mellman,I. (1994). Transient accumulation of new class II MHC molecules in a novel endocytic compartment in B lymphocytes. Nature *369*, 113-120.

Amigorena,S., Webster,P., Drake,J., Newcomb,J., Cresswell,P., and Mellman,I. (1995). Invariant chain cleavage and peptide loading in major histocompatibility complex class II vesicles. J. Exp. Med. *181*, 1729-1741.

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

Arnold,D., Wahl,C., Faath,S., Rammensee,H.G., and Schild,H. (1997). Influences of transporter associated with antigen processing (TAP) on the repertoire of peptides associated with the endoplasmic reticulum-resident stress protein gp96. J. Exp. Med. *186*, 461-466.

Arnold-Schild,D., Hanau,D., Spehner,D., Schmid,C., Rammensee,H.G., de la Salle,H., and Schild,H. (1999). Cutting edge: receptor-mediated endocytosis of heat shock proteins by professional antigen-presenting cells. J. Immunol. *162*, 3757-3760.

Arnold-Schild,D., Kleist,C., Welschof,M., Opelz,G., Rammensee,H.G., Schild,H., and Terness,P. (2000). One-step single-chain Fv recombinant antibody-based purification of gp96 for vaccine development. Cancer Res. *60*, 4175-4178.

Arstila,T.P., Casrouge,A., Baron,V., Even,J., Kanellopoulos,J., and Kourilsky,P. (1999). A direct estimate of the human alphabeta T cell receptor diversity. Science *286*, 958-961.

Asea,A., Kraeft,S.K., Kurt-Jones,E.A., Stevenson,M.A., Chen,L.B., Finberg,R.W., Koo,G.C., and 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.

Bachmann,M.F., Zinkernagel,R.M., and Oxenius,A. (1998). Immune responses in the absence of costimulation: viruses know the trick. J. Immunol. *161*, 5791-5794.

Banchereau,J., Briere,F., Caux,C., Davoust,J., Lebecque,S., Liu,Y.J., Pulendran,B., and Palucka,K. (2000). Immunobiology of dendritic cells. Annu. Rev. Immunol. *18*, 767-811.

Banchereau,J. and Steinman,R.M. (1998). Dendritic cells and the control of immunity. Nature *392*, 245-252.

Bashi,O. and Ehrlich,R. (1995). Characterization of mature and immature RadLV-induced thymic T-cell lines for tumorigenesis and MHC-class-I gene expression. Int. J. Cancer *61*, 67-75.

Basu,S., Binder,R.J., Suto,R., Anderson,K.M., and Srivastava,P.K. (2000). Necrotic but not apoptotic cell death releases heat shock proteins, which deliver a partial maturation signal to dendritic cells and activate the NF-kappa B pathway. Int. Immunol. *12*, 1539-1546.

Basu,S. and Srivastava,P.K. (1999). Calreticulin, a peptide-binding chaperone of the endoplasmic reticulum, elicits tumor- and peptide-specific immunity. J. Exp. Med. *189*, 797-802.

Basu,S. and Srivastava,P.K. (2000). Heat shock proteins: the fountainhead of innate and adaptive immune responses. Cell Stress. Chaperones. *5*, 443-451.

Bennett,S.R., Carbone,F.R., Karamalis,F., Miller,J.F., and Heath,W.R. (1997). Induction of a CD8+ cytotoxic T lymphocyte response by cross-priming requires cognate CD4+ T cell help. J. Exp. Med. *186*, 65-70.

Bevan,M.J. (1976). Cross-priming for a secondary cytotoxic response to minor H antigens with H-2 congenic cells which do not cross-react in the cytotoxic assay. J. Exp. Med. *143*, 1283-1288.

Bevan,M.J. (1987). Antigen recognition. Class discrimination in the world of immunology. Nature *325*, 192-194.

Binder,R.J., Anderson,K.M., Basu,S., and Srivastava,P.K. (2000a). Cutting edge: heat shock protein gp96 induces maturation and migration of CD11c+ cells in vivo. J. Immunol. *165*, 6029-6035.

Binder,R.J., Han,D.K., and Srivastava,P.K. (2000b). CD91: a receptor for heat shock protein gp96. Nat. Immunol. *1*, 151-155.

Birk,O.S., Douek,D.C., Elias,D., Takacs,K., Dewchand,H., Gur,S.L., Walker,M.D., van der,Z.R., Cohen,I.R., and Altmann,D.M. (1996). A role of Hsp60 in autoimmune diabetes: analysis in a transgenic model. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A *93*, 1032-1037.

Bjorkman,P.J., Saper,M.A., Samraoui,B., Bennett,W.S., Strominger,J.L., and Wiley,D.C. (1987). The foreign antigen binding site and T cell recognition regions of class I histocompatibility antigens. Nature *329*, 512-518.

Blachere,N.E., Li,Z., Chandawarkar,R.Y., Suto,R., Jaikaria,N.S., Basu,S., Udono,H., and Srivastava,P.K. (1997). Heat shock protein-peptide complexes, reconstituted in vitro, elicit peptide-specific cytotoxic T lymphocyte response and tumor immunity. J. Exp. Med. *186*, 1315-1322.

Blachere,N.E., Udono,H., Janetzki,S., Li,Z., Heike,M., and Srivastava,P.K. (1993). Heat shock protein vaccines against cancer. J. Immunother. *14*, 352-356.

Braig,K., Otwinowski,Z., Hegde,R., Boisvert,D.C., Joachimiak,A., Horwich,A.L., and Sigler,P.B. (1994). The crystal structure of the bacterial chaperonin GroEL at 2.8 A. Nature *371*, 578-586.

Breloer,M., Marti,T., Fleischer,B., and von Bonin,A. (1998). Isolation of processed, H-2Kb-binding ovalbumin-derived peptides associated with the stress proteins HSP70 and gp96. Eur. J. Immunol. *28*, 1016-1021.

Caplan,A.J. (1999). Hsp90's secrets unfold: new insights from structural and functional studies. Trends Cell Biol. *9*, 262-268.

Cardozo,C. and Kohanski,R.A. (1998). Altered properties of the branched chain amino acid-preferring activity contribute to increased cleavages after branched chain residues by the "immunoproteasome". J. Biol. Chem. *273*, 16764-16770.

Castellino,F., Boucher,P.E., Eichelberg,K., Mayhew,M., Rothman,J.E., Houghton,A.N., and Germain,R.N. (2000). Receptor-mediated uptake of antigen/heat shock protein complexes results in major histocompatibility complex class I antigen presentation via two distinct processing pathways. J. Exp. Med. *191*, 1957-1964.

Cella,M., Salio,M., Sakakibara,Y., Langen,H., Julkunen,I., and Lanzavecchia,A. (1999). Maturation, activation, and protection of dendritic cells induced by double-stranded RNA. J. Exp. Med. *189*, 821-829.

Chandawarkar,R.Y., Wagh,M.S., and Srivastava,P.K. (1999). The dual nature of specific immunological activity of tumor-derived gp96 preparations. J. Exp. Med. *189*, 1437-1442.

Chen,W., Syldath,U., Bellmann,K., Burkart,V., and Kolb,H. (1999). Human 60-kDa heat-shock protein: a danger signal to the innate immune system. J. Immunol. *162*, 3212-3219.

Chiu,I., Davis,D.M., and Strominger,J.L. (1999). Trafficking of spontaneously endocytosed MHC proteins. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A *96*, 13944-13949.

Ciupitu,A.M., Petersson,M., O'Donnell,C.L., Williams,K., Jindal,S., Kiessling,R., and Welsh,R.M. (1998). Immunization with a lymphocytic choriomeningitis virus peptide mixed

with heat shock protein 70 results in protective antiviral immunity and specific cytotoxic T lymphocytes. J. Exp. Med. *187*, 685-691.

Constant,S.L. and Bottomly,K. (1997). Induction of Th1 and Th2 CD4+ T cell responses: the alternative approaches. Annu. Rev. Immunol. *15*, 297-322.

Cresswell,P. (1996). Invariant chain structure and MHC class II function. Cell *84*, 505-507.

Csermely,P., Schnaider,T., Soti,C., Prohaszka,Z., and Nardai,G. (1998). The 90-kDa molecular chaperone family: structure, function, and clinical applications. A comprehensive review. Pharmacol. Ther. *79*, 129-168.

Davis,M.M. and Bjorkman,P.J. (1988). T-cell antigen receptor genes and T-cell recognition. Nature *334*, 395-402.

Day,P.M., Yewdell,J.W., Porgador,A., Germain,R.N., and Bennink,J.R. (1997). Direct delivery of exogenous MHC class I molecule-binding oligopeptides to the endoplasmic reticulum of viable cells. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A *94*, 8064-8069.

den Haan,J.M. and Bevan,M.J. (2000). A novel helper role for CD4 T cells. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A *97*, 12950-12952.

Dhodapkar,M.V., Steinman,R.M., Sapp,M., Desai,H., Fossella,C., Krasovsky,J., Donahoe,S.M., Dunbar,P.R., Cerundolo,V., Nixon,D.F., and Bhardwaj,N. (1999). Rapid generation of broad T-cell immunity in humans after a single injection of mature dendritic cells. J. Clin. Invest *104*, 173-180.

Diehl,L., den Boer,A.T., Schoenberger,S.P., van der Voort,E.I., Schumacher,T.N., Melief,C.J., Offringa,R., and Toes,R.E. (1999). CD40 activation in vivo overcomes peptide-induced peripheral cytotoxic T-lymphocyte tolerance and augments anti-tumor vaccine efficacy. Nat. Med. *5*, 774-779.

Ding,Y.H., Smith,K.J., Garboczi,D.N., Utz,U., Biddison,W.E., and Wiley,D.C. (1998). Two human T cell receptors bind in a similar diagonal mode to the HLA-A2/Tax peptide complex using different TCR amino acids. Immunity. *8*, 403-411.

Fadok,V.A., Bratton,D.L., Rose,D.M., Pearson,A., Ezekewitz,R.A., and Henson,P.M. (2000). A receptor for phosphatidylserine-specific clearance of apoptotic cells. Nature *405*, 85-90.

Falk,K., Rotzschke,O., Stevanovic,S., Jung,G., and Rammensee,H.G. (1991). Allele-specific motifs revealed by sequencing of self-peptides eluted from MHC molecules. Nature *351*, 290-296.

Fearon,D.T. (2000). Innate immunity--beginning to fulfill its promise? Nat. Immunol. *1*, 102-103.

Fearon,D.T. and Locksley,R.M. (1996). The instructive role of innate immunity in the acquired immune response. Science *272*, 50-53.

Fehling,H.J., Swat,W., Laplace,C., Kuhn,R., Rajewsky,K., Muller,U., and von Boehmer,H. (1994). MHC class I expression in mice lacking the proteasome subunit LMP-7. Science *265*, 1234-1237.

Fenteany,G., Standaert,R.F., Lane,W.S., Choi,S., Corey,E.J., and Schreiber,S.L. (1995). Inhibition of proteasome activities and subunit-specific amino-terminal threonine modification by lactacystin. Science *268*, 726-731.

Flynn,G.C., Chappell,T.G., and Rothman,J.E. (1989). Peptide binding and release by proteins implicated as catalysts of protein assembly. Science *245*, 385-390.

Fodor,W.L., Williams,B.L., Matis,L.A., Madri,J.A., Rollins,S.A., Knight,J.W., Velander,W., and Squinto,S.P. (1994). Expression of a functional human complement inhibitor in a transgenic pig as a model for the prevention of xenogeneic hyperacute organ rejection. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A *91*, 11153-11157.

Fraser,I.P., Koziel,H., and Ezekowitz,R.A. (1998). The serum mannose-binding protein and the macrophage mannose receptor are pattern recognition molecules that link innate and adaptive immunity. Semin. Immunol. *10*, 363-372.

Gaczynska,M., Rock,K.L., and Goldberg,A.L. (1993). Gamma-interferon and expression of MHC genes regulate peptide hydrolysis by proteasomes. Nature *365*, 264-267.

Garboczi,D.N., Ghosh,P., Utz,U., Fan,Q.R., Biddison,W.E., and Wiley,D.C. (1996). Structure of the complex between human T-cell receptor, viral peptide and HLA-A2. Nature *384*, 134-141.

Garcia,K.C., Degano,M., Pease,L.R., Huang,M., Peterson,P.A., Teyton,L., and Wilson,I.A. (1998). Structural basis of plasticity in T cell receptor recognition of a self peptide-MHC antigen. Science *279*, 1166-1172.

Gatfield, J. Diploma Thesis. 59-61. 1998.
Ref Type: Thesis/Dissertation

Geijtenbeek,T.B., Kwon,D.S., Torensma,R., van Vliet,S.J., van Duijnhoven,G.C., Middel,J., Cornelissen,I.L., Nottet,H.S., KewalRamani,V.N., Littman,D.R., Figdor,C.G., and van Kooyk,Y. (2000a). DC-SIGN, a dendritic cell-specific HIV-1-binding protein that enhances trans-infection of T cells. Cell *100*, 587-597.

Geijtenbeek,T.B., Torensma,R., van Vliet,S.J., van Duijnhoven,G.C., Adema,G.J., van Kooyk,Y., and Figdor,C.G. (2000b). Identification of DC-SIGN, a novel dendritic cell-specific ICAM-3 receptor that supports primary immune responses. Cell *100*, 575-585.

Germain,R.N. and Stefanova,I. (1999). The dynamics of T cell receptor signaling: complex orchestration and the key roles of tempo and cooperation. Annu. Rev. Immunol. *17*, 467-522.

Girolomoni,G., Lutz,M.B., Pastore,S., Assmann,C.U., Cavani,A., and Ricciardi-Castagnoli,P. (1995). Establishment of a cell line with features of early dendritic cell precursors from fetal mouse skin. Eur. J. Immunol. *25*, 2163-2169.

Gorer,P.A. (1936). The detection of antigenic differences in mouse erythrocytes by the employment of immune sera. Br. J. Exp. Pathol. *17*, 42-50.

Granucci,F., Girolomoni,G., Lutz,M.B., Foti,M., Marconi,G., Gnocchi,P., Nolli,L., and Ricciardi-Castagnoli,P. (1994). Modulation of cytokine expression in mouse dendritic cell clones. Eur. J. Immunol. *24*, 2522-2526.

Groettrup,M., Soza,A., Eggers,M., Kuehn,L., Dick,T.P., Schild,H., Rammensee,H.G., Koszinowski,U.H., and Kloetzel,P.M. (1996). A role for the proteasome regulator PA28alpha in antigen presentation. Nature *381*, 166-168.

Hartl,F.U. (1996). Molecular chaperones in cellular protein folding. Nature *381*, 571-579.

Hayakawa,K. and Hardy,R.R. (2000). Development and function of B-1 cells. Curr. Opin. Immunol. *12*, 346-353.

Hayer-Hartl,M.K., Ewbank,J.J., Creighton,T.E., and Hartl,F.U. (1994). Conformational specificity of the chaperonin GroEL for the compact folding intermediates of alpha-lactalbumin. EMBO J. *13*, 3192-3202.

Heath,W.R. and Carbone,F.R. (1999). Cytotoxic T lymphocyte activation by cross-priming. Curr. Opin. Immunol. *11*, 314-318.

Heikema,A., Agsteribbe,E., Wilschut,J., and Huckriede,A. (1997). Generation of heat shock protein-based vaccines by intracellular loading of gp96 with antigenic peptides. Immunol. Lett. *57*, 69-74.

Hemmi,H., Takeuchi,O., Kawai,T., Kaisho,T., Sato,S., Sanjo,H., Matsumoto,M., Hoshino,K., Wagner,H., Takeda,K., and Akira,S. (2000). A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. Nature *408*, 740-745.

Hoshino,K., Takeuchi,O., Kawai,T., Sanjo,H., Ogawa,T., Takeda,Y., Takeda,K., and Akira,S. (1999). Cutting edge: Toll-like receptor 4 (TLR4)-deficient mice are hyporesponsive to lipopolysaccharide: evidence for TLR4 as the Lps gene product. J. Immunol. *162*, 3749-3752.

Hosken,N.A. and Bevan,M.J. (1990). Defective presentation of endogenous antigen by a cell line expressing class I molecules. Science *248*, 367-370.

Huang,A.Y., Bruce,A.T., Pardoll,D.M., and Levitsky,H.I. (1996). In vivo cross-priming of MHC class I-restricted antigens requires the TAP transporter. Immunity. *4*, 349-355.

Hughes,E.A. and Cresswell,P. (1998). The thiol oxidoreductase ERp57 is a component of the MHC class I peptide-loading complex. Curr. Biol. *8*, 709-712.

Hunt,J.F., Weaver,A.J., Landry,S.J., Gierasch,L., and Deisenhofer,J. (1996). The crystal structure of the GroES co-chaperonin at 2.8 A resolution. Nature *379*, 37-45.

Inaba,K., Inaba,M., Naito,M., and Steinman,R.M. (1993). Dendritic cell progenitors phagocytose particulates, including bacillus Calmette-Guerin organisms, and sensitize mice to mycobacterial antigens in vivo. J. Exp. Med. *178*, 479-488.

Inaba,K., Inaba,M., Romani,N., Aya,H., Deguchi,M., Ikehara,S., Muramatsu,S., and Steinman,R.M. (1992). Generation of large numbers of dendritic cells from mouse bone marrow cultures supplemented with granulocyte/macrophage colony-stimulating factor. J. Exp. Med. *176*, 1693-1702.

Inaba,K., Turley,S., Iyoda,T., Yamaide,F., Shimoyama,S., Reis e Sousa, Germain,R.N., Mellman,I., and Steinman,R.M. (2000). The formation of immunogenic major histocompatibility complex class II-peptide ligands in lysosomal compartments of dendritic cells is regulated by inflammatory stimuli. J. Exp. Med. *191*, 927-936.

Inaba,K., Turley,S., Yamaide,F., Iyoda,T., Mahnke,K., Inaba,M., Pack,M., Subklewe,M., Sauter,B., Sheff,D., Albert,M., Bhardwaj,N., Mellman,I., and Steinman,R.M. (1998). Efficient presentation of phagocytosed cellular fragments on the major histocompatibility complex class II products of dendritic cells. J. Exp. Med. *188*, 2163-2173.

Itoh,H., Kobayashi,R., Wakui,H., Komatsuda,A., Ohtani,H., Miura,A.B., Otaka,M., Masamune,O., Andoh,H., Koyama,K., and . (1995). Mammalian 60-kDa stress protein (chaperonin homolog). Identification, biochemical properties, and localization. J. Biol. Chem. *270*, 13429-13435.

Jiang,W., Swiggard,W.J., Heufler,C., Peng,M., Mirza,A., Steinman,R.M., and Nussenzweig,M.C. (1995). The receptor DEC-205 expressed by dendritic cells and thymic epithelial cells is involved in antigen processing. Nature *375*, 151-155.

Klein,J. and Sato,A. (2000). The HLA system. First of two parts. N. Engl. J. Med. *343*, 702-709.

Kol,A., Bourcier,T., Lichtman,A.H., and Libby,P. (1999). Chlamydial and human heat shock protein 60s activate human vascular endothelium, smooth muscle cells, and macrophages. J. Clin. Invest *103*, 571-577.

Kol,A., Lichtman,A.H., Finberg,R.W., Libby,P., and Kurt-Jones,E.A. (2000). Cutting edge: heat shock protein (HSP) 60 activates the innate immune response: CD14 is an essential receptor for HSP60 activation of mononuclear cells [In Process Citation]. J. Immunol. 2000. Jan. 1. ;164. (1.):13. -7. *164*, 13-17.

Kugler,A., Stuhler,G., Walden,P., Zoller,G., Zobywalski,A., Brossart,P., Trefzer,U., Ullrich,S., Muller,C.A., Becker,V., Gross,A.J., Hemmerlein,B., Kanz,L., Muller,G.A., and Ringert,R.H.

(2000). Regression of human metastatic renal cell carcinoma after vaccination with tumor cell-dendritic cell hybrids. Nat. Med. *6*, 332-336.

Kurts,C., Carbone,F.R., Barnden,M., Blanas,E., Allison,J., Heath,W.R., and Miller,J.F. (1997a). CD4+ T cell help impairs CD8+ T cell deletion induced by cross-presentation of self-antigens and favors autoimmunity. J. Exp. Med. *186*, 2057-2062.

Kurts,C., Heath,W.R., Kosaka,H., Miller,J.F., and Carbone,F.R. (1998). The peripheral deletion of autoreactive CD8+ T cells induced by cross-presentation of self-antigens involves signaling through CD95 (Fas, Apo-1). J. Exp. Med. *188*, 415-420.

Kurts,C., Kosaka,H., Carbone,F.R., Miller,J.F., and Heath,W.R. (1997b). Class I-restricted cross-presentation of exogenous self-antigens leads to deletion of autoreactive CD8(+) T cells. J. Exp. Med. *186*, 239-245.

Lammert,E., Arnold,D., Nijenhuis,M., Momburg,F., Hammerling,G.J., Brunner,J., Stevanovic,S., Rammensee,H.G., and Schild,H. (1997a). The endoplasmic reticulum-resident stress protein gp96 binds peptides translocated by TAP. Eur. J. Immunol. *27*, 923-927.

Lammert,E., Arnold,D., Rammensee,H.G., and Schild,H. (1996). Expression levels of stress protein gp96 are not limiting for major histocompatibility complex class I-restricted antigen presentation. Eur. J. Immunol. *26*, 875-879.

Lammert,E., Stevanovic,S., Brunner,J., Rammensee,H.G., and Schild,H. (1997b). Protein disulfide isomerase is the dominant acceptor for peptides translocated into the endoplasmic reticulum. Eur. J. Immunol. *27*, 1685-1690.

Lauvau,G., Kakimi,K., Niedermann,G., Ostankovitch,M., Yotnda,P., Firat,H., Chisari,F.V., and van Endert,P.M. (1999). Human transporters associated with antigen processing (TAPs) select epitope precursor peptides for processing in the endoplasmic reticulum and presentation to T cells. J. Exp. Med. *190*, 1227-1240.

Lefrancois,L., Olson,S., and Masopust,D. (1999). A critical role for CD40-CD40 ligand interactions in amplification of the mucosal CD8 T cell response. J. Exp. Med. *190*, 1275-1284.

Lien,E., Means,T.K., Heine,H., Yoshimura,A., Kusumoto,S., Fukase,K., Fenton,M.J., Oikawa,M., Qureshi,N., Monks,B., Finberg,R.W., Ingalls,R.R., and Golenbock,D.T. (2000). Toll-like receptor 4 imparts ligand-specific recognition of bacterial lipopolysaccharide. J. Clin. Invest *105*, 497-504.

Linderoth,N.A., Popowicz,A., and Sastry,S. (2000). Identification of the peptide-binding site in the heat shock chaperone/tumor rejection antigen gp96 (Grp94). J. Biol. Chem. *275*, 5472-5477.

Lindquist,J.A., Jensen,O.N., Mann,M., and Hammerling,G.J. (1998). ER-60, a chaperone with thiol-dependent reductase activity involved in MHC class I assembly. EMBO J. *17*, 2186-2195.

Lindquist,S. (1986). The heat-shock response. Annu. Rev. Biochem. *55*, 1151-1191.

Lu,Z., Yuan,L., Zhou,X., Sotomayor,E., Levitsky,H.I., and Pardoll,D.M. (2000). CD40-independent pathways of T cell help for priming of CD8(+) cytotoxic T lymphocytes. J. Exp. Med. *191*, 541-550.

Lucchiari-Hartz,M., van Endert,P.M., Lauvau,G., Maier,R., Meyerhans,A., Mann,D., Eichmann,K., and Niedermann,G. (2000). Cytotoxic T lymphocyte epitopes of HIV-1 Nef: Generation of multiple definitive major histocompatibility complex class I ligands by proteasomes. J. Exp. Med. *191*, 239-252.

Madden,D.R. (1995). The three-dimensional structure of peptide-MHC complexes. Annu. Rev. Immunol. *13*, 587-622.

Madden,D.R., Gorga,J.C., Strominger,J.L., and Wiley,D.C. (1991). The structure of HLA-B27 reveals nonamer self-peptides bound in an extended conformation. Nature *353*, 321-325.

Madden,D.R., Gorga,J.C., Strominger,J.L., and Wiley,D.C. (1992). The three-dimensional structure of HLA-B27 at 2.1 A resolution suggests a general mechanism for tight peptide binding to MHC. Cell *70*, 1035-1048.

Marzo,A.L., Lake,R.A., Lo,D., Sherman,L., McWilliam,A., Nelson,D., Robinson,B.W., and Scott,B. (1999). Tumor antigens are constitutively presented in the draining lymph nodes. J. Immunol. *162*, 5838-5845.

Mayer,M.P. and Bukau,B. (1999). Molecular chaperones: the busy life of Hsp90. Curr. Biol. *9*, R322-R325.

Medzhitov,R. and Janeway,C. (2000). Innate immunity. N. Engl. J. Med. *343*, 338-344.

Menoret,A., Chandawarkar,R.Y., and Srivastava,P.K. (2000). Natural autoantibodies against heat-shock proteins hsp70 and gp96: implications for immunotherapy using heat-shock proteins. Immunology *101*, 364-370.

Michalek,M.T., Grant,E.P., Gramm,C., Goldberg,A.L., and Rock,K.L. (1993). A role for the ubiquitin-dependent proteolytic pathway in MHC class I-restricted antigen presentation. Nature *363*, 552-554.

Michalek,M.T., Grant,E.P., and Rock,K.L. (1996). Chemical denaturation and modification of ovalbumin alters its dependence on ubiquitin conjugation for class I antigen presentation. J. Immunol. *157*, 617-624.

Minota,S., Cameron,B., Welch,W.J., and Winfield,J.B. (1988). Autoantibodies to the constitutive 73-kD member of the hsp70 family of heat shock proteins in systemic lupus erythematosus. J. Exp. Med. *168*, 1475-1480.

Moll,H., Fuchs,H., Blank,C., and Rollinghoff,M. (1993). Langerhans cells transport Leishmania major from the infected skin to the draining lymph node for presentation to antigen-specific T cells. Eur. J. Immunol. *23*, 1595-1601.

Moore,M.W., Carbone,F.R., and Bevan,M.J. (1988). Introduction of soluble protein into the class I pathway of antigen processing and presentation. Cell *54*, 777-785.

Moroi,Y., Mayhew,M., Trcka,J., Hoe,M.H., Takechi,Y., Hartl,F.U., Rothman,J.E., and Houghton,A.N. (2000). Induction of cellular immunity by immunization with novel hybrid peptides complexed to heat shock protein 70. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A *97*, 3485-3490.

Morshauser,R.C., Wang,H., Flynn,G.C., and Zuiderweg,E.R. (1995). The peptide-binding domain of the chaperone protein Hsc70 has an unusual secondary structure topology. Biochemistry *34*, 6261-6266.

Nair,S., Wearsch,P.A., Mitchell,D.A., Wassenberg,J.J., Gilboa,E., and Nicchitta,C.V. (1999). Calreticulin displays in vivo peptide-binding activity and can elicit CTL responses against bound peptides. J. Immunol. *162*, 6426-6432.

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

Neefjes,J.J., Momburg,F., and Hammerling,G.J. (1993). Selective and ATP-dependent translocation of peptides by the MHC-encoded transporter. Science *261*, 769-771.

Nelson,C.A., Petzold,S.J., and Unanue,E.R. (1994). Peptides determine the lifespan of MHC class II molecules in the antigen-presenting cell. Nature *371*, 250-252.

Nestle,F.O., Alijagic,S., Gilliet,M., Sun,Y., Grabbe,S., Dummer,R., Burg,G., and Schadendorf,D. (1998). Vaccination of melanoma patients with peptide- or tumor lysate-pulsed dendritic cells. Nat. Med. *4*, 328-332.

Nicchitta,C.V. (1998). Biochemical, cell biological and immunological issues surrounding the endoplasmic reticulum chaperone GRP94/gp96. Curr. Opin. Immunol. *10*, 103-109.

Nieland,T.J., Tan,M.C., Monne-van,M.M., Koning,F., Kruisbeek,A.M., and van Bleek,G.M. (1996). Isolation of an immunodominant viral peptide that is endogenously bound to the stress protein GP96/GRP94. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *93*, 6135-6139.

Nijman,H.W., Kleijmeer,M.J., Ossevoort,M.A., Oorschot,V.M., Vierboom,M.P., van de,K.M., Kenemans,P., Kast,W.M., Geuze,H.J., and Melief,C.J. (1995). Antigen capture and major histocompatibility class II compartments of freshly isolated and cultured human blood dendritic cells. J. Exp. Med. *182*, 163-174.

Norbury,C.C., Hewlett,L.J., Prescott,A.R., Shastri,N., and Watts,C. (1995). Class I MHC presentation of exogenous soluble antigen via macropinocytosis in bone marrow macrophages. Immunity. *3*, 783-791.

Ohashi,K., Burkart,V., Floh, and Kolb,H. (2000). Cutting Edge: Heat Shock Protein 60 Is a Putative Endogenous Ligand of the Toll-Like Receptor-4 Complex. J. Immunol. 2000. Jan. 15. ;164. (2.):558. -561. *164*, 558-561.

Oleksiewicz,M.B., Kristensen,B., Ladekjaer-Mikkelsen,A.S., and Nielsen,J. (2002). Development of a rapid in vitro protein refolding assay which discriminates between peptide-bound and peptide-free forms of recombinant porcine major histocompatibility class I complex (SLA-I). Vet. Immunol. Immunopathol. *86*, 55-77.

Ortmann,B., Copeman,J., Lehner,P.J., Sadasivan,B., Herberg,J.A., Grandea,A.G., Riddell,S.R., Tampe,R., Spies,T., Trowsdale,J., and Cresswell,P. (1997). A critical role for tapasin in the assembly and function of multimeric MHC class I-TAP complexes. Science *277*, 1306-1309.

Panaretou,B., Prodromou,C., Roe,S.M., O'Brien,R., Ladbury,J.E., Piper,P.W., and Pearl,L.H. (1998). ATP binding and hydrolysis are essential to the function of the Hsp90 molecular chaperone in vivo. EMBO J. *17*, 4829-4836.

Pearl,L.H. and Prodromou,C. (2000). Structure and in vivo function of Hsp90. Curr. Opin. Struct. Biol. *10*, 46-51.

Peng,P., Menoret,A., and Srivastava,P.K. (1997). Purification of immunogenic heat shock protein 70-peptide complexes by ADP-affinity chromatography. J. Immunol. Methods *204*, 13-21.

Peters,P.J., Neefjes,J.J., Oorschot,V., Ploegh,H.L., and Geuze,H.J. (1991). Segregation of MHC class II molecules from MHC class I molecules in the Golgi complex for transport to lysosomal compartments. Nature *349*, 669-676.

Powis,S.J., Young,L.L., Joly,E., Barker,P.J., Richardson,L., Brandt,R.P., Melief,C.J., Howard,J.C., and Butcher,G.W. (1996). The rat cim effect: TAP allele-dependent changes in a class I MHC anchor motif and evidence against C-terminal trimming of peptides in the ER. Immunity. *4*, 159-165.

Prodromou,C., Roe,S.M., O'Brien,R., Ladbury,J.E., Piper,P.W., and Pearl,L.H. (1997). Identification and structural characterization of the ATP/ADP-binding site in the Hsp90 molecular chaperone. Cell *90*, 65-75.

Prusiner,S.B. (1998). Prions. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A *95*, 13363-13383.

Rammensee,H.G., Bachmann,J., and Stevanovic,S. (1997). MHC ligands and peptide motifs. Landes Bioscience Publ., Georgetown, Texas).

Rammensee,H.G., Falk,K., and Rotzschke,O. (1993). Peptides naturally presented by MHC class I molecules. Annu. Rev. Immunol. *11*, 213-244.

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

Reid,S.D., Penna,G., and Adorini,L. (2000). The control of T cell responses by dendritic cell subsets. Curr. Opin. Immunol. *12*, 114-121.

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

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

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

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

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

Rotem-Yehudar,R., Groettrup,M., Soza,A., Kloetzel,P.M., and Ehrlich,R. (1996). LMP-associated proteolytic activities and TAP-dependent peptide transport for class 1 MHC molecules are suppressed in cell lines transformed by the highly oncogenic adenovirus 12. J. Exp. Med. *183*, 499-514.

Rotzschke,O. and Falk,K. (1994). Origin, structure and motifs of naturally processed MHC class II ligands. Curr. Opin. Immunol. *6*, 45-51.

Ruedl,C., Kopf,M., and Bachmann,M.F. (1999). CD8(+) T cells mediate CD40-independent maturation of dendritic cells in vivo. J. Exp. Med. *189*, 1875-1884.

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

Sallusto,F., Cella,M., Danieli,C., and Lanzavecchia,A. (1995). Dendritic cells use macropinocytosis and the mannose receptor to concentrate macromolecules in the major histocompatibility complex class II compartment: downregulation by cytokines and bacterial products. J. Exp. Med. *182*, 389-400.

Sallusto,F. and Lanzavecchia,A. (1994). Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor alpha. J. Exp. Med. *179*, 1109-1118.

Santambrogio,L., Sato,A.K., Carven,G.J., Belyanskaya,S.L., Strominger,J.L., and Stern,L.J. (1999a). Extracellular antigen processing and presentation by immature dendritic cells. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A *96*, 15056-15061.

Santambrogio,L., Sato,A.K., Fischer,F.R., Dorf,M.E., and Stern,L.J. (1999b). Abundant empty class II MHC molecules on the surface of immature dendritic cells. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A *96*, 15050-15055.

Sastry,S. and Linderoth,N. (1999). Molecular mechanisms of peptide loading by the tumor rejection antigen/heat shock chaperone gp96 (GRP94). J. Biol. Chem. *274*, 12023-12035.

Sato,S., Ono,N., Steeber,D.A., Pisetsky,D.S., and Tedder,T.F. (1996). CD19 regulates B lymphocyte signaling thresholds critical for the development of B-1 lineage cells and autoimmunity. J. Immunol. *157*, 4371-4378.

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

Scheibel,T., Weikl,T., and Buchner,J. (1998). Two chaperone sites in Hsp90 differing in substrate specificity and ATP dependence. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A *95*, 1495-1499.

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

Schild,H. and Rammensee,H.G. (2000b). Perfect use of imperfection. Nature *404*, 709-710.

Schmid,D., Baici,A., Gehring,H., and Christen,P. (1994). Kinetics of molecular chaperone action. Science *263*, 971-973.

Schubert,U., Anton,L.C., Gibbs,J., Norbury,C.C., Yewdell,J.W., and Bennink,J.R. (2000). Rapid degradation of a large fraction of newly synthesized proteins by proteasomes. Nature *404*, 770-774.

Seemuller,E., Lupas,A., Stock,D., Lowe,J., Huber,R., and Baumeister,W. (1995). Proteasome from Thermoplasma acidophilum: a threonine protease. Science *268*, 579-582.

Sibille,C., Gould,K.G., Willard-Gallo,K., Thomson,S., Rivett,A.J., Powis,S., Butcher,G.W., and De Baetselier,P. (1995). LMP2+ proteasomes are required for the presentation of specific antigens to cytotoxic T lymphocytes. Curr. Biol. *5*, 923-930.

Sigal,L.J., Crotty,S., Andino,R., and Rock,K.L. (1999). Cytotoxic T-cell immunity to virus-infected non-haematopoietic cells requires presentation of exogenous antigen. Nature *398*, 77-80.

Singer,D.S., Ehrlich,R., Satz,L., Frels,W., Bluestone,J., Hodes,R., and Rudikoff,S. (1987). Structure and expression of class I MHC genes in the miniature swine. Vet. Immunol. Immunopathol. *17*, 211-221.

Singer,G.G. and Abbas,A.K. (1994). The fas antigen is involved in peripheral but not thymic deletion of T lymphocytes in T cell receptor transgenic mice. Immunity. *1*, 365-371.

Singh-Jasuja,H., Hilf,N., Arnold-Schild,D., and Schild,H. (2001). The role of heat shock proteins and their receptors in the activation of the immune system. Biol. Chem. *382*, 629-636.

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

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

Snell,G.D. (1948). Methods for the study of histocompatibility genes. J. Genet. *49*, 87-108.

Soltys,B.J. and Gupta,R.S. (1997). Cell surface localization of the 60 kDa heat shock chaperonin protein (hsp60) in mammalian cells. Cell Biol. Int. *21*, 315-320.

Spee,P. and Neefjes,J. (1997). TAP-translocated peptides specifically bind proteins in the endoplasmic reticulum, including gp96, protein disulfide isomerase and calreticulin. Eur. J. Immunol. *27*, 2441-2449.

Speiser,D.E., Zurcher,T., Ramseier,H., Hengartner,H., Staeheli,P., Haller,O., and Zinkernagel,R.M. (1990). Nuclear myxovirus-resistance protein Mx is a minor histocompatibility antigen. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A *87*, 2021-2025.

Srivastava,P.K., DeLeo,A.B., and Old,L.J. (1986). Tumor rejection antigens of chemically induced sarcomas of inbred mice. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *83*, 3407-3411.

Srivastava,P.K. and Maki,R.G. (1991). Stress-induced proteins in immune response to cancer. Curr. Top. Microbiol. Immunol. *167*, 109-123.

Srivastava,P.K., Menoret,A., Basu,S., Binder,R.J., and McQuade,K.L. (1998). Heat shock proteins come of age: primitive functions acquire new roles in an adaptive world. Immunity. *8*, 657-665.

Srivastava,P.K., Udono,H., Blachere,N.E., and Li,Z. (1994). Heat shock proteins transfer peptides during antigen processing and CTL priming. Immunogenetics *39*, 93-98.

Steinbrink,K., Wolfl,M., Jonuleit,H., Knop,J., and Enk,A.H. (1997). Induction of tolerance by IL-10-treated dendritic cells. J. Immunol. *159*, 4772-4780.

Steinman,R.M. (2000). DC-SIGN: a guide to some mysteries of dendritic cells. Cell *100*, 491-494.

Stoltze,L., Schirle,M., Schwarz,G., Schroter,C., Thompson,M.W., Hersh,L.B., Kalbacher,H., Stevanovic,S., Rammensee,H.G., and Schild,H. (2000). Two new proteases in the MHC class I processing pathway. Nat. Immunol. *1*, 413-418.

Sullivan,J.A., Oettinger,H.F., Sachs,D.H., and Edge,A.S. (1997). Analysis of polymorphism in porcine MHC class I genes: alterations in signals recognized by human cytotoxic lymphocytes. J. Immunol. *159*, 2318-2326.

Tamura,Y., Peng,P., Liu,K., Daou,M., and Srivastava,P.K. (1997). Immunotherapy of tumors with autologous tumor-derived heat shock protein preparations [published erratum appears in Science 1999 Feb 19;283(5405):preceding 1119]. Science *278*, 117-120.

Thomas,C.A., Li,Y., Kodama,T., Suzuki,H., Silverstein,S.C., and El Khoury,J. (2000). Protection from lethal gram-positive infection by macrophage scavenger receptor-dependent phagocytosis. J. Exp. Med. *191*, 147-156.

Tonegawa,S. (1983). Somatic generation of antibody diversity. Nature *302*, 575-581.

Townsend,A., Bastin,J., Gould,K., Brownlee,G., Andrew,M., Coupar,B., Boyle,D., Chan,S., and Smith,G. (1988). Defective presentation to class I-restricted cytotoxic T lymphocytes in vaccinia-infected cells is overcome by enhanced degradation of antigen. J. Exp. Med. *168*, 1211-1224.

Townsend,A.R., Gotch,F.M., and Davey,J. (1985). Cytotoxic T cells recognize fragments of the influenza nucleoprotein. Cell *42*, 457-467.

Turley,S.J., Inaba,K., Garrett,W.S., Ebersold,M., Unternaehrer,J., Steinman,R.M., and Mellman,I. (2000). Transport of peptide-MHC class II complexes in developing dendritic cells. Science *288*, 522-527.

Udono,H., Levey,D.L., and Srivastava,P.K. (1994). Cellular requirements for tumor-specific immunity elicited by heat shock proteins: tumor rejection antigen gp96 primes CD8+ T cells in vivo. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A *91*, 3077-3081.

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

van Endert,P.M., Riganelli,D., Greco,G., Fleischhauer,K., Sidney,J., Sette,A., and Bach,J.F. (1995). The peptide-binding motif for the human transporter associated with antigen processing. J. Exp. Med. *182*, 1883-1895.

Varshavsky,A. (1992). The N-end rule. Cell *69*, 725-735.

Viriyakosol,S., Kirkland,T., Soldau,K., and Tobias,P. (2000). MD-2 binds to bacterial lipopolysaccharide. J. Endotoxin. Res. *6*, 489-491.

von Andrian,U.H. and Mackay,C.R. (2000). T-cell function and migration. Two sides of the same coin. N. Engl. J. Med. *343*, 1020-1034.

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

Wang,X.Y., Kazim,L., Repasky,E.A., and Subjeck,J.R. (2001). Characterization of heat shock protein 110 and glucose-regulated protein 170 as cancer vaccines and the effect of fever-range hyperthermia on vaccine activity. J. Immunol. *166*, 490-497.

Wassenberg,J.J., Reed,R.C., and Nicchitta,C.V. (2000). Ligand interactions in the adenosine nucleotide-binding domain of the Hsp90 chaperone, GRP94. II. Ligand-mediated activation of GRP94 molecular chaperone and peptide binding activity. J. Biol. Chem. *275*, 22806-22814.

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

Watts,T.H., Brian,A.A., Kappler,J.W., Marrack,P., and McConnell,H.M. (1984). Antigen presentation by supported planar membranes containing affinity-purified I-Ad. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A *81*, 7564-7568.

Wearsch,P.A. and Nicchitta,C.V. (1997). Interaction of endoplasmic reticulum chaperone GRP94 with peptide substrates is adenine nucleotide-independent. J. Biol. Chem. *272*, 5152-5156.

Williams,D.B. and Watts,T.H. (1995). Molecular chaperones in antigen presentation. Curr. Opin. Immunol. *7*, 77-84.

Winzler,C., Rovere,P., Rescigno,M., Granucci,F., Penna,G., Adorini,L., Zimmermann,V.S., Davoust,J., and Ricciardi-Castagnoli,P. (1997). Maturation stages of mouse dendritic cells in growth factor-dependent long-term cultures. J. Exp. Med. *185*, 317-328.

Wubbolts,R., Fernandez-Borja,M., Oomen,L., Verwoerd,D., Janssen,H., Calafat,J., Tulp,A., Dusseljee,S., and Neefjes,J. (1996). Direct vesicular transport of MHC class II molecules from lysosomal structures to the cell surface. J. Cell Biol. *135*, 611-622.

Xu,Q., Schett,G., Seitz,C.S., Hu,Y., Gupta,R.S., and Wick,G. (1994). Surface staining and cytotoxic activity of heat-shock protein 60 antibody in stressed aortic endothelial cells. Circ. Res. *75*, 1078-1085.

Xu,X.C., Howard,T., and Mohanakumar,T. (2001). Tissue-specific peptides influence human T cell repertoire to porcine xenoantigens. Transplantation *72*, 1205-1212.

Xu,X.C., Naziruddin,B., Sasaki,H., Smith,D.M., and Mohanakumar,T. (1999). Allele-specific and peptide-dependent recognition of swine leukocyte antigen class I by human cytotoxic T-cell clones. Transplantation *68*, 473-479.

Yamazaki,K., Nguyen,T., and Podack,E.R. (1999). Cutting edge: tumor secreted heat shock-fusion protein elicits CD8 cells for rejection. J. Immunol. *163*, 5178-5182.

Zahn,R., Liu,A., Luhrs,T., Riek,R., von Schroetter,C., Lopez,G.F., Billeter,M., Calzolai,L., Wider,G., and Wuthrich,K. (2000). NMR solution structure of the human prion protein. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A *97*, 145-150.

Zimmerman,C., Brduscha-Riem,K., Blaser,C., Zinkernagel,R.M., and Pircher,H. (1996). Visualization, characterization, and turnover of CD8+ memory T cells in virus-infected hosts. J. Exp. Med. *183*, 1367-1375.

Zinkernagel,R.M. (2001). Grundlagen der Immunologie. In Medizinische Mikrobiologie, Kayser F, Bienz KA, Eckert J, and R.M.Zinkernagel, eds. Thieme), pp. 47-153.

Zinkernagel,R.M. and Doherty,P.C. (1974). Restriction of in vitro T cell-mediated cytotoxicity in lymphocytic choriomeningitis within a syngeneic or semiallogeneic system. Nature *248*, 701-702.

Zitvogel,L., Regnault,A., Lozier,A., Wolfers,J., Flament,C., Tenza,D., Ricciardi-Castagnoli,P., Raposo,G., and Amigorena,S. (1998). Eradication of established murine tumors using a novel cell-free vaccine: dendritic cell-derived exosomes. Nat. Med. *4*, 594-600.

Zugel,U. and Kaufmann,S.H. (1999). Role of heat shock proteins in protection from and pathogenesis of infectious diseases. Clin. Microbiol. Rev. *12*, 19-39.

6.2 Einbuchstaben-Code der Aminosäuren

A:	Alanin	(hydrophob, ungeladen)
C:	Cystein	(polar, ungeladen)
D:	Asparaginsäure	(polar, negativ geladen)
E:	Glutaminsäure	(polar, negativ geladen)
F:	Phenylalanin	(hydrophob, ungeladen, aromatisch)
G:	Glycin	(unpolar, ungeladen)
H:	Histidin	(polar, positiv geladen, heterozyklisch)
I:	Isoleucin	(hydrophob, ungeladen)
K:	Lysin	(polar, positiv geladen)
L:	Leucin	(hydrophob, ungeladen)
M:	Methionin	(hydrophob, ungeladen)
N:	Asparagin	(polar, ungeladen)
P:	Prolin	(hydrophob, ungeladen, heterozyklisch)
Q:	Glutamin	(polar, ungeladen)
R:	Arginin	(polar, positiv geladen)
S:	Serin	(polar, ungeladen)
T:	Threonin	(polar, ungeladen)
V:	Valin	(hydrophob, ungeladen)
W:	Tryptophan	(hydrophob, aromatisch, heterozyklisch)
Y:	Tyrosin	(polar, ungeladen, aromatisch)

6.3 Danksagung

Der an dieser Stelle ausgesprochene Dank gilt in erster Linie meinem Doktorvater, Prof. Hans-Georg Rammensee. Durch die Aufnahme in sein Labor und ins Graduiertenkolleg „Zellbiologie in der Medizin“ hat er mir die Möglichkeit gegeben, Wissenschaft auf hohem Niveau zu erleben und zu erlernen. Sein immer reges Interesse am Fortgang meiner Arbeit waren Motivation und Herausforderung zugleich.

Dr. Hans-Jörg Schild schulde ich besonderen Dank für die Aufnahme in seine Arbeitsgruppe und für das Thema meiner Arbeit. Seiner Frau Danièle Arnold-Schild bin ich dankbar für die geduldige Einarbeitung in den ersten Wochen.

Die für mich wichtigste Hilfe in Form von wissenschaftlichem Rat und freundschaftlicher Unterstützung kam von Harpreet Singh-Jasuja (‚el hombre’). Unzählige Hilfestellungen, Diskussionen, viele Spät-Abend Labor-Pizzen, eine Kongreß-Reise zu den Cold Spring Harbor Laboratories und nicht zuletzt seine Freundschaft auch außerhalb des Labors waren ausschlaggebend dafür, daß mich so manches Mal Mut und Spaß an dieser Arbeit nicht verlassen haben. Für diese besondere Betreuung danke ich ihm herzlich.

Der ‚french connection’ unseres Labors, Cécile Gouttefangeas, Arnaud Mauris und ganz besonders Steve Pascolo danke ich für die Aufrechterhaltung des multikulturellen Flairs. Steve sei außerdem gedankt für unverzichtbare wissenschaftliche Hilfe und viel gesunde Kritik an meiner Arbeit („ils sont où tes controls?“).

Vielen anderen Mitarbeitern des Labors schulde ich weiterhin Dank: Norbert Hilf für wichtige Ratschläge und die gute Stimmung im kleinen Labor, Stefan Stevanovic für zahlreiche Peptide und offene Ohren für Schweine-MHCs, Toni Weinschenk für die Massenspektrometrie, Matthias Hoffmann für Hilfe bei der Mauszucht, Sylvia Bayertz für Starthilfe im Labor. Lars Stolze sei gedankt für die Organisation vieler ‚social-events’, für Kletterkurse und Bergfaszination. Margret Müller sei herzlich gedankt für ihre Heiterkeit und Freundschaft.

Zuletzt gilt mein Dank den Menschen außerhalb des Labors, die mir den Weg dorthin geebnet haben: meinen Eltern, die mir nicht nur ein Studium nach freien Wünschen ermöglicht haben, sondern mir auch mit viel menschlichem und beruflichem Rat und vor allem Rückhalt immer zur Seite stehen; meiner Schwester Kathrin, die mir als ältere

Schwester viele Wege gebahnt und mich vor mancher Tücke der Laborarbeit bewahrt hat; und meiner Freundin Ute, die meinen Nachtarbeitszeiten im Labor ein Ende setzte.

6.4 Lebenslauf / Publikationen

25.03. 1975	Geburt in München als Sohn von Prof. Dr. Hans Scherer, Hals-Nasen-Ohren Arzt, Dr. Amaryll Scherer, Kinderärztin und Bruder von Dr. Kathrin Scherer
1986	Umzug der Familie nach Berlin

Besuchte Einrichtungen

1986 - 94	Besuch des Canisius-Kolleg zu Berlin, Gymnasium.
1991 / 92	Besuch der Northfield Mount Hermon School, Massachussets, USA im Rahmen des ASSIST-Programms, Köln
1994 / 95	17-monatiger Zivildienst in Avignon, Frankreich im Rahmen des Projektes „Freiwillige Soziale Dienste Europa“ der Initiative Christen für Europa e.V.
1995 - 97	Studium der Humanmedizin an der Freien Universität Berlin. Physikum August 1997
1997 - 98	Wechsel an die Humboldt Universität zu Berlin. 1. Staatsexamen August 1998
08 / 1998	6-wöchiges Praktikum an der International Agency for Research on Cancer (IARC), Lyon, Unit of Molecular Pathology (Prof. Paul Kleihues und Dr. Hiroko Ohgaki).
1998 - 2001	Medizinstudium an der Eberhard-Karls Universität Tübingen. 2. Staatsexamen August 2001
seit 04 / 99	Promotion am Institut für Zellbiologie, Abteilung Immunologie als Doktorand von Prof. Hans Georg Rammensee (AG Hans-Jörg Schild).
1999 / 2000	Stipendiat und Mitglied des Graduiertenkollegs „Zellbiologie in der Medizin“, Tübingen
2001 - 2002	Wechsel an die Humboldt Universität zu Berlin zum Praktischen Jahr

	1. Tertial (Chirurgie): Hôpital Régional de Martigny, Martigny (Schweiz) 2. Tertial (Innere Medizin): Rheumatologie, Charité Mitte, Berlin 3. Tertial (Pädiatrie): Kinderklinik Lindenhof, Lichtenberg, Berlin
10 / 2002	Abschluß des Medizinstudiums mit dem 3. Staatsexamen
ab 02 / 2003	Arzt im Praktikum in der Medizinischen Klinik mit Schwerpunkt Rheumatologie und klinische Immunologie, Universitätsklinikum Charité der Humboldt Universität (Prof. Gerd-Rüdiger Burmester)

Publikationen

Singh-Jasuja H, Scherer HU, Hilf N, Arnold-Schild D, Rammensee HG, Toes RE, Schild H.
The heat shock protein gp96 induces maturation of dendritic cells and down-regulation of its receptor.
Eur J Immunol. 2000 Aug;30(8):2211-5.

Singh-Jasuja H., Hilf N., Scherer H.U., Arnold-Schild D., Rammensee H.G., Toes R.E.M., Schild H.
The heat shock protein gp96: a receptor-targeted cross-priming carrier and activator of dendritic cells.
Cell Stress Chaperones. 2000 Nov;5(5):462-70. Review.

Scherer HU, Weinschenk T, Stevanovic S, Ehrlich R, Schild H, Rammensee HG.
Peptide motif and natural ligands of the miniature swine lymphocyte antigen PD1.
Manuskript in Vorbereitung

Poster

Singh-Jasuja H, Scherer HU, Hilf N, Arnold-Schild D, Rammensee HG, Toes RE, Schild H.
Cross-Presentation of gp96-associated antigens on MHC class I molecules requires receptor-mediated endocytosis.

im Rahmen des Besuchs des Symposiums:

“Molecular Chaperones and the Heat Shock Response”, Cold Spring Harbor Laboratories, NY, 3.-7. Mai 2000