

Aus der Universitätsklinik für Kinder- und Jugendmedizin Tübingen
Abteilung Kinderheilkunde I mit Poliklinik
(Schwerpunkt: Allgemeine Pädiatrie, Hämatologie und Onkologie)
Ärztlicher Direktor: Professor Dr. R. Handgretinger

**Einfluss von Hsp70 auf die Proliferation
antigenspezifischer humaner CD4⁺ T-Zellen
nach Peptidstimulation**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der Medizinischen Fakultät
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
Simon Felix Lühl
aus
Freiburg im Breisgau

2010

Dekan: Professor Dr. I. B. Autenrieth

1. Berichterstatter: Professor Dr. R. Handgretinger

2. Berichterstatter: Professor Dr. I. Kötter

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	III
Abkürzungsverzeichnis	VI
Abbildungsverzeichnis.....	IX
Tabellenverzeichnis.....	X
1 Einleitung	1
1.1 Das humane Immunsystem	1
1.2 Antigenpräsentierende Zellen und Antigenpräsentation	3
1.3 Antigenerkennung durch T-Zellen.....	4
1.4 Präsentation antigener Peptide durch MHC-Moleküle	5
1.5 Hitzeschockproteine	6
1.6 Die Rolle der Hitzeschockproteine in der angeborenen und adaptiven Immunität.....	7
1.7 Autoimmunerkrankungen.....	10
1.8 Diabetes mellitus Typ 1.....	11
1.9 Ausgangspunkt und Ziel der Arbeit.....	12
2. Materialien	13
2.1 Geräte und Hilfsmittel	13
2.2 Software.....	14
2.3 Chemikalien, Reagenzien, Puffer und Kits.....	14
2.4 Antikörper für die Durchflusszytometrie	17
2.5 Verbrauchsmaterialien	18
2.6 Peptide, Proteine und Proteinstandards	19
2.7 Zellkulturmedium und Zusätze.....	20
2.7.1 Medium	20
2.7.2 Zusätze	20
2.8 T-Zellen.....	21
3. Methoden.....	22

3.1	Auswahl der humanen Donoren	22
3.2	Isolierung mononukleärer Zellen mittels Dichtegradientenzentrifugation aus peripherem Blut.....	22
3.3	Bestimmung der Zellzahl und Zellvitalität.....	23
3.4	Kultur humaner T-Zellen für T-Zellstimulationsexperimente	23
3.5	Gewinnung von gepooltem humanem Serum (PHS) für die T-Zellkultur	24
3.6	T-Zell-Isolierung.....	25
3.6.1	Auswahl der MACS-Säule	25
3.6.2	Isolierung von CD4 ⁺ T-Zellen.....	26
3.6.3	Isolierung von CD4 ⁺ CD25 ⁺ und CD4 ⁺ CD25 ^{+high} T-Zellen (regulatorische T-Zellen, Tregs)	26
3.7	Tiefkühlung von Zellen und Überständen	27
3.7.1	Tiefkühlung von Zellen.....	27
3.7.2	Auftauen von Zellen	27
3.7.3	Tiefkühlung von Überständen	28
3.8	CFSE-Färbung.....	28
3.9	T-Zellproliferationsexperimente	29
3.10	Herstellung der Peptid:Hsp70-Komplexe	29
3.11	HLA-DR-Tetramere.....	30
3.12	Färbung von T-Zellen mit Antikörpern und HLA-DR-Tetrameren.....	31
3.12.1	Färbung mit Antikörpern	31
3.12.2	Färbung mit HLA-DR-Tetrameren und Sekundärantikörpern.....	33
3.13	Durchflusszytometrie/FACS-Analyse.....	33
3.14	Cytokine Secretion Assay (CSA)	35
3.15	Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)	37
4.	Ergebnisse	40
4.1	Nachweis antigenspezifischer CD4 ⁺ T-Zellen mittels HLA-DR-Tetramerfärbung.....	40
4.2	Proliferationsmessungen antigenspezifischer CD4 ⁺ T-Zellen mittels Verdünnung des Farbstoffes CFSE	43
4.3	Zellzahlverhältnis und Peptidkonzentration.....	45

4.4	Peptidreaktivität verschiedener Donoren	48
4.5	Einfluss der regulatorischen T-Zellen auf die Zahl antigenspezifischer CD4 ⁺ T-Zellen	50
4.6	Einfluss von Hsp70 auf die Aktivierung antigenspezifischer CD4 ⁺ T-Zellen.....	52
4.7	Untersuchung des Zytokinmusters stimulierter T-Zellen unter dem Einfluss von Hsp70	67
4.7.1	Messung von IFN- γ im Cytokine Secretion Assay (CSA).....	68
4.7.2	Messung von IL-5 und IFN- γ im Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)	71
5.	Diskussion.....	74
5.1	Auswahl der antigenen Peptide	74
5.2	Einfluss der CD4 ⁺ CD25 ⁺ regulatorischen T-Zellen auf die Anzahl autoreaktiver antigenspezifischer CD4 ⁺ T-Zellen.....	75
5.3	Einfluss von Hsp70 auf die Aktivierung antigenspezifischer CD4 ⁺ T-Zellen.....	78
5.3.1	Proliferationsveränderung durch Stimulation mit Peptid:Hsp70-Komplex bei Aktivierungsversuchen mit T-Zellen	81
5.4	Einfluss von Hsp70 auf das Zytokinmuster im Zusammenhang mit Aktivierungsversuchen antigenspezifischer CD4 ⁺ T-Zellen.....	84
5.4.1	Veränderungen des IFN- γ Zytokinmusters durch Stimulation mit Peptid:Hsp70-Komplex im Cytokine Secretion Assay (CSA).....	85
5.4.2	Veränderungen des IFN- γ und IL-5 Zytokinmusters durch Stimulation mit Peptid:Hsp70-Komplex im Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)	86
5.5	Einordnung im Kontext aktueller Literatur und Ausblick.....	88
6.	Zusammenfassung	91
7.	Literaturverzeichnis.....	92

Abkürzungsverzeichnis

° C	Grad Celsius
Abb.	Abbildung
APC	Allophycocyanin
APZ	antigenpräsentierende Zelle
BSA	Rinderserumalbumin (bovine serum albumine)
CBA	Cytometric bead array
CD	cluster of differentiation
CFSE	5(6)-Carboxyfluorescein-diacetat-N-succinimidylester
CSA	Cytokine Secretion Assay
DMSO	Dimethylsulfoxid
EAE	experimentelle autoimmune Encephalomyelitis
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
FACS	fluorescence activated cell scanner
FBS	fetal bovine serum
FCS	fetal calf serum (fötales Kälberserum)
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FL	Fluoreszenz
FSC	Forwardscatter (Vorwärtsstreulicht)
GAD	Glutamic Acid Decarboxylase (Diabetes-assoziiertes Autoantigen)
h	Stunde
HA	Hämagglutinin (Influenza-Protein)
HBS	Hanks buffered saline
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonsäure
HLA	human leukocyte antigen (humanes

	Leukozytenantigen)
HSA	Humanes Serumalbumin
HSP	Hitzeschockprotein
HSP70	70 kDa HSP-Familie
Hsp70	stress-induzierbares, zytosolisches HSP70-Molekül = Hsp72
IFN- γ	Interferon-gamma
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
kDa	Kilodalton
l	Liter
μ	Mikro-
m	Milli-
M	molar
m	Meter
MACS	magnetic cell sorting
mAk	monoklonaler Antikörper
MBP	myelin basic protein
MHC	major histocompatibility complex (Haupthistokompatibilitätskomplex)
min	Minute
MOG	myelin oligodendrocyte glycoprotein
MS	Multiple Sklerose
NaCl	Natriumchlorid
NF- κ B	nuclear factor-kappa B
NK-Zelle	natürliche Killerzelle
NO	Stickstoffmonoxid
NY-ESO1	Tumorantigen
PBMC	peripheral blood mononuclear cell (mononukleäre Zelle des peripheren Blutes)
PBS	phosphate-buffered saline (Phosphat-

	gepufferte Saline)
PE	Phycoerythrin
PerCP	Peridin-Chlorophyllprotein
PHA	Phytohämagglutinin
PHS	pooled human serum (gepooltes humanes Serum)
PPI	Präproinsulin
RANTES	regulated upon activation, normal T cells expressed and secreted
rpm	rotations per minute
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
s.	siehe
SA	Streptavidin
SE	shared epitope
SSC	Sidescatter (Seitwärtsstreulicht)
T _H -Zelle	T-Helferzelle
Treg	CD4 ⁺ CD25 ^{+high} regulatorische T-Zelle
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
TT	Tetanus-Toxin
TZR	T-Zell-Rezeptor
U	units
z. B.	zum Beispiel

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: HLA-Klasse II-Tetramere	32
Abb. 2: Funktionsprinzip der Antikörper im Cytokine Secretion Assay	36
Abb. 3: Funktionsprinzip des Enzyme-linked Immunosorbent Assay	38
Abb. 4: CD4 ⁺ CD25 ⁻ T-Zellen eines HLA-DRB1*0401-positiven Donors	41
Abb. 5: T-Zellen eines HLA-DRB1*0401-positiven Donors	42
Abb. 6: CD4 ⁺ T-Zellen eines HLA-DRB1*0401-positiven Donors	45
Abb. 7: CD4 ⁺ T-Zellen eines HLA-DRB1*0401-positiven Donors	47
Abb. 8: Prozentzahl antigenspezifischer CD4 ⁺ T-Zellen in CD4 ⁺ T-Zell-Kulturen nach <i>in vitro</i> Stimulation mit drei verschiedenen PPI ₇₃₋₉₀ -Peptidkonzentrationen	48
Abb. 9: T-Zellen eines HLA-DRB1*0401-positiven Donors	51
Abb. 10: T-Zellen von zwei HLA-DRB1*0401-positiven Donoren	52
Abb. 11: Interaktion verschiedener antigener Peptide mit humanem rekombinantem Hsp70	54
Abb. 12: T-Zellen eines HLA-DRB1*0401-positiven Donors (Donor #1)	56
Abb. 13: CD4 ⁺ T-Zellen eines HLA-DRB1*0401-positiven Donors (Donor #2).	57
Abb. 14: CD4 ⁺ T-Zellen eines HLA-DRB1*0404-positiven Donors (Donor #3).	58
Abb. 15: CD4 ⁺ T-Zellen eines HLA-DRB1*0401-positiven Donors (Donor #4).	59
Abb. 16: CD4 ⁺ T-Zellen eines HLA-DRB1*0401-positiven Donors (Donor #5).	60
Abb. 17: Graphische Zusammenfassung der Tabellen 2 bis 7	64
Abb. 18: CD4 ⁺ T-Zellen eines HLA-DRB1*0401-positiven Donors	66
Abb. 19: Prozentzahl antigenspezifischer CD4 ⁺ T-Zellen in CD4 ⁺ T-Zell-Kulturen nach <i>in vitro</i> Stimulation mit drei verschiedenen PPI ₇₃₋₉₀ -Peptidkonzentrationen in Hsp70-Komplexierung und ohne Hsp70....	67
Abb. 20: Cytokine Secretion Assay mit restimulierten CD4 ⁺ T-Zellen eines HLA-DRB1*0401-positiven Donors	68
Abb. 21: Graphische Darstellung der Tab. 8	70
Abb. 22: IFN- γ -Sekretion im Zellkulturüberstand	71
Abb. 23: IL-5-Sekretion im Zellkulturüberstand	72

Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Ausgewählte gesunde humane Donoren und Peptide, auf die eine <i>in vitro</i> Reaktion beobachtet wurde	49
Tab. 2: Prozentzahl antigenspezifischer CD4 ⁺ T-Zellen in CD4 ⁺ und CD4 ⁺ CD25 ⁻ T-Zell-Kulturen des HLA DRB1*0401 Donors #1	61
Tab. 3: Prozentzahl antigenspezifischer CD4 ⁺ T-Zellen in CD4 ⁺ und CD4 ⁺ CD25 ⁻ T-Zell-Kulturen des HLA DRB1*0401 Donors #2	62
Tab. 4: Prozentzahl antigenspezifischer CD4 ⁺ T-Zellen in CD4 ⁺ T-Zell-Kulturen des HLA DRB1*0404 Donors #3	62
Tab. 5: Prozentzahl antigenspezifischer CD4 ⁺ T-Zellen in CD4 ⁺ und CD4 ⁺ CD25 ⁻ T-Zell-Kulturen des HLA DRB1*0401 Donors #4	63
Tab. 6: Prozentzahl antigenspezifischer CD4 ⁺ T-Zellen in CD4 ⁺ T-Zell-Kulturen des HLA DRB1*0401 Donors #5	63
Tab. 7: Prozentzahl antigenspezifischer CD4 ⁺ T-Zellen in CD4 ⁺ CD25 ⁻ T-Zell-Kulturen des HLA DRB1*0401 Donors #6	64
Tab. 8: Prozentzahl antigenspezifischer IFN-γ-produzierender CD4 ⁺ T-Zellen in CD4 ⁺ T-Zell-Kulturen verschiedener Donoren	69

1. Einleitung

1.1 Das humane Immunsystem

Die Aufgabe des humanen Immunsystems besteht darin, einerseits den Organismus vor körperfremden Substanzen und Krankheitserregern wie Bakterien, Viren, Pilzen und Parasiten zu schützen, andererseits bekämpft es entartete körpereigene Zellen (z. B. maligne Tumorzellen), welche aufgrund genetischer Veränderungen als „fremd“ erkannt werden. Gleichzeitig muss gewährleistet sein, dass keine Immunreaktion gegen den eigenen gesunden Körper erfolgt. Es wird unterschieden zwischen dem angeborenen Immunsystem, was von Geburt an einen ersten schnellen Schutz darstellt und dem erworbenen (adaptiven) Immunsystem, was eine spezifischere Abwehr ermöglicht, die sich im Laufe des Lebens fortlaufend anpasst.

Das angeborene Immunsystem stellt den entwicklungsgeschichtlich älteren Teil des Immunsystems dar. Dazu gehören physiologische Barrieren wie z. B. die Haut, das Komplementsystem, zelluläre Komponenten wie Phagozyten (Granulozyten, Makrophagen) sowie natürliche Killerzellen (NK-Zellen) und lösliche Mediatoren. Die zugrunde liegenden Mechanismen sind genetisch festgelegt, zeichnen sich aber durch Fehlen von einem immunologischen „Gedächtnis“ aus. Zur Phagozytose befähigte Zellen erkennen über Muster-Erkennungs-Rezeptoren bestimmte konservierte Strukturen auf der Oberfläche eingedrungener Pathogene (Janeway et al. 2002, Aderem et al. 2000). Die Bindung und Markierung von Pathogenen durch diese Rezeptoren ruft eine Entzündung in den betroffenen Geweben hervor. Gleichzeitig wird das Komplementsystem aktiviert, das mit seinen löslichen Komponenten andere Zellen ebenfalls zum Ort des Eindringens rekrutiert und dadurch die Entzündungsreaktion sowie eine Reaktion des adaptiven Immunsystems verstärkt (Carroll 2004). Einige Rezeptoren des angeborenen Immunsystems besitzen zusätzlich eine wichtige Funktion bei der Übertragung von Signalen. Diese besonderen signalgebenden Moleküle werden in einer Familie mit der Bezeichnung „Toll-like“ Rezeptoren (TLR) zusammengefasst. Sie aktivieren die

Immunabwehr über verschiedene Signalwege (Akira et al. 2004).

Den hoch spezialisierten Teil des Immunsystems stellt das adaptive Immunsystem mit B- und T-Lymphozyten sowie den antigenpräsentierenden Zellen (APZs) dar. Es verstärkt und fokussiert die angeborene Immunantwort. Darüber hinaus besitzt es die besondere Eigenschaft, ein immunologisches „Gedächtnis“ zu bilden. Dadurch ist es möglich, bei der Erkennung spezifischer Antigene, mit denen das Immunsystem vorher schon einmal Kontakt hatte, eine schnellere, verstärkte Immunantwort auszulösen. So kann der Organismus vor einer wiederholten Infektion besser geschützt werden. Basierend auf dem Prinzip der klonalen Selektion von Lymphozyten, die eine Vielzahl hochspezifischer Antigenrezeptoren besitzen, ist es diesem Teil des Immunsystems möglich, jedes beliebige fremde Antigen zu erkennen. Die Entstehung und klonale Verteilung des Rezeptorrepertoires wird über den genetischen Mechanismus der somatischen Rekombination realisiert. Durch die Anwesenheit mehrerer Millionen Lymphozyten mit ebenso vielen unterschiedlichen Spezifitäten wird eine hohe Diversität gewährleistet (Flajnik 2002). Die Zellen der erworbenen Immunität können damit auf unterschiedlichste Antigene mit der Produktion von Antikörpern oder der Bildung bestimmter Effektorzellen reagieren.

Bei der adaptiven Immunantwort wird zwischen humoraler und zellulärer Antwort unterschieden. Die humorale Reaktion der B-Lymphozyten, welche im Knochenmark reifen, wird durch die Sezernierung von Antikörpern vermittelt und richtet sich zusammen mit den Komplementkomponenten gegen extrazelluläre Antigene. Über den B-Zellrezeptor können sie spezifisch Antigene binden, aufnehmen, prozessieren und die Peptidfragmente als APZs über MHC (major histocompatibility complex)-Moleküle an zirkulierende, naive T-Zellen präsentieren, sowie kostimulatorische Signale gewährleisten. Nach Interaktion mit einer T-Zelle kommt es zur klonalen Expansion und zur Differenzierung in antikörpersezernierende Plasmazellen oder, zu einem kleineren Teil, in Gedächtniszellen (Rajewsky 1996, Janeway 2002).

Die zelluläre oder zellvermittelte Immunantwort findet über die Aktivierung von naiven T-Lymphozyten statt, die bei ihrer Zirkulation durch den Körper auf

präsentierte Antigene treffen und daraufhin zu Effektorzellen differenzieren, was als Priming bezeichnet wird (Heath et al. 2001). T-Effektorzellen werden aufgrund zweier Oberflächenstrukturen in $CD4^+$ und $CD8^+$ T-Zellen unterteilt. Die wichtigsten Aufgaben von Effektorzellen liegen in der Eliminierung virusinfizierter und entarteter Körperzellen durch zytotoxische $CD8^+$ T-Lymphozyten (CTL) sowie in der Aktivierung von Makrophagen und B-Zellen durch $CD4^+$ T-Zellen, welche auch als T-Helferzellen (T_H -Zellen) bezeichnet werden. Diese werden unterteilt in T_H1 und T_H2 -Zellen. T_H1 -Zellen aktivieren durch die Ausschüttung von den Zytokinen Interferon-gamma ($IFN-\gamma$) und Interleukin-2 (IL-2) die zelluläre Immunantwort. Gleichzeitig wird eine T_H2 -Antwort durch die ausgeschütteten Zytokine inhibiert. T_H2 -Zellen sezernieren u. a. die Zytokine IL-4, IL-5, IL-10 sowie IL-13 (Romagnani 1999, Bashyam 2007, Annunziato et al. 2009), sind bei allergischen Reaktionen beteiligt und können eine humorale Immunreaktion auslösen. Hierbei wird umgekehrt eine T_H1 -Reaktion verhindert.

1.2 Antigenpräsentierende Zellen und Antigenpräsentation

Theoretisch ist fast jede Zelle im Körper dazu in der Lage, über MHC Klasse I-Moleküle Antigene an $CD8^+$ zytotoxische T-Zellen zu präsentieren und somit die Funktion einer APZ zu übernehmen. Der Begriff der APZ wird allerdings meist nur für spezialisierte Zellen verwendet, die für das so genannte Priming (s. 1.1) von naiven T-Zellen zuständig sind. Als professionelle APZs werden Zellen bezeichnet, die neben MHC Klasse I- auch MHC Klasse II-Moleküle exprimieren und sowohl $CD8^+$ T-Zellen als auch $CD4^+$ T-Helferzellen aktivieren können. Da nicht-professionelle APZs MHC-Moleküle nicht konstitutiv exprimieren, benötigen sie die Stimulation mit bestimmten Zytokinen wie $IFN-\gamma$, da sonst eine Interaktion mit naiven T-Zellen nicht möglich ist. B-Zellen, Makrophagen und dendritische Zellen sind die wichtigsten professionellen APZs. Sie zeichnen sich dadurch aus, dass sie sehr effizient Antigene phagozytotisch oder makropinozytotisch aufnehmen können und ausser MHC Klasse I- und II- auch kostimulierende Moleküle exprimieren. Diese drei

Zelltypen unterscheiden sich in einigen Merkmalen, u.a. in der Selektivität der Antigenaufnahme, in der Art der Prozessierung und in der Kostimulation sowie im Wanderungsverhalten. Gemeinsames Ziel ist die Stimulation und Aktivierung naiver T-Zellen, wobei die dendritischen Zellen eindeutig am effektivsten sind (Banchereau et al. 1998 und 2000).

1.3 Antigenerkennung durch T-Zellen

Die spezifische Antigenerkennung durch T-Zellen erfolgt in Form eines Komplexes aus einem gebundenen Antigenfragment und einem körpereigenen MHC-Molekül auf der Oberfläche aktivierter APZs. CD8⁺ T-Zellen erkennen dabei MHC Klasse I:Peptidkomplexe, CD4⁺ T-Zellen MHC Klasse II:Peptidkomplexe. CD4 und CD8 fungieren während der Antigenerkennung als Korezeptoren und binden an konservierte Stellen der MHC-Moleküle abseits der Antigen bindenden Spalte. Auf nahezu jedes Antigen wird eine spezifische Reaktion ermöglicht, die durch eine große Diversität der T-Zellrezeptoren (TZR) gewährleistet wird, welche im Rahmen der T-Zelldifferenzierung auf somatischer Ebene mit bis zu 10¹⁵ verschiedenen T-Zellrezeptoren entsteht (Davis et al. 1988). Nach der Bindung eines TZRs zusammen mit einem der Korezeptoren an den spezifischen Liganden wird ein erstes Signal ins Zellinnere ausgelöst. Für die Anregung zur Proliferation und Differenzierung der betreffenden Zelle ist zusätzlich noch ein kostimulierendes Signal erforderlich, was sie ausschließlich von professionellen APZs erhält, z. B. über die zur Immunglobulin-Superfamilie gehörigen B7-Moleküle B7.1 (CD80) und B7.2 (CD86). Diese werden nur auf professionellen APZs exprimiert (Reeves et al. 1997) und treten mit CD28-Molekülen auf den T-Zellen in Wechselwirkung (Wang et al. 2004), welche das kostimulierende Signal freisetzen, woraufhin die Phase der klonalen Vermehrung folgt. CD4⁺ T-Zellen differenzieren in T_H1- oder T_H2-Zellen, die sich in ihrer Zytokinproduktion und damit in ihrer Effektor-Funktion unterscheiden (s.1.1).

1.4 Präsentation antigener Peptide durch MHC-Moleküle

Die MHC-Moleküle sind membranständige Glykoproteine und werden beim Menschen auch als humane Leukozytenantigene (HLA) bezeichnet. Sie werden von den Genen des Haupthistokompatibilitätskomplexes (MHC, s. 1.1) kodiert, der auf dem kurzen Arm des Chromosoms 6 lokalisiert ist. Sie spielen bei der humoralen sowie bei der zellulären Immunantwort eine entscheidende Rolle, wobei es ihre Aufgabe ist, Peptide aus extrazellulären bzw. zytosolischen Proteinen in der Antigen-Bindungsspalte zu binden und auf der Zelloberfläche von APZs an T-Zellen zu präsentieren. Klassische MHC-Moleküle lassen sich in zwei Klassen einteilen, die sich in einzelnen Feinheiten unterscheiden, in wesentlichen Strukturmerkmalen aber übereinstimmen und hochgradig polymorph sind (Janeway 2002). Die Hauptunterschiede bestehen in der Herkunft der präsentierten Peptide (s. 1.5 und 1.6).

MHC Klasse I-Moleküle, beim Menschen HLA-A, -B und -C, werden auf fast allen Körperzellen exprimiert. Sie binden sowohl körpereigene als auch virale Peptide aus Proteinen, die im Zytosol durch das Proteasom abgebaut werden. Die Beladung der MHC I-Moleküle erfolgt im endoplasmatischen Retikulum (ER). Durch die rezeptorvermittelte Aufnahme extrazellulärer Peptide ins Zellinnere können auch extrazelluläre Antigene wie z. B. HSP:Peptidkomplexe nach der Internalisierung über MHC I präsentiert werden (Singh-Jasuja et al. 2000). Im Anschluss an diesen als „cross-presentation“ bezeichneten Vorgang kommt es zu einer Antwort der zytotoxischen CD8⁺ T-Zellen, wodurch die betroffenen Zellen zerstört werden.

Beim Menschen existieren fünf Isotypen von MHC Klasse II-Molekülen: HLA-DM, -DO, -DP, -DQ und -DR. HLA-Klasse II-Moleküle sind heterodimere Glykoproteine, die aus einer 33-35 kDa großen α -Kette und einer 26-28 kDa großen β -Kette bestehen. Alle Gene für diese Moleküle befinden sich in der HLA-Klasse II-Region auf Chromosom 6. Die für die α -Kette kodierenden Gene werden mit A bezeichnet (z. B. DQA, DRA), die für die β -Kette mit B (z. B. DQB, DRB). Diese Moleküle werden nur auf Zellen des Immunsystems (B-Lymphozyten, dendritischen Zellen und stimulierten Makrophagen) exprimiert.

Sie binden in erster Linie Peptide aus extrazellulären Proteinen sowie Pathogenen (Bakterien), die in Endosomen abgebaut werden und die zuvor durch rezeptorvermittelte Endozytose, unspezifische Makropinozytose oder Phagozytose Zugang zum sekretorischen Weg der APZs gefunden haben. In angesäuerten endosomalen Kompartimenten findet die Beladung der MHC II-Moleküle statt, woraufhin eine Immunantwort durch Interaktion mit den CD4⁺ T_H1- oder T_H2-Zellen folgt (Janeway 2002).

Wenn die verschiedenen Typen der T-Zellen ihre Ziele erkennen, werden sie zur Sekretion unterschiedlicher Effektormoleküle (z. B. Zytokine) angeregt. Diese beeinflussen die Zielzellen direkt oder mobilisieren andere Effektorzellen. Die Effektormoleküle spielen eine entscheidende Rolle bei der klonalen Expansion von Lymphozyten, bei der angeborenen Immunantwort und bei den Effektorreaktionen der meisten Immunzellen (Janeway 2002).

1.5 Hitzeschockproteine

Hitzeschockproteine (HSPs) kommen in allen Pro- und Eukaryonten ubiquitär vor und sind hoch konservierte Proteine. Sie übernehmen verschiedenste Funktionen, die für das Überleben einer Zelle von großer Wichtigkeit sind.

Im Jahre 1962 wurden diejenigen Gene entdeckt, welche die HSPs kodieren, als *Drosophila hydei* überhöhten Temperaturen exponiert wurde. Hierbei wurde vermehrte Aktivität in bestimmten Genloki der Riesenchromosomen der Speicheldrüsen dieser Fliegen beobachtet (Ritossa 1962). Die Expression der HSPs wird durch verschiedene Stresssituationen induziert, so z. B. durch Temperaturerhöhung, oxidativen Stress, Chemikalien, UV-Bestrahlung, Toxine, Virusinfektionen oder Glucosemangel. Man unterscheidet zwischen konstitutiven und induzierbaren HSPs, die ersteren werden unter Normalbedingungen, die anderen nur unter Stressbedingungen exprimiert (Lindquist 1986). Bis zu 5 % der gesamten intrazellulären Proteine sind HSPs, unter Stressbedingungen kann sich ihr Gehalt auf mehr als 15 % erhöhen. HSPs befinden sich im Zytosol, im eukaryotischen Kern, im endoplasmatischen Retikulum, in Mitochondrien und in Chloroplasten (Lindquist et al. 1988).

Nach ihrem Molekulargewicht werden die HSPs in verschiedene Klassen eingeteilt. Die kleinen HSPs mit einer Größe von 15-30 kDa werden in erster Linie im Nukleus gefunden, außerdem gibt es HSPs mit Größen von 40, 60, 70, 90 und 110 kDa. HSPs der 70, 90 und 110 kDa Klasse haben eine Substratbindungsdomäne und können Peptide binden (Javid et al. 2007, Tobian et al. 2004, Wang et al. 2002). In der vorliegenden Arbeit sind speziell die humanen, stressinduzierbaren HSPs der 70 kDa Klasse (Hsp70) relevant. Alle Hsp70-Moleküle haben einen ähnlichen Aufbau aus drei Domänen. Am N-Terminus des Proteins ist eine hochkonservierte 44 kDa Domäne mit schwacher ATPase-Aktivität lokalisiert. Die C-terminale Substratbindungsdomäne besteht aus einer weniger konservierten 18 kDa Subdomäne mit β -Faltblatt-Struktur, die das Substrat bindet und einer variablen 10 kDa α -helikalen Subdomäne, die der Substraterkennung sowie Stabilisierung der Substratbindung dient und ATP/ADP-abhängig ihre Konformation ändert (Javid et al. 2007).

Nach und nach entdeckte man vielfältige Funktionen der HSPs. Ihre Hauptaufgabe ist es, die Zelle in Stresssituationen zu schützen. Sie fungieren als molekulare „Wächter“ bei der Faltung und Entfaltung neu synthetisierter Proteine (Gething et al. 1992) sowie bei der Proteolyse irreparabel falsch gefalteter Proteine (Parsell et al. 1993) und werden daher auch als „Chaperone“ bezeichnet. Außerdem spielen sie eine Rolle beim Zusammenbau von Proteinen aus mehreren Untereinheiten (Haas 1991) und bei der Temperaturtoleranz (Lindquist 1986). Ferner stellen sie geeignete Modelle dar, um die Transkriptionsregulation (Morimoto 1998), die Stressantwort (Lindquist 1986) und die molekulare Evolution zu untersuchen (Feder et al. 1999).

1.6 Die Rolle der Hitzeschockproteine in der angeborenen und adaptiven Immunität

Lange Zeit wurden HSPs als rein intrazelluläre Moleküle betrachtet, wo sie eine zytoprotektive Rolle spielen (s. 1.5) und normalerweise kommt freies HSP so gut wie nicht im Extrazellulärraum vor. Neuerdings ist bekannt geworden, dass

sie unter bestimmten physiologischen Bedingungen, wie nekrotischem Zelltod, auch in den extrazellulären Raum gelangen können (Basu et al. 2000, Bausero et al. 2005), dort mit APZs interagieren und so über verschiedene Mechanismen die angeborene und adaptive Immunität beeinflussen (Schild et al. 1999, Mycko et al. 2004, Malaitsev et al. 2008).

Einerseits werden durch HSPs verschiedene angeborene, nicht antigenspezifische Mechanismen angestoßen, die APZs aktivieren und eine Immunantwort fördern. Dendritische Zellen und Makrophagen sezernieren nach Kontakt mit HSPs eine Reihe von inflammatorischen Zytokinen wie IL-1 β , IL-12, IL-6, Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) und Granulozyten-Makrophagen-koloniestimulierenden Faktor (GM-CSF) (Basu et al. 2000, Chen et al. 1999, Singh-Jasuja et al. 2000, Moroi et al. 2000, Kol et al. 1999, Asea et al. 2000). Ausserdem kommt es in dendritischen Zellen und Makrophagen zu einer Induktion der induzierbaren Stickstoffmonoxid-Synthase und der Produktion von Stickstoffmonoxid (NO) (Panjwani et al. 2002). Makrophagen sezernieren desweiteren Chemokine wie MCP-1 (monocyte chemoattractant protein-1), MIP-2 (macrophage inflammatory protein-2) und RANTES (regulated upon activation, normal T cells expressed and secreted) (Singh-Jasuja et al. 2000, Lehner et al. 2000). Ferner wird die Reifung und Wanderung dendritischer Zellen zu den Lymphknoten induziert (Basu et al. 2000, Singh-Jasuja et al. 2000, Binder et al. 2000). Dabei kommt es zu einer erhöhten Expression kostimulatorischer Moleküle und Reifungsmarker wie MHC Klasse II-Molekülen, CD86, CD83 und CD40.

Andererseits hat die Interaktion von HSP:Peptidkomplexen mit APZs die verstärkte Präsentation der gebundenen antigenen Peptide über MHC Klasse I- bzw. MHC Klasse II-Moleküle zur Folge, wodurch eine erhöhte Stimulation von CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen und damit eine adaptive, antigenspezifische Immunantwort ausgelöst wird (Suto et al. 1995, Doody et al. 2004, Mycko et al. 2004, Haug et al. 2005).

Mycko et al. haben beschrieben, dass eine Überexpression von Hsp70 *in vitro* zu einer verstärkten Autoantigenerkennung, einer Verstärkung von Autoimmunantworten und somit zur Auslösung der Autoimmunkrankheit

Multiple Sklerose (MS) führen kann (Mycko et al. 2004). Später wurde von derselben Arbeitsgruppe in einem Mausmodell gezeigt, dass Hsp70 bei der Auslösung der experimentellen autoimmunen Encephalomyelitis (EAE) einen gefährlichen immunstimulatorischen Beitrag leistet (Mycko et al. 2008).

Bezüglich der Auslösung von Autoimmunerkrankungen durch das Vorhandensein von HSP, z. B. nach nekrotischem Zelltod, wurde die Hypothese postuliert, dass dieses Protein involviert sein könnte, indem eine Immunreaktion auf ein mögliches autoantigenes Peptid durch HSP in Konzentrationen erleichtert wird, in denen die Peptide ohne HSP nicht immunogen wirken würden (Haug et al. 2005, Mycko et al. 2004, Millar et al. 2003, Pockley 2003, van Eden et al. 2005, Houlihan et al. 2009). Mittels HLA-DR-Tetramerfärbung wurde von Haug et al. gezeigt, dass humanes stressinduzierbares Peptid-bindendes Hsp70 komplexiert mit dem antigenen Tetanus-Peptid TT₉₄₇₋₉₆₆ und dem Influenza-Protein Hämagglutinin₃₀₇₋₃₁₉ (HA₃₀₇₋₃₁₉) in niedrigen Konzentrationen die Aktivierung von (allo-) antigenspezifischen CD4⁺ T-Zellen im humanen System verstärkt und folglich zu einer Proliferationsverstärkung alloreaktiver T-Lymphozyten führt (Haug et al. 2005). Eine erhöhte Reaktivität von T-Zellen gegenüber dem gebundenen Peptid in einem HSP:Peptid-Komplex versus eine Immunantwort durch T-Zellen gegen HSP selbst sind unterschiedliche Aspekte der möglichen Beteiligung von HSP an der Pathogenese von Autoimmunerkrankungen.

Im Gegensatz zu dem oben beschriebenen Effekt, dass das Peptid-bindende Hsp70 bei der Auslösung von Autoimmunkrankheiten eine immunstimulatorische Rolle spielt, haben van Eden et al. eine immunmodulatorische Wirkung von Hsp60 beschrieben (van Eden et al. 2007), wobei diese Hitzeschockprotein-Klasse keine Peptidbindungsstelle hat und es sich somit um ein weiteres Phänomen von HSP-Einflussmöglichkeiten handelt. Für eine immunregulatorische Rolle von HSPs im Zusammenhang mit Autoimmunerkrankungen gab es 1985 erste Hinweise, als van Eden et al. durch die Analyse von T-Zellantworten in einem Arthritis-Rattenmodell die Beobachtung machten, dass Immunisierungen mit HSP-Molekülen in verschiedenen Tiermodellen vor Arthritis schützen konnten (van Eden et al.

1985). Seither wurden Immunantworten gegen HSPs gefunden, die sich aus Entzündung in verschiedenen Krankheitsmodellen und menschlichen Autoimmunerkrankungen wie z. B. dem Diabetes mellitus Typ 1 ergeben. HSP könnte möglicherweise sogar therapeutisch bzw. präventiv verwendet werden, um immunregulatorische Stimulationswege zu triggern und so autoimmune Krankheiten zu unterdrücken (van Eden et al. 2007).

1.7 Autoimmunerkrankungen

Als Autoimmunerkrankungen bezeichnet man die Krankheitsbilder, bei denen humorale und/oder zelluläre Immunreaktionen, die sich spezifisch gegen körpereigene Substrate richten, eine entscheidende Rolle spielen. Die häufigsten Autoimmunerkrankungen sind der Diabetes mellitus Typ 1, die Rheumatoide Arthritis (RA) und die Autoimmunthyreoiditis (chronische lymphozytäre Thyreoiditis, Hashimoto). Der genaue Entstehungsmechanismus dieser Erkrankungen ist bis heute ungeklärt. Bekannt ist, dass die Juvenile Idiopathische Arthritis (JIA) bei Kindern und die Rheumatoide Arthritis bei Erwachsenen T-Zell-vermittelte Erkrankungen sind, deren Entstehung eng mit definierten MHC Klasse II-Allelen assoziiert ist. Bei der RA existieren sowohl prädisponierende Allele (z. B. HLA-DRB1*0401) als auch protektive Allele (z. B. HLA-DRB1*0402). Beim Diabetes mellitus Typ 1 sind die prädisponierenden Allele HLA-DR3-DQ2 und HLA-DR4-DQ8 bekannt (Knip et al. 2008).

Autoreaktive, gegen körpereigene Strukturen (Autoantigene) gerichtete Immunzellen werden im Thymus durch negative Selektion eliminiert (Sebzda et al. 1994, Nedjic et al. 2008). Außer dieser Deletion im Thymus gibt es CD4⁺CD25^{high} T-Regulationszellen (Treg), welche die Aktivierung autoreaktiver T-Zellen unterdrücken (Sakaguchi et al. 1995). Durch dieses als Autotoleranz bezeichnete Phänomen wird normalerweise eine Reaktion des Immunsystems gegen körpereigene Strukturen (Autoaggressivität) verhindert. Dennoch können einige autoreaktive T-Zellen nach der Thymusselektion in die Peripherie gelangen, da sie nur eine schwache Affinität zum autoantigenen Peptid haben und so der negativen T-Zell-Selektion entkommen können (Lee et al. 1999).

Entfernt man experimentell *in vitro* die Regulationszellen, können auch bei gesunden Donoren autoreaktive CD4⁺ T-Zellen mit mittlerer und hoher Avidität gefunden werden (Danke et al. 2004).

Bei Störungen der Autotoleranz kann es durch verschiedene Mechanismen zu Autoimmunerkrankungen kommen. Zum Beispiel werden als Antwort auf einen Erreger kreuzreaktive Antikörper gebildet, die körpereigene Strukturen angreifen. Die Kreuzreaktivität beruht auf einer ähnlichen molekularen Struktur des Fremdantigens mit der körpereigenen Eiweißstruktur und wird als „molekulares Mimikry“ bezeichnet. Ein weiterer Mechanismus kann der Funktionsverlust von Tregs oder ein erhöhter T-Helfer/Treg-Quotient sein, bei dem es zu einer übermäßigen T- und B-Zell-Aktivierung u. a. mit Bildung von Autoantikörpern kommt.

1.8 Diabetes mellitus Typ 1

Der Diabetes mellitus Typ 1 ist eine chronische Stoffwechselerkrankung, die auf einem absoluten Insulinmangel beruht und in deren Folge zumeist erst nach längerer Krankheitsdauer Schäden an Blutgefäßen und Nervensystem auftreten können. Nach der Ätiologie wird unterschieden zwischen einem immunologisch bedingten und einem idiopathischen (in Europa seltenen) Diabetes mellitus Typ 1 (Herold 2009). Durch eine Autoimmuninsulinitis kommt es zur Zerstörung der insulinproduzierenden Beta-Zellen der Langerhansschen Inseln des Pankreas mit absolutem Insulinmangel, wobei genetische Faktoren eine prädisponierende Rolle spielen: 20 % der Typ 1-Diabetiker haben eine positive Familienanamnese mit Typ 1-Diabetes und über 90 % der Patienten haben die HLA-Merkmale DR3 und/oder DR4. Für eine Autoimmuninsulinitis sprechen beim frisch manifestierten Typ 1-Diabetes eine Infiltration der Langerhansschen Inseln mit autoreaktiven T-Lymphozyten, der Nachweis von Inselzell-Autoantikörpern in über 75 % der Fälle und eine Remission unter immunsuppressiver Therapie (Herold 2009).

Das Autoantigen Glutamic Acid Decarboxylase 65⁵⁵⁵⁻⁵⁶⁷ (GAD65⁵⁵⁵⁻⁵⁶⁷) ist assoziiert mit der Pathogenese des Diabetes mellitus Typ 1 (Nepom et al. 2001,

Danke et al. 2004 und 2005) und wird daher neben anderen Peptiden, die eine Proliferation von autoreaktiven T-Lymphozyten auslösen, in dieser Arbeit untersucht.

1.9 Ausgangspunkt und Ziel der Arbeit

In dieser Arbeit sollte der Einfluss von Hsp70 auf die Immunantwort im humanen System bei gesunden HLA-DR-typisierten Spendern im Zusammenhang mit bestimmten autoantigenen Peptiden untersucht werden. Die Kernfragen waren, ob durch Hsp70-gebundenes Peptid autoreaktive T-Zellen verstärkt stimuliert und detektiert werden können, welchen Einfluss Tregs darauf haben und wie die Zytokinproduktion sich unter dem Einfluss von Hsp70 verändert. Dazu wurde die T-Zellaktivierung mit und ohne Hsp70-Komplexierung mit folgenden (auto-) antigenen Peptidsequenzen untersucht: dem Diabetes-assoziierten Peptid GAD65₅₅₅₋₅₆₇, dem Tumorantigen NY-ESO1₁₂₂₋₁₃₃, dem Präproinsulin₇₃₋₉₀ (PPI₇₃₋₉₀, Teilsequenz aus dem C-Peptid p73-90 mit Substitution von Serin anstatt Lysin in Position 88 für bessere HLA-DRB1*0401-Bindung), dem gesamten C-Peptid des Proinsulins und als Kontrolle mit dem Influenza-Protein HA₃₀₇₋₃₁₉. Hierfür sollten Proliferationsversuche mit isolierten CD4⁺ T-Zellen gesunder Spender bekannten HLA-DR Haplotyps durchgeführt werden. Die mit und ohne Hsp70-Komplexierung generierten (auto-) antigenspezifischen humanen T-Zellen sollten mittels HLA-DR-Tetramerfärbung analysiert werden.

Im Gesamtzusammenhang soll ein möglicher Einfluss von Hsp70 auf die Pathogenese von Autoimmunkrankheiten wie z. B. dem Diabetes mellitus Typ 1 untersucht werden.

2. Materialien

2.1 Geräte und Hilfsmittel

Zellbestrahlungsgerät Gammacell 1000 Elite	MDS Nordion, Ottawa, Canada
Brutschrank HERA cell	Heraeus, Hanau, Deutschland
COBAS MICROS Zellzählgerät	Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland
Cryo-Röhrchen 1 ml	Corning Incorporated Life Sciences, Lowell, USA
ELISA-Reader Milenia Kinetic Analyzer	Diagnostic Products Corporation, Los Angeles, USA
FACS Calibur Durchflusszytometer	Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland
Freezing Container Nalgene® Mr. Frosty	Fisher Scientific GmbH, Schwerte, Deutschland
Magnetrührgerät	Fisher Bioblock Scientific, Illkirch Cedex, Frankreich
Neubauer Zählkammer	La Fontaine International
Pipetten LABMATE™	ABIMED, Langenfeld, Deutschland
Pipettierhilfe SWIFTPET™	ABIMED, Langenfeld, Deutschland
Rotiergerät MACSmix™ Tube Rotator	Milteny Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland
Schüttelgerät Polymax 1040	Heidolph Instruments, Nürnberg, Deutschland
Standzentrifuge Rotixa 50 RS	Hettich, Tuttlingen, Deutschland
Sterilbank HERA safe	Heraeus, Hanau, Deutschland
Umkehrmikroskop LM Olympus IX50	Olympus, Hamburg, Deutschland
Vario MACS Separator	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland

Vortex IKA minishaker MS 1	IKA Works, Wilmington, USA
Wärmebad	Gesellschaft für Labortechnik, Burgwedel, Deutschland
Zentrifuge 5415 C	Eppendorf, Hamburg, Deutschland

2.2 Software

BD CellQuest™ Pro Version 4.0.2	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
CellQuest™ Version 3.3.	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
GraphPad Prism 4.0	Statcon, Witzenhausen, Deutschland
SOFTmax Pro 3.0	Molecular Devices Corporation, Sunnyvale, USA

2.3 Chemikalien, Reagenzien, Puffer und Kits

Ampuwa® Wasser	Fresenius Kabi Deutschland GmbH, Bad Homburg, Deutschland
Biotinylated Anti-human IL-5 Antibody (ELISA)	R&D Systems, Minneapolis, USA (BAM6051)
CFSE (5(6)-Carboxyfluorescein- diacetat-N-succinimidylester)	Invitrogen-Molecular Probes, Karlsruhe, Deutschland
Coating Puffer (ELISA)	Eigenherstellung
0,1M Carbonate, pH 9,5	
CSA Puffer: PBS + 0,5 % BSA (s. 2.6) + 2mM EDTA	Eigenherstellung, Bestandteile einzeln aufgeführt
DMSO	Merck, Darmstadt, Deutschland
EDTA	Sigma Chemical Co., St. Louis, USA (60-00-4)
FACS Clean	BD Biosciences Immunocytometry

	Systems, Heidelberg, Deutschland (340345)
FACS Flow	BD Biosciences Immunocytometry Systems, Heidelberg, Deutschland (342003)
FACS Rinse	BD Biosciences Immunocytometry Systems, Heidelberg, Deutschland (340346)
Ficoll-Hypaque-Lösung 1,077 g/ml	Biochrom AG, Berlin, Deutschland (L 6115)
Freezing Medium: FCS + 10 % DMSO	Eigenherstellung, Bestandteile einzeln aufgeführt
Hanks' Salt Solution w/o Phenol red = Hanks buffered saline (HBS)	Biochrom AG, Berlin, Deutschland (L 2035)
Heparin Sodium (Mucous) BP 100 units/ml	CP Pharmaceuticals Ltd, Wrexham, UK
Human IFN- γ ELISA Set OptiEIA	BD Biosciences Immunocytometry Systems, Heidelberg, Deutschland (555142)
IFN- γ -Diluent: PBS + 10 % FCS	Eigenherstellung, Bestandteile einzeln aufgeführt
IFN- γ Secretion Assay-Detection Kit (FITC), human (CSA)	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland
IL-2	R&D Systems, Minneapolis, USA (204-IL-CF)
IL-5-Diluent: PBS + 1 % BSA	Eigenherstellung, Bestandteile einzeln aufgeführt
MACS CD4 ⁺ T Cell Isolation Kit II, human	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland
MACS CD4 ⁺ CD25 ⁺ Treg Isolation Kit, human	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland
MACS LD-Säule	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach,

MACS LS-Säule	Deutschland Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland
MACS MS-Säule	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland
MACS Puffer: PBS+0,8 % BSA (s. 2.6) + 2mM EDTA	Eigenherstellung, Bestandteile einzeln aufgeführt
Monoclonal Anti-human/mouse IL-5 Antibody (ELISA)	R&D Systems, Minneapolis, USA (MAB405)
PBS-Lösung (Dulbecco) ohne Ca^{2+} , Mg^{2+}	Biochrom AG, Berlin, Deutschland (L 1825)
PHA	Sigma Chemical Co., St. Louis, USA
Propidiumjodid	BD Biosciences Immunocytometry Systems, Heidelberg, Deutschland
SEB	Sigma Chemical Co., St. Louis, USA
Stopp-Lösung (ELISA): 2M H_2SO_4	Eigenherstellung
Streptavidin, Horseradish Peroxidase Conjugated	Pierce, Rockford, USA (21126)
Substrate Kit TMB (Peroxidase Substrat: TMB (3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin)-Lösung (0,4 g/L), Wasserstoffperoxid-Lösung (0,02 % Wasserstoffperoxid in Zitronensäurepuffer))	Pierce, Rockford, USA (34021)
TRIS-hydrochlorid	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland (9090.2)
Trypanblau	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland (T8154)
Tween [®] 20	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland (9127.1)
Waschpuffer: PBS + 2 % FCS	Eigenherstellung, Bestandteile einzeln

Waschpuffer (ELISA): PBS +
0,05 % Tween, pH 7,4

aufgeführt
Eigenherstellung, Bestandteile einzeln
aufgeführt

2.4 Antikörper für die Durchflusszytometrie

Name	Fluo- reszenz	Klon	Isotyp	Hersteller
Maus-anti- human CD3	FITC	UCHT1	IgG ₁ κ	BD Biosciences Pharmingen, Heidelberg, Deutschland (555332)
Maus-anti- human CD4	APC	RPA- T4	IgG ₁ κ	BD Biosciences Pharmingen, Heidelberg, Deutschland (555349)
Maus-anti- human CD25	PE	M- A251	IgG ₁ κ	BD Biosciences Pharmingen, Heidelberg, Deutschland (555432)
Maus-anti- human CD14	PerCP	M5E2	IgG _{2a} , κ	BD Biosciences Pharmingen, Heidelberg, Deutschland (550787)
Isotypantikörper				
Maus-anti- human IgG ₁	FITC	X40	IgG ₁	BD Biosciences Immunocytometry Systems, Heidelberg, Deutschland (345815)
Maus-anti- human IgG ₁ κ	PE	MOPC- 21	IgG ₁ κ	BD Biosciences Pharmingen, Heidelberg, Deutschland (555749)
Maus-anti- human IgG ₁	APC	X0	IgG ₁	BD Biosciences Immunocytometry Systems, Heidelberg, Deutschland (340442)

BD Simultest	FITC	X40	IgG1	BD Biosciences
	PE	X39	IgG _{2a}	Immunocytometry Systems, Heidelberg, Deutschland (342409)

2.5 Verbrauchsmaterialien

5 ml FACS-Röhrchen	BD Biosciences Discovery Labware, Heidelberg, Deutschland (352052)
15 ml Falcon-Röhrchen	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland (188271)
50 ml Falcon-Röhrchen	BD Biosciences Discovery Labware, Heidelberg, Deutschland (352070)
6-Loch Multiwell™ Flachboden Zellkulturplatten	BD Biosciences Discovery Labware, Heidelberg, Deutschland (353046)
24-Loch Costar® Flachboden Zellkulturplatten	Corning Incorporated, Corning, USA (3524)
48-Loch Costar® Flachboden Zellkulturplatten	Corning Incorporated, Corning, USA (3548)
96-Loch Costar® Flachboden Zellkulturplatten	Corning Incorporated, Corning, USA (3596)
96-Loch U-Boden Zellkulturplatten	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland (650180)
96-Loch Nunc-Immuno™ Platte „maxisorp“	Nalge Nunc International, Rochester, USA (439454)
Deckgläser 22 x 22 mm	Menzel Gläser, Braunschweig, Deutschland
Glaspasteurpipetten 230 mm	WU Mainz
Parafilm®	Alcan Packaging, Neenah, USA
Pipettenspitzen	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland

Safe-Lock Mikroreaktionsgefäße (0,5 ml, 1,5 ml, 2,0 ml)	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Zellkulturpipetten (5 ml, 10 ml, 25 ml)	Corning Incorporated, Corning, USA

2.6 Peptide, Proteine und Proteinstandards

Albumin Fraktion V, proteasefrei = Bovines Serum Albumin (BSA)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland (T844.2)
FCS	Biochrom AG, Berlin, Deutschland (S 0115)
Hsp70 (Low Endotoxin) recombinant human protein	Assay Designs Incorporated, Michigan, USA (ESP-555D)
Human-Albumin 20 %	ZLB Behring GmbH, Marburg, Deutschland

Peptide:

	Synthese durch Dr. Hubert Kalbacher, Medizinisch-Naturwissenschaftliches Forschungszentrum, Universität Tübingen: Fmoc/TBTU-Methode, RP-HPLC-gereinigt (Umkehrphasen-Hochdruckflüssigkeits- Chromatographie), Reinheiten >90 %, überprüfte Identität mittels ESI-MS (Elektrosprayionisations- Massenspektrometrie).
GAD65	Peptidsequenz: 555-567
NY-ESO1	Peptidsequenz: 122-133
HA	Peptidsequenz: 307-319
PPI	Peptidsequenz: 73-90 (Substitution von Serin anstatt Lysin in Position 88)
C-Peptide, human	GenScript Corp., Piscataway, USA (RP11116)

Rekombinant hergestellte, humane
HLA-DR Tetramere
beladen mit folgenden Peptiden:

Erhalten von William W. Kwok, Ph.D.,
Benaroya Research Institute at Virginia
Mason, Seattle, USA. Hergestellt wie in
Danke et al. 2004 beschrieben.

GAD65₅₅₅₋₅₆₇ für HLA-DRB1*0401
und HLA-DRB1*0404

HA₃₀₇₋₃₁₉ für HLA-DRB1*0401
HLA-DRB1*0401 und HLA-
DRB1*0404 ohne gebundenes
antigenes Peptid (Kontrolltetramer)

NY-ESO1₁₂₂₋₁₃₃ für HLA-
DRB1*0401 und HLA-DRB1*0404

PPI₇₃₋₉₀ für HLA-DRB1*0401

2.7 Zellkulturmedium und Zusätze

2.7.1 Medium

VLE-RPMI 1640 (Very Low
Endotoxin) mit 2,0 g/l NaHCO₃
ohne L-Glutamin

Biochrom AG, Berlin, Deutschland
(F 1415)

2.7.2 Zusätze

HEPES Pufferlösung (1 M) (50x)

Biochrom AG, Berlin, Deutschland
(L 1613)

L-Glutamin (200mM)

Biochrom AG, Berlin, Deutschland
(K 0282)

Penicillin/Streptomycin

Biochrom AG, Berlin, Deutschland
(A 2213)

10.000 E/10.000 µg/ml

Pooled Human Serum (PHS) 10 %

Eigenherstellung

2.8 T-Zellen

Bei den verwendeten T-Zellen handelt es sich um Zellen humanen Ursprungs, gewonnen durch peripher-venöse Blutentnahme bei gesunden Donoren der bekannten HLA-DR-Haplotypen HLA-DRB1*0401 und HLA-DRB1*0404 (s. 3.1).

3. Methoden

3.1 Auswahl der humanen Donoren

Zunächst wurde bei gesunden freiwilligen Probanden, nach Aufklärung und schriftlichem Einverständnis der Teilnahme, eine Bestimmung der HLA-DR-Haplotypen mittels PCR durch Frau Prof. Dr. D. Wernet, Transfusionsmedizin, Universitätsklinikum Tübingen, durchgeführt. Ein Ethikvotum der Ethik-Kommission der Universität Tübingen liegt vor.

Es wurden Spender gewählt, die bestimmte HLA-DRB1-Allele exprimieren: HLA-DRB1*0401 und HLA-DRB1*0404.

3.2 Isolierung mononukleärer Zellen mittels Dichtegradientenzentrifugation aus peripherem Blut

B-Zellen, T-Zellen und Monozyten gehören zu den peripheren mononukleären Blutzellen (PBMCs). Die PBMCs wurden aus peripher-venösem Blut gesunder humaner Donoren bekannten HLA-DR-Haplotyps isoliert, die Gerinnung wurde durch Zugabe von 2 ml Heparin verhindert. Die Isolierung erfolgte unmittelbar nach der Entnahme mittels Dichtegradientenzentrifugation (Ficoll-Hypaque). Das synthetische Polysaccharid Ficoll ist ein neutrales, stark verzweigtes Polymer aus kreuzvernetzten Saccharosemonomeren. Mit 1,077 g/ml besitzt die verwendete Ficoll-Hypaque-Lösung eine größere Dichte als Lymphozyten, Monozyten und Thrombozyten, aber eine geringere als Erythrozyten und die meisten Granulozyten. Zusätzlich bewirkt Ficoll die Agglutination von Erythrozyten und beschleunigt so deren Sedimentation.

Zur Fraktionierung der Blutzellen wurden 15 ml Ficoll-Hypaque-Lösung in einem 50 ml Falcon-Röhrchen vorgelegt, jeweils mit 30 ml Blut (1:1 mit PBS verdünnt) vorsichtig überschichtet und die Proben bei 2020 rpm 15 Minuten ohne Bremse, 45 sec Beschleunigung bis zur vollen Drehzahl, abzentrifugiert. Dabei reichern sich die mononukleären Zellen entsprechend ihrer spezifischen Dichte in der Interphase zwischen Überstand (Plasma, Thrombozyten) und der Ficoll-

Hypaque-Trennlösung als sichtbarer Ring an. Erythrozyten und Granulozyten pelletieren am Boden des Röhrchens. Das Plasma wurde weitgehend abgesaugt und der PBMC-Ring mittels einer 10 ml Pipette vorsichtig abgenommen und in ein neues Röhrchen überführt. Die isolierten Zellen wurden anschließend durch Zentrifugation einmal in PBS (2020 rpm, 10 min) und zweimal in PBS, supplementiert mit 2 % FCS, (1300 rpm, 6 min) gewaschen. Vor dem letzten Waschschrift wurden die Zellen gezählt (Ausbeute: ca. $1,17 \times 10^6$ - $2,34 \times 10^6$ Zellen aus 1 ml Blut) und in VLE-RPMI 1640 Medium, supplementiert mit 10 % gepooltem humanem Serum (PHS, Gewinnung s. 3.5) und den in 3.4 beschriebenen Zusätzen resuspendiert.

3.3 Bestimmung der Zellzahl und Zellvitalität

Zur Bestimmung der Zellzahl und der Vitalität der Zellen wurden mindestens 20 μ l der jeweiligen Zellsuspension mit Trypanblau in einer 96-Loch U-Bodenplatte resuspendiert. Trypanblau ist ein saurer Farbstoff, dessen Anion an Zellproteine bindet. Das Trypanblau dringt durch defekte Zellmembranen toter Zellen in das Zytosol und färbt diese Zellen tiefblau. Die Zellen wurden in eine Neubauer Zählkammer überführt und es wurden vier Großquadrate ausgezählt. Die Zellzahl pro Milliliter der untersuchten Zellsuspension ergibt sich aus der Multiplikation des Mittelwertes aus den vier Großquadraten, des Verdünnungsfaktors und des Kammerfaktors (10^4). Alternativ wurden ca. 20 μ l der jeweiligen Zellsuspension in dem Zellzählgerät COBAS MICROS vollautomatisch gezählt, wobei sich anhand des Verdünnungsfaktors die Zellzahl der jeweiligen Probe direkt errechnen ließ.

3.4 Kultur humaner T-Zellen für T-Zellstimulationsexperimente

Für die Experimente zum Einfluss von Hsp70 auf die CD4⁺ T-Zellproliferation wurden PBMCs von gesunden Donoren mit bekanntem HLA-DR-Haplotyp isoliert (s. 3.2) und daraus wiederum die Population der CD4⁺ T-Zellen bzw. CD4⁺CD25⁻ T-Zellen (s. 3.6.2 und 3.6.3). Diese wurden mit Peptiden oder

Peptid:Hsp70-Komplexen (s. 3.10) stimuliert. Die Zellen wurden im Brutschrank bei 37° C und unter 5 % CO₂-Begasung kultiviert. Bei erstmalig stimulierten Zellen wurden an Tag 6 nach der Stimulation 10 Units (U) IL-2 pro ml Medium in jedes Loch zugegeben. Bei restimulierten Zellen wurden an Tag 2 nach der Restimulation 10 U IL-2 pro ml Medium in jedes Loch hinzugefügt. Die T-Zellen wurden als Suspensionszellen in VLE-RPMI 1640 Medium kultiviert, das mit 10 % PHS, sowie Glutamin (2 mM), Penicillin (0,06 mg/ml), Streptomycin (0,1 mg/ml) und HEPES-Puffer (10 mM) supplementiert war. Die Zellen wurden in 48-Loch Flachbodenplatten in einem Gesamtvolumen von 1 ml bzw. in 96-Loch Flachbodenplatten in einem Gesamtvolumen von 200 µl kultiviert und bei Bedarf wurde frisches Medium hinzugefügt.

Zunächst waren die T-Zellkultur-Versuche mit CD4⁺ T-Zellen bzw. CD4⁺CD25⁻ T-Zellen in VLE-RPMI 1640 Medium mit 5 % hitzeinaktiviertem PHS sowie den hier beschriebenen Zusätzen durchgeführt worden. Da sich herausgestellt hat, dass die Zellen bei 5 % hitzeinaktiviertem PHS schneller erneute Mediumszufuhr benötigten, was durch einen Farbumschlag von Pink nach Gelb angezeigt wird, wurde der PHS-Anteil im Kulturmedium dann auf 10 % PHS erhöht.

3.5 Gewinnung von gepooltem humanem Serum (PHS) für die T-Zellkultur

Von mindestens 6 verschiedenen gesunden Spendern wurden jeweils 120 ml peripher-venöses Blut ohne Zugabe gerinnungshemmender Zusätze abgenommen, sofort in 50 ml Röhrchen überführt und 1 h bei 37° C inkubiert.

Das geronnene Blut wurde 10 min bei 3250 rpm zentrifugiert. Anschließend wurde das Serum mit einer Pipette abgenommen und gepoolt. Nach Hitzeinaktivierung über 30 min bei 56° C im Wasserbad wurde das gepoolte humane Serum aliquotiert und bei -20° C tiefgefroren.

3.6 T-Zell-Isolierung

3.6.1 Auswahl der MACS-Säule

Die magnetische Zellseparation (magnetic cell sorting, MACS) dient der Isolierung bestimmter Zellen anhand von bestimmten Oberflächenstrukturen. Die Zellen werden mit Antikörper-gekoppelten ferromagnetischen MicroBeads markiert und über eine Säule gegeben, die sich in einem Magnetfeld befindet. Die unmarkierten Zellen passieren die Säule ungehindert, die markierten Zellen werden zurückgehalten und können anschließend außerhalb des Magnetfeldes eluiert werden. Diese Methode bietet den Vorteil, dass „unberührte“ CD4⁺ T-Zellen gewonnen werden können, d.h. die Zellen sind nach der Isolation nicht mit Antikörpern markiert, die negativen Einfluss auf den weiteren Versuch haben könnten.

Um seltene Zellen (<5 % der Gesamtzellen) zu isolieren, verwendet man am besten zwei Säulen hintereinander, indem man die positiv selektionierten Zellen anschließend nochmals über eine frische Säule gibt. Ist das Ziel der Isolierung größtmögliche Reinheit, so wird für bis zu 5x10⁸ Zellen eine LD-Säule verwendet. Wenn möglichst wenige Zellen bei der Isolierung verloren gehen sollen, verwendet man für bis zu 2x10⁸ Zellen eine MS-Säule, für bis zu 2x10⁹ Zellen eine LS-Säule. Die LS-Säule ist für die Positiv-Selektion von Antikörper-markierten seltenen sowie häufigen Zellen geeignet. Die MS-Säule ist für die Positiv-Selektion von Antikörper-markierten seltenen Zellen besonders geeignet. Die LD-Säule ist für die exakte Depletion unerwünschter Zellen (z. B. Tregs) gut geeignet (Herstellerangaben).

Um einen möglichst geringen Zellverlust im Rahmen der Isolierung zu gewährleisten, wurde daher für die CD4⁺ T-Zell-Depletion (Negativselektion) (s. 3.6.2) die LS-Säule verwendet. Sie wurde vom Hersteller so optimiert, dass sie auch für eine Negativselektion verwendbar ist. Für die CD4⁺CD25⁺ T-Zell-Depletion (s. 3.6.3) wurde die LD-Säule verwendet.

3.6.2 Isolierung von CD4⁺ T-Zellen

Aus den PBMCs wurden CD4⁺ T-Zellen mittels magnetischer Zellseparation mit dem MACS CD4⁺ T-Zell-Isolations-Kit nach der dem Kit beiliegenden Anleitung isoliert. Bei diesem Verfahren wurden die PBMCs zuerst mit einem Cocktail Biotin-markierter mAk gegen CD8, CD14, CD16, CD19, CD36, CD56, CD123, TZRγ/δ und Glycophorin A inkubiert. Dadurch bleiben die CD4⁺ T-Zellen unmarkiert, während die restlichen, in den PBMCs enthaltenen Zelltypen, mit biotinylierten Antikörpern markiert werden. Nach Zugabe anti-Biotin-konjugierter MicroBeads wurden die markierten Zellen mittels der MACS-Technologie (VarioMACS Separator, LS-Säule) von den unmarkierten CD4⁺ T-Zellen separiert. Dabei werden die mit den ferromagnetischen MicroBeads markierten „nicht-CD4⁺ T-Zellen“ im Magnetfeld des Separators zurückgehalten, während die unmarkierten CD4⁺ T-Zellen die Säule ungehindert passieren. Die Säule wurde mehrmals mit Puffer gespült und die CD4⁺ T-Zellen in einem Röhrchen aufgefangen.

Dann wurde die Säule aus dem Magnetfeld genommen und die „nicht-CD4⁺ T-Zellen“ unter Druck eluiert. Diese Zellen wurden später als APZs verwendet. Beide Zellfraktionen wurden einmal gewaschen, anschließend gezählt und in Medium aufgenommen. Nach jeder Isolierung wurden die Zellen durchflusszytometrisch (s. 3.13) charakterisiert. Der Anteil lebender CD4⁺ T-Zellen in der CD4⁺-Fraktion wurde durch Färbung mit anti-CD4, anti-CD3 und Propidiumjodid (s. 3.12.1) bestimmt. Der Gehalt an CD4⁺ T-Zellen war dabei in der Regel >90 %. Für die Fraktion der „nicht-CD4⁺ T-Zellen“ wurden dieselben Parameter bestimmt.

3.6.3 Isolierung von CD4⁺CD25⁺ und CD4⁺CD25^{high} T-Zellen (regulatorische T-Zellen, Tregs)

Um bei bestimmten Versuchen die regulatorischen CD4⁺CD25⁺ und CD4⁺CD25^{high} T-Zellen depletieren zu können, wurden diese in einem zusätzlichen Schritt im Anschluss an die CD4⁺-Isolierung mit dem MACS

CD4⁺CD25⁺ Treg-Isolations-Kit nach der dem Kit beiliegenden Anleitung isoliert. Zunächst wurden die CD4⁺ T-Zellen mit biotinylierten Antikörpern markiert und dann anti-Biotin-konjugierte CD25-MicroBeads zugegeben. Um die CD4⁺CD25^{high} T-Zellen zu isolieren, wurde die Zellsuspension im VarioMACS Separator über die MS-Säule gegeben, um die CD4⁺CD25⁺ T-Zellen zu isolieren, wurde die Zellsuspension im VarioMACS Separator über die LD-Säule gegeben. Die Reinheit der CD4⁺CD25⁻ T-Zellen lag bei den in dieser Arbeit berücksichtigten Versuchen bei 99,84 % im Mittel. Zusätzlich zu den in 3.6.2 beschriebenen durchflusszytometrischen Charakterisierungen wurde bei den CD4⁺CD25⁻ T-Zellen sowie den daraus depletierten CD4⁺CD25⁺ und CD4⁺CD25^{high} isolierten T-Zellen die Expression von CD25 bestimmt, um die Reinheit der CD4⁺CD25⁻ T-Zellen zu überprüfen und zu zeigen, dass in den CD4⁺CD25⁻ T-Zellen annähernd keine CD4⁺CD25⁺ T-Zellen mehr enthalten sind (s. 3.12.1).

3.7 Tiefkühlung von Zellen und Überständen

3.7.1 Tiefkühlung von Zellen

Wenn Zellen übrig waren oder nicht direkt verwendet werden konnten, wurden sie kryokonserviert. Dazu wurden in 1 ml Cryo-Röhrchen ca. 20x10⁶ Zellen in 1 ml Einfrier-Medium (s. 2.3 Freezing-Medium) zuerst ca. 15 min auf Eis gekühlt und dann im Freezing Container Nalgene[®] Mr. Frosty in den -80° C Tiefkühlschrank transferiert. Der Freezing Container Nalgene[®] Mr. Frosty bietet den Vorteil, dass er die Zellen sehr gleichmäßig mit ca. -1° C pro min bis -80° C abkühlt.

3.7.2 Auftauen von Zellen

Um tiefgekühlte Zellen wieder aufzutauen, wurde der Inhalt der Cryo-Röhrchen unter warmem Wasser verflüssigt. Sobald die Zellsuspension flüssig war, wurde sie in 10 ml PBS mit 10 % FCS gegeben, 6 min bei 1300 rpm abzentrifugiert und anschließend in Medium (s. 2.7) aufgenommen. Im Anschluss daran wurden die Zellen gezählt, auf ihre Vitalität hin überprüft (s. 3.3) und dann wie

frisch gewonnene Zellen weiterverarbeitet.

3.7.3 Tiefkühlung von Überständen

Zur späteren Analyse der Zytokinsekretion stimulierter Zellen wurden 48 h bis maximal 72 h nach T-Zell-Stimulation 60 µl Überstand aus jedem Loch einer 96-Loch-Flachbodenplatte bzw. 250 µl aus jedem Loch einer 48-Loch-Flachbodenplatte entnommen. Die Überstände wurden in 0,5 ml Eppendorf Safe-Lock Mikroreaktionsgefäße überführt und bei -80° C tiefgekühlt. Die entnommene Flüssigkeit wurde mit Medium (s. 2.7) ersetzt, worin zusätzlich 10 U IL-2 pro ml Zellkultur enthalten waren (s. 3.4).

3.8 CFSE-Färbung

Für einen Teil der T-Zellproliferationsexperimente wurden die Zellen mit dem Fluoreszenzfarbstoff CFSE (5(6)-Carboxyfluorescein-diacetat-N-succinimidylester) gefärbt, der sich bei jeder Teilung der Zellen zu gleichen Teilen auf die Tochterzellen verteilt. Diese Methode besitzt den Vorteil, durch zusätzliches Anfärben der Zellen mit anti-CD4 mAk und Peptid-beladenen MHC II-Tetrameren die Auswertung ausschließlich auf antigenspezifische CD4⁺ T-Zellen zu beschränken und gleichzeitig die Proliferation durch Verdünnung des Farbstoffes zu verfolgen. Mittels der Durchflusszytometrie wurde nach 7 Tagen die Anzahl proliferierter T-Zellen durch Messung der Verdünnung des Farbstoffes bestimmt.

Für die Färbung wurden die Zellen 9 min bei 37° C in 1 ml PBS mit 0,8 µM CFSE gefärbt. Die Färbung wurde durch Zugabe von 4 ml reinem FCS während 2 min bei Raumtemperatur (RT) gestoppt, welches überschüssigen Farbstoff bindet. Nach Zugabe von 6 ml serumfreiem VLE-RPMI 1640 Medium wurden die Zellen abzentrifugiert, in wenig 10 % PHS-Medium aufgenommen, gezählt und auf die gewünschte Zellzahl verdünnt.

3.9 T-Zellproliferationsexperimente

Die mit CFSE markierten bzw. nicht mit CFSE gefärbten Zellen wurden optimalerweise mit autologen, ansonsten mit HLA-kompatiblen APZs in Kultur genommen. Als APZs wurde die Fraktion der „Nicht-CD4⁺ T-Zellen“ (CD4⁺ Isolierung, s. 3.6.2) verwendet. Die Zellen wurden vor ihrer Verwendung als APZs mit einer Strahlungs-dosis von 30 Gy bestrahlt, um die DNA der Zellen so stark zu schädigen, dass eine Proliferation der APZs verhindert wird.

Die gewünschte Zahl an APZs wurde für 2 h bei 37° C mit der gewünschten Konzentration vorinkubierter antigener Peptide bzw. Peptid:Hsp70-Komplexen (s. 3.10) inkubiert. Danach wurden die APZs zusammen mit den CD4⁺ bzw. CD4⁺CD25⁻ T-Zellen in 1000 µl Kulturmedium in 48-Loch Flachbodenplatten bzw. in 200 µl Kulturmedium in 96-Loch Flachbodenplatten für 7 Tage (mit CFSE) bzw. 10 bis 14 Tage (ohne CFSE) im Brutschrank in Kultur genommen (s. 3.4). An Tag 7 (mit CFSE), 10 oder 14 (ohne CFSE) wurden die Zellen aus der Platte entnommen und in FACS-Röhrchen überführt. Es folgte die Färbung mit Fluoreszenz-markiertem anti-CD4 mAk und HLA-DR-Tetrameren (s. 3.12) um zu zeigen, dass nur CD4⁺ T-Zellen proliferieren, bzw. um den Anteil der T-Zellen zu ermitteln, die spezifisch auf das verwendete Antigen reagieren. Die Bindung von anti-CD4 und HLA-DR-Tetrameren sowie ggf. die Verdünnung des CFSE-Farbstoffes in proliferierten Zellen wurden mittels der Durchflusszytometrie (s. 3.13) analysiert. Meist wurden Mehrfachwerte bestimmt, d.h. T-Zellen in mehreren verschiedenen Löchern wurden jeweils unter denselben Kulturbedingungen stimuliert und separat ausgewertet.

Als Negativkontrollen dienten unstimulierte bzw. nur mit Hsp70 stimulierte Proben. Als Positivkontrolle diente in den meisten Experimenten eine mit PHA (Phytohämagglutinin) stimulierte Probe.

3.10 Herstellung der Peptid:Hsp70-Komplexe

Für die Komplexierung der antigenen Peptide mit Hsp70 wurden Peptide und Hsp70 über Nacht bei 37° C vorinkubiert. Die Affinität der verwendeten

antigenen Peptide zu Hsp70 wurde im Europium-Fluoreszenz-Assay gezeigt (Haug et al. 2005). Peptide und Hsp70 für die Stimulation von 1 ml Zellsuspension wurden in einem Volumen von 50 µl vorinkubiert, d.h. 25 µl der vorinkubierten Lösung ergeben in einem Volumen von 1000 µl Zellsuspension die gewünschte Antigenkonzentration für das Experiment. Als Bindungspuffer wurde Hanks buffered saline (HBS) verwendet.

Technisch ist eine Abtrennung der ungebundenen Peptide, z. B. durch Filtration über eine Membran und anschließende genaue Bestimmung der Hsp70-gebundenen Peptidmenge sehr schwierig. Daher wurden ungebundene Peptide nicht von der Peptid:Hsp70-Mischung abgetrennt. Mit steigenden Peptidkonzentrationen liegt dann ein Teil der Peptide an Hsp70 komplexiert vor, aber auch ein immer größerer Anteil an freiem Peptid.

Peptid:Hsp70-Komplexe und Peptid alleine wurden unter denselben Bedingungen vorinkubiert. In vielen Versuchen wurde zusätzlich freies Peptid ohne Vorinkubation eingesetzt, um zu zeigen, dass die Vorinkubation keinen unerwünschten Effekt wie z. B. Zersetzung oder Adsorption an das Reaktionsgefäß auf das Peptid hat.

3.11 HLA-DR-Tetramere

Peptid-beladene rekombinante HLA-DR-Tetramere wurden im Rahmen einer Kooperation von William W. Kwok (Benaroya Research Institute at Virginia Mason, Seattle, USA) erhalten.

MHC II-Tetramere erlauben die Isolation und Charakterisierung humaner antigenspezifischer Zellen (Buckner et al. 2002; Danke et al. 2003; Kwok et al. 2000; Nepom et al. 2002; Novak et al. 1999). Mit dieser Technik können mit einer Sensitivität von 3 in 100.000 (0,003 %) antigenspezifische Zellen dargestellt werden (Danke et al. 2003). Ein weiterer Vorteil der Methode ist, dass anhand der Bindung der MHC II-Tetramere (Fluoreszenz-Intensität) auch Rückschlüsse auf die TZR-Affinität der T-Zellen zum präsentierten Peptid gezogen werden können (Reichstetter et al. 2000).

Diese humanen MHC II-Tetramere bestehen aus rekombinanten HLA-DR-

Molekülen, die mit verschiedenen antigenen Peptiden beladen werden können. Anschließend können durch Inkubation dieser biotinylierten MHC II-Peptid-Komplexe mit Streptavidin-gekoppelten Farbstoffen die fluoreszierenden MHC II-Tetramere gewonnen werden. Diese peptidbeladenen MHC II-Tetramere können mit bis zu vier T-Zellrezeptoren humaner CD4⁺ T-Zellen interagieren, die das antigene Peptid im Kontext mit dem verwendeten HLA-DR-Molekül erkennen (antigenspezifische T-Zellen). Die Zellen können mit der Durchflusszytometrie (s. 3.13) analysiert werden. Abb. 1a zeigt schematisch den Aufbau der rekombinanten HLA-DR-Monomere und die Tetramerisierung mit Streptavidin-Allophycocyanin (SA-APC), Abb. 1b zeigt ein molekulares Modell der kompletten Tetramere.

Die Tetramere wurden bis zur Verwendung bei 4° C im Dunkeln aufbewahrt. Das Peptid HA₃₀₇₋₃₁₉ wurde benutzt, um DRB1*0401/HA₃₀₇₋₃₁₉ Tetramere herzustellen. Als Kontroll-Tetramere wurden leere, also nicht Peptid-beladene DRB1*0401 bzw. DRB1*0404 Tetramere verwendet.

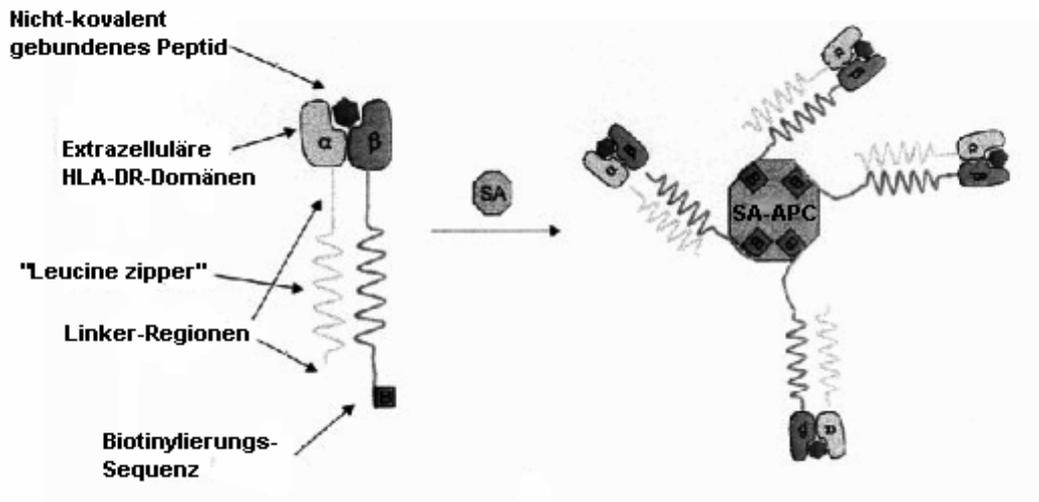
3.12 Färbung von T-Zellen mit Antikörpern und HLA-DR-Tetrameren

3.12.1 Färbung mit Antikörpern

Die zu analysierenden Zellen wurden in FACS-Röhrchen überführt, mit 3 ml PBS mit 2 % FCS gewaschen und bei 1300 rpm während 6 Minuten abzentrifugiert. Der Überstand wurde schwungvoll abgeschüttet und die Zellen in der verbliebenen Flüssigkeit (ca. 50 µl) resuspendiert. 1-5 µl der gewünschten Fluoreszenz-markierten mAk (s. 2.4) wurden zugesetzt und nach kräftigem Rütteln (Vortexen) 10-30 min auf Eis im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit 3 ml Waschpuffer (s. 2.3) gewaschen, zentrifugiert, abgeschüttet, resuspendiert und mittels Durchflusszytometer (FACS, fluorescence activated cell scanner) analysiert (s. 3.13), wobei die Zellen bis zur Messung auf Eis im Dunkeln gehalten wurden. Eventuell erfolgte unmittelbar vor der Analyse die Zugabe von 1 µl Propidiumjodid, um tote Zellen von der Analyse ausschließen zu können. Um unspezifische Wechselwirkungen

zwischen Antikörper und Zelle zu detektieren, wurden als Negativkontrolle Vergleichsfärbungen mit einem Kontrollantikörper gleichen Isotyps durchgeführt. Datenerfassung und -analyse s. 3.13.

a)



b)



Abb. 1:

HLA-Klasse II-Tetramere

a) Schematische Ansicht der löslichen, rekombinanten MHC II- α/β -Dimere mit „leucine zipper“, Linkersequenz, Biotinylierungsstelle und nicht-kovalent gebundenem Peptid. Die Tetramerisierung erfolgt durch die Interaktion mit Fluoreszenz-markiertem Streptavidin-Allophycocyanin (SA-APC).

b) Dreidimensionales Modell eines fertigen Tetramer-Moleküls mit zentralem SA, flexiblen Armen aus Linkern und „leucine-zipper“ sowie den vier MHC:Peptid-Komplexen. Abbildungen modifiziert aus Nepom et al. 2002.

3.12.2 Färbung mit HLA-DR-Tetrameren und Sekundärantikörpern

Die zu analysierenden Zellen wurden in FACS-Röhrchen überführt, mit 10 % PHS-Medium gewaschen, bei 1300 rpm während 6 Minuten abzentrifugiert und der Überstand vollständig abgenommen. Anschließend wurden die Zellen in 50 µl 10 % PHS-Medium resuspendiert und 0,5 µl des gewünschten HLA-DR-Tetramers im Dunkeln zugegeben, was einer Tetramer-Konzentration von ca. 4 µg/ml entspricht. Nach Vortexen und Verschluss der Proben mit Parafilm wurden die Zellen 3 h im Brutschrank bei 37° C inkubiert. Im Anschluss daran wurden die Zellen mit 3 ml kaltem Waschpuffer pro Röhrchen gewaschen und mit 1300 rpm 6 Minuten abzentrifugiert. Anschließend wurde anti-CD4-APC (Allophycocyanin) mAK zugesetzt und die Zellen nach Vortexen weitere 10 bis 30 min auf Eis im Dunkeln inkubiert. Danach wurden die Zellen erneut mit 3 ml Waschpuffer gewaschen, abgeschüttet und in der Restflüssigkeit resuspendiert. Um unspezifische Wechselwirkungen zwischen Tetramer und Zelle zu detektieren, wurden als Negativkontrolle Vergleichsfärbungen mit „leeren“ HLA-DR-Tetrameren (s. 3.11) durchgeführt.

Die Zellen wurden im FACS analysiert, wobei sie bis zur Messung auf Eis im Dunkeln gehalten wurden. Unmittelbar vor der Messung wurde der jeweiligen Probe 1 µl Propidiumjodid zugesetzt (s. 3.12.1). Datenerfassung und -analyse s. 3.13.

3.13 Durchflusszytometrie/FACS-Analyse

Die mittels fluoreszenzmarkierter Antikörper gefärbten Zellen zur Qualitätskontrolle auf Reinheit der CD4⁺ bzw. CD4⁺CD25⁺ Isolierung wurden in einem Durchflusszytometer (fluorescence activated cell scanner, FACS) analysiert, ebenso die Zellen, welche zuvor mit Fluoreszenz-markiertem HLA-kompatiblen Tetramer gefärbt worden waren, um die proliferierten antigenspezifischen CD4⁺ T-Zellen darzustellen. Dabei wurde eine Expressionsanalyse bestimmter Oberflächenmoleküle vorgenommen. Im ersten Fall CD3, CD4 und ggf. CD25, im zweiten Fall wurde überprüft, ob die

proliferierten Zellen CD4⁺ und gleichzeitig Tetramer-positiv, also antigenspezifisch, waren.

Mit Hilfe der Durchflusszytometrie lassen sich Zellpopulationen hinsichtlich ihrer Lichtstreuungs- und Fluoreszenzeigenschaften analysieren. Bei dieser Methode werden Zellen in einem laminaren Probenstrom einzeln an einem (dualen) Laserstrahl vorbeigeleitet. Beim Auftreffen der Strahlen auf die im Probenstrom enthaltenen Bestandteile wird das Licht gestreut. Die entlang der Laserachse abgelenkten Strahlen werden als Maß für die Zellgröße herangezogen und als Vorwärtsstreulicht oder Forwardscatter (FSC) bezeichnet. Als Maß für die Zellgranularität dient das in einem Winkel von 90° abgestrahlte Seitwärtsstreulicht, welches auch als Sidescatter (SSC) bezeichnet wird. Sind die Zellen zusätzlich mit Fluoreszenzfarbstoffen markiert, kann ihre spezifische Fluoreszenz (FL1, FL2, FL3, FL4) und die entsprechende relative Fluoreszenzintensität gemessen werden. Die Fluoreszenzfarbstoffe werden durch das von den Lasern ausgesandte, monochromatische Licht dazu angeregt, Licht einer höheren Wellenlänge zu emittieren (Fluoreszenz). Dieses Licht kann durch ein komplexes optisches System aus Linsen, Spiegeln, Filtern und Detektoren im Durchflusszytometer gebündelt, zerlegt und getrennt detektiert werden. Für jeden unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoff bekommt man somit ein spezifisches Signal. Die gemessenen Fluoreszenzintensitäten lassen dabei z. B. Rückschlüsse auf den Expressionsgrad ausgewählter Oberflächenmoleküle einzelner Zellpopulationen zu. Vorteile gegenüber anderen Methoden zur Zellcharakterisierung sind darin zu sehen, dass innerhalb kürzester Zeit Tausende von Zellen analysiert und dabei verschiedenste Parameter einer jeden Zelle gleichzeitig erfasst werden können. Das in dieser Arbeit verwendete Durchflusszytometer ist mit einem Argonionenlaser (488 nm) und einem Helium-Neon-Laser (633 nm) ausgestattet und ermöglicht die gleichzeitige Analyse von bis zu vier Fluoreszenzfarbstoffen mit unterschiedlichen Emissionsspektren. Als Fluoreszenzfarbstoffe wurden FITC (Fluoresceinisothiocyanat), CFSE, PE (Phycoerythrin), PerCP (Peridin-Chlorophyllprotein) und APC (Allophycocyanin) verwendet. Falsch positive Signale aufgrund von überlappenden

Emissionsspektren der verschiedenen Fluorochrome wurden durch eine geeignete Kompensation ausgeschlossen. Für die Kompensationseinstellungen wurden Zellen verwendet, die nur mit einem einzigen fluoreszenzmarkierten mAk markiert waren. Zur Detektion unspezifischer Bindungen der Antikörper z. B. an Fc-Rezeptoren, wurden geeignete Isotypkontrollen mit gleichem Isotyp wie die verwendeten spezifischen Antikörper mitgeführt.

Die Quantifizierung der Fluoreszenz- und Streulichtemissionen von 10.000 bis 450.000 Zellen je Probe wurden gespeichert.

Die Datenerfassung und -analyse wurde mittels der Software CellQuest und CellQuest Pro durchgeführt. Die Zunahme der Anzahl antigenspezifischer CD4⁺ T-Zellen bzw. die Hsp70-vermittelte Proliferationsverstärkung wurde anhand der vorliegenden Ergebnisse willkürlich definiert als eine relative Zunahme um mindestens 10 %, die Abnahme der Anzahl antigenspezifischer CD4⁺ T-Zellen bzw. die Hsp70-vermittelte Proliferationsabschwächung wurde definiert als eine relative Abnahme um mindestens 10 %. Die Detektion antigenspezifischer Zellen mit Tetrameren ist sehr sensitiv, dennoch kann bei sehr geringen Zellzahlen bzw. sehr wenigen Tetramer-positiven Ereignissen nicht sicher gesagt werden, ob es sich nur um Hintergrund/falsch positive Ereignisse handelt. Daher wurden weniger als 0,1 % Tetramer-positive Zellen nicht als Tetramer-positive Population gewertet. Die Anordnung der Zellpopulation in den Dotplots der FACS-Auswertung fließt in die Interpretation mit ein, z. B. muss eine eindeutig abgrenzbare Population erkennbar sein.

3.14 Cytokine Secretion Assay (CSA)

Der Cytokine Secretion Assay ermöglicht die Untersuchung der Zytokinproduktion vitaler Zellen mittels FACS (Funktionsprinzip s. Abb. 2). Da gleichzeitig eine HLA-DR-Tetramerfärbung vorgenommen werden kann, erlaubt dies die direkte Betrachtung der Zytokinproduktion antigenspezifischer Zellen.

Das in dieser Arbeit mit dem Cytokine Secretion Assay untersuchte Zytokin IFN- γ wird vor allem von aktivierten CD4⁺ und CD8⁺ Gedächtnis- und Effektor-T-Zellen sowie von NK-Zellen produziert und sezerniert. Hier wurden die Zytokin-

produzierenden antigenspezifischen CD4⁺ T-Zellen analysiert. Zunächst wurden CD4⁺ T-Zellen mit Peptid bzw. Peptid:Hsp70-Komplex stimuliert (s. 3.4). Nach der ersten Inkubationszeit (s. 3.4) wurden die T-Zellen restimuliert. Im Anschluss an die zweite Inkubationsperiode (insgesamt 20 bis 28 Tage) wurde der IFN- γ -Cytokine Secretion Assay nach der dem Kit beiliegenden Anleitung durchgeführt. Dazu wurden die CD4⁺ T-Zellen mit jeweils 1 μ l HLA-DR-Tetramer, 1 μ l HLA-DR-Kontrolltetramer (Negativkontrolle), 1 μ l anti-CD3 + 1 μ l anti-CD28 (Positivkontrolle nicht-antigenspezifischer Zellen) pro Probe 3 h im Brutschrank bei 37° C stimuliert. Danach wurden die Proben mit 5 ml kaltem CSA-Puffer (s. 2.3) pro Probe gewaschen, in der vorgekühlten Zentrifuge bei 4° C 8 min bei 1400 rpm abzentrifugiert und abgesaugt. Jetzt wurde das Catch-Reagenz auf die Proben gegeben, welches einen

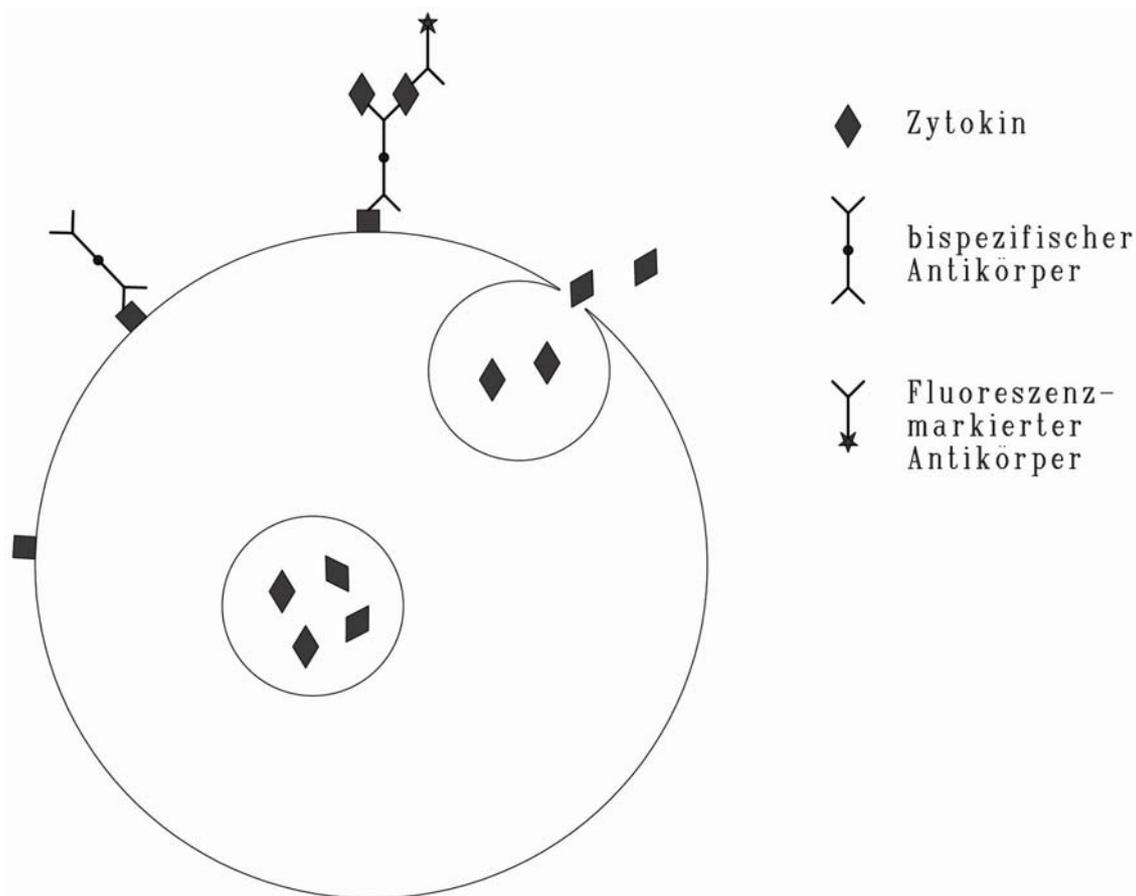


Abb. 2:
Funktionsprinzip der Antikörper im Cytokine Secretion Assay:
Der bispezifische Capture-Antikörper bindet über CD45 an die Zelle und an das entsprechende Zytokin, der fluoreszenzmarkierte Detektions-Antikörper bindet an das Zytokin und ermöglicht die FACS-Analyse.

bispezifischen Capture-Antikörper enthält, der über CD45 (Herstellerangabe) an die Zelle und an das entsprechende Zytokin bindet, welches während der Sekretionsphase sezerniert wird. Es folgte eine Inkubation von 10 min auf Eis im Dunkeln. Dann wurden 10 ml 37° C warmen Mediums (s. 2.7) mit 5 % PHS in jedes Röhrchen gegeben, daraufhin folgte die Zytokin-Sekretionsphase von 45 min im Brutschrank bei 37° C unter ständiger Bewegung der Flüssigkeit in dem Rotiergerät MACSmix™ Tube Rotator. In dieser Zeit schüttet die Zelle Zytokine aus. Wichtig ist dabei, dass die Zellen in Bewegung bleiben und nicht zu dicht sind, damit die sezernierten Zytokine nicht von daneben liegenden Zellen aufgefangen werden. Danach wurden die Proben in der vorgekühlten Zentrifuge bei 4° C mit 1300 rpm während 6 min abzentrifugiert und abgesaugt. Nachdem jede Probe mit 10 ml kaltem CSA-Puffer gewaschen und erneut bei 4° C abzentrifugiert worden war, erfolgte die Zugabe des fluoreszenzmarkierten Detektions-Antikörpers, welcher an das Zytokin bindet und so die FACS-Analyse ermöglicht. Nach 30 min Inkubation auf Eis im Dunkeln wurden die Proben mit Waschpuffer (s. 2.3) gewaschen, in der vorgekühlten Zentrifuge bei 4° C abzentrifugiert und im FACS gemessen.

3.15 Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Der Enzyme-linked Immunosorbent Assay ist ein sehr empfindliches immunologisches Nachweisverfahren, das auf einer enzymatischen Farbreaktion basiert. Mittels einer Antigen-Antikörper-Reaktion können einzelne Proteine (Antigene) nachgewiesen werden. Hierbei macht man sich die Eigenschaft spezifischer Antikörper zu Nutze, die an das nachzuweisende Antigen binden. Antikörper oder Antigen werden zuvor mit einem Enzym markiert. Die durch das Enzym katalysierte Reaktion dient als Nachweis für das Vorhandensein des Antigens.

Zunächst wird ein Capture-Antikörper auf ein Trägermedium gebunden, welcher an das in der Probe nachzuweisende Antigen bindet. Danach wird ein Detektions-Antikörper zugegeben, an den ein Enzym (z. B. Meerrettichperoxidase) gebunden ist. Dieser Antikörper-Enzymkomplex bindet

ebenfalls an das Antigen. Danach wird ein Chromogen (Farbstoff bildender Stoff) hinzugefügt, woraufhin eine von dem Enzym gesteuerte Reaktion ausgelöst wird, die zu einem sichtbaren Farbumschlag führt (Funktionsprinzip s. Abb. 3). Die Farbintensität ist dabei proportional der Menge des nachzuweisenden Antigens in der Probe. Nachteil gegenüber dem CSA (s. 3.14) ist, dass nur der gesamte Zytokingehalt im Überstand der Probe gemessen werden kann und nicht die Zytokin-Produktion der einzelnen antigenspezifischen Zellen.

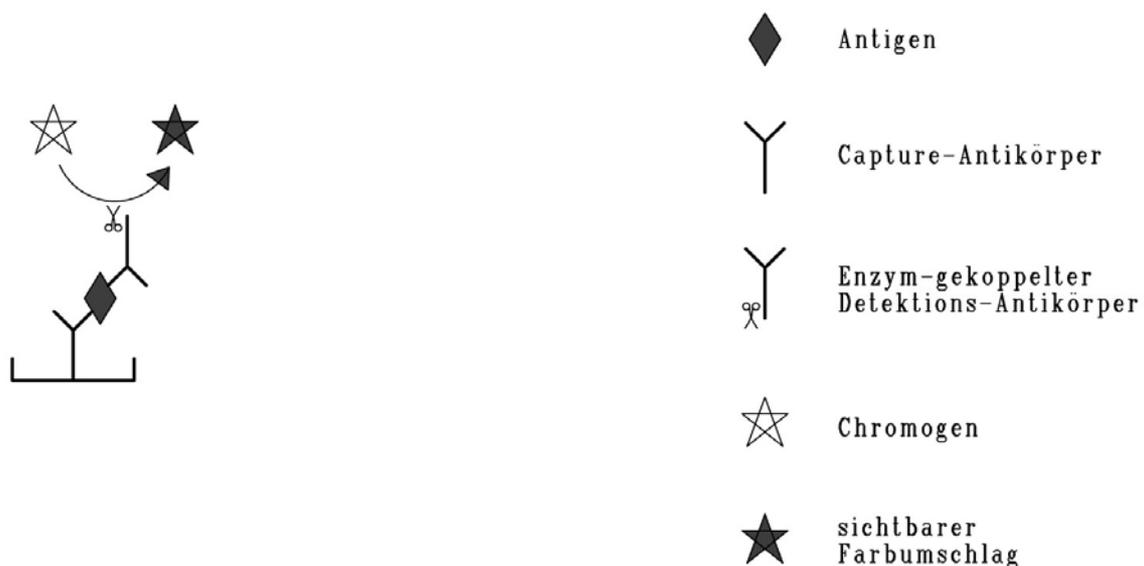


Abb. 3:
Funktionsprinzip des Enzyme-linked Immunosorbent Assay:
Erläuterung siehe Text.

Es wurde der IFN- γ und IL-5 Zytokingehalt der Proben analysiert. Dazu wurden die zu einem früheren Zeitpunkt abgenommenen und tiefgekühlten Überstände (s. 3.7.3) mit Hilfe des humanen OptiEIA IFN- γ ELISA Sets sowie einem IL-5 ELISA Antikörperpaar (monoklonaler anti-human/mouse IL-5 Antikörper plus polyklonaler biotinmarkierter anti-human IL-5 Antikörper (s. 2.3)) untersucht. Dazu wurden zunächst für den IFN- γ -ELISA 42 μ l Capture-Antikörper (keine Herstellerangabe der Antikörper-Konzentration vorhanden) in 10,5 ml Coating-Puffer (s. 2.3) gegeben, für den IL-5-ELISA 22 μ l Capture-Antikörper (monoklonaler anti-human/mouse IL-5 Antikörper 0,5 μ g/ml) in 11 ml PBS. Davon wurden jeweils 100 μ l pro Loch auf jeweils eine 96-Loch „maxi sorp“

Platte gebunden. Die beiden Platten wurden mit Parafilm versiegelt und bei 4° C auf dem Schüttelgerät über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Platten mit PBS gewaschen und anschließend 2 h mit IFN- γ -Diluent bzw. IL-5-Diluent (s. 2.3) als Blockierungslösung auf dem Schüttelgerät bei Raumtemperatur (RT) inkubiert. Nach mehreren Waschgängen mit ELISA-Waschpuffer (s. 2.3) wurden die vorbereiteten Zytokin-Standards zur Ermittlung einer Eichkurve sowie die Proben in die Plattenlöcher pipettiert, woraufhin eine erneute Inkubation von 2 h bei RT auf dem Schüttler folgte. Nach erneuten wiederholten Waschgängen wurde der jeweilige Detektions-Antikörper (42 μ l IFN- γ -Detektions-Antikörper (keine Herstellerangabe der Antikörperkonzentration vorhanden) + 10,5 ml IFN- γ -Diluent, 22 μ l IL-5-Detektions-Antikörper (polyklonaler biotinmarkierter anti-human IL-5 Antikörper 2 μ g/ml) + 11 ml IL-5-Diluent, davon jeweils 100 μ l pro Loch) in die entsprechenden Plattenlöcher gegeben und bei 4° C auf dem Schüttelgerät über Nacht inkubiert. Am Folgetag wurde nach mehreren Waschgängen IFN- γ -Diluent bzw. IL-5-Diluent jeweils auf die entsprechende Platte, Streptavidin im Anschluss auf beide Platten gegeben und 1 h bei RT auf dem Schüttelgerät inkubiert. Nach mehreren Waschgängen wurden 11 ml Peroxidase-Substrat und 11 ml Wasserstoffperoxid-Lösung (s. 2.3: Substrate Kit TMB) gemischt, davon 100 μ l pro Loch auf beide Platten gegeben und 30 min bei RT auf dem Schüttelgerät inkubiert. Im Anschluss daran kam in jedes Plattenloch Stopp-Lösung (s. 2.3) und es folgte die Messung in einem ELISA-Reader mittels der Software SOFTmax Pro 3.0. Es wurden jeweils Dreifachbestimmungen vorgenommen. Bei einer Wellenlänge von 450 nm wurde die Absorption gemessen; die Referenzwellenlänge von 570 nm diente als Background und wurde subtrahiert. Die Blank-Werte (nur Puffer) wurden anschließend = 0 gesetzt und dann die Eichreihe berechnet.

Die Auswertung der Ergebnisse des ELISAs erfolgte mit der Software GraphPad Prism 4.0.

4. Ergebnisse

4.1 Nachweis antigenspezifischer CD4⁺ T-Zellen mittels HLA-DR-Tetramerfärbung

Um die Aktivierung CD4⁺ und antigenspezifischer T_H-Gedächtniszellen zu zeigen, wurden aus dem peripheren Blut der Donoren (s. 4.5) zunächst PBMCs und daraus CD4⁺ bzw. CD4⁺CD25⁻ T-Zellen isoliert (s. 3.2 und 3.6) und ggf. mit CFSE gefärbt (s. 3.8). Zusätzlich zur Untersuchung der Antigenpezifität mittels HLA-DR-Tetramerfärbung erfolgte die Untersuchung auf die Expression des T-Zell Ko-Rezeptors CD4. Um herauszufinden, ob und wie viele der proliferierten CD4⁺ T-Zellen tatsächlich spezifisch auf das verwendete Antigen reagieren, wurden CD4⁺ T-Zellen mit Peptiden stimuliert, CFSE gefärbte Zellen für 7 Tage und nicht CFSE gefärbte Zellen für 10 bis 14 Tage in Kultur genommen (s. 3.4). Die Kulturdauer von 10 bis 14 Tagen für nicht CFSE gefärbte Zellen wurde gewählt, um eine optimale Zunahme der Zahl antigenspezifischer Zellen zu erreichen. Bei CFSE gefärbten Zellen war die optimale Kulturdauer 7 Tage, da in diesem Zeitraum eine ausreichende Proliferation der Zellen zu beobachten ist und der zytotoxische Einfluss des Farbstoffes noch nicht zur Wirkung kommt (s. 4.3).

Anschließend wurden die Zellen mit HLA-DR-Tetrameren gefärbt, die mit dem entsprechenden antigenen Peptid beladen waren (s. 3.11). Die Färbung mit Tetrameren ergibt beste Ergebnisse bei ruhenden Zellen, was nach einer Kultur von 10 - 14 Tagen gegeben ist. Bei aktivierten Zellen besteht die Möglichkeit, dass T-Zell-Rezeptoren aufgrund der Peptid-Aktivierung internalisiert sind, weshalb eine zu frühe Tetramerfärbung nicht Erfolg versprechend wäre (Novak et al. 2001, Macaubas et al. 2006). Zusätzlich erfolgte eine Färbung mit anti-CD4 mAK sowie Propidiumjodid (s. 3.12). Die so gefärbten Zellen wurden dann im FACS analysiert (s. 3.13).

Bei der Auswertung wurde die Darstellung durch Begrenzungen im FSC/SSC-Diagramm auf Lymphozyten, im anti-CD4-APC/SSC-Diagramm auf CD4-positive T-Lymphozyten und im Tetramer-PE/FSC-Diagramm eingeschränkt.

Tote Zellen wurden mittels Propidiumjodid ausgeschlossen (doppelt positive Zellen im FL2/FL3-Diagramm). Dies ist in Abb. 4 als Beispiel anhand von CD4⁺CD25⁻ T-Zellen eines HLA-DRB1*0401-positiven Donors veranschaulicht.

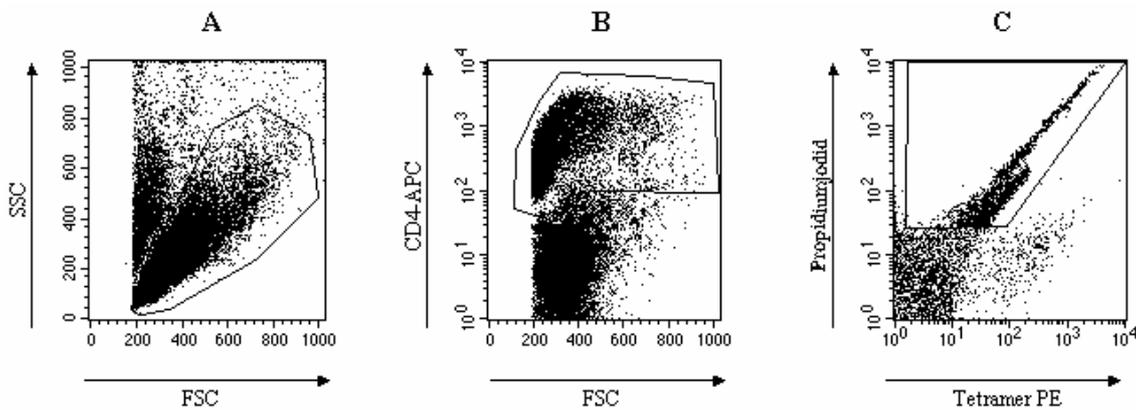


Abb. 4:
 CD4⁺CD25⁻ T-Zellen eines HLA-DRB1*0401-positiven Donors.
 Begrenzung im FSC/SSC-Diagramm (A) auf Lymphozyten, im CD4-APC/FSC-Diagramm (B) auf CD4-positive T-Lymphozyten und Ausschluss toter Zellen mittels Propidiumjodid: doppelt positive Zellen im Propidiumjodid/Tetramer-PE-Diagramm (C).

Abb. 5 zeigt beispielhaft die FACS-Analyse von T-Zellen eines HLA-DRB1*0401-positiven Donors. Die Zellen wurden mit antigenen Peptiden aus dem Autoantigen Glutamic Acid Decarboxylase 65₅₅₅₋₅₆₇ (GAD65₅₅₅₋₅₆₇), NY-ESO1₁₂₂₋₁₃₃ (Tumorantigen), Influenza-Protein Hämagglutinin (HA₃₀₇₋₃₁₉) und Präproinsulin₇₃₋₉₀ (PPI₇₃₋₉₀, Teilsequenz aus dem C-Peptid p73-90 mit Substitution von Serin anstatt Lysin in Position 88 für bessere HLA-DRB1*0401-Bindung) stimuliert. Die Stimulation wurde auch mit Komplexen aus Peptid und Hsp70, sowie mit Hsp70 allein als Negativkontrolle durchgeführt. Durch die Färbung mit Peptid-beladenen HLA-DR-Tetrameren und anti-CD4 mAK kann die Auswertung des Versuches auf die antigenspezifischen Zellen beschränkt werden (s. 3.12 und 3.13). Bei stimulierten Zellen nimmt die Zahl der antigenspezifischen CD4⁺ T-Zellen zu, wohingegen unstimulierte Zellen (Negativkontrollen) kaum Antigen-spezifität zeigen. In den meisten Experimenten wurde bei unstimulierten Proben weniger als 1 % CD4⁺ T-Zell-Tetramerbindung gemessen.

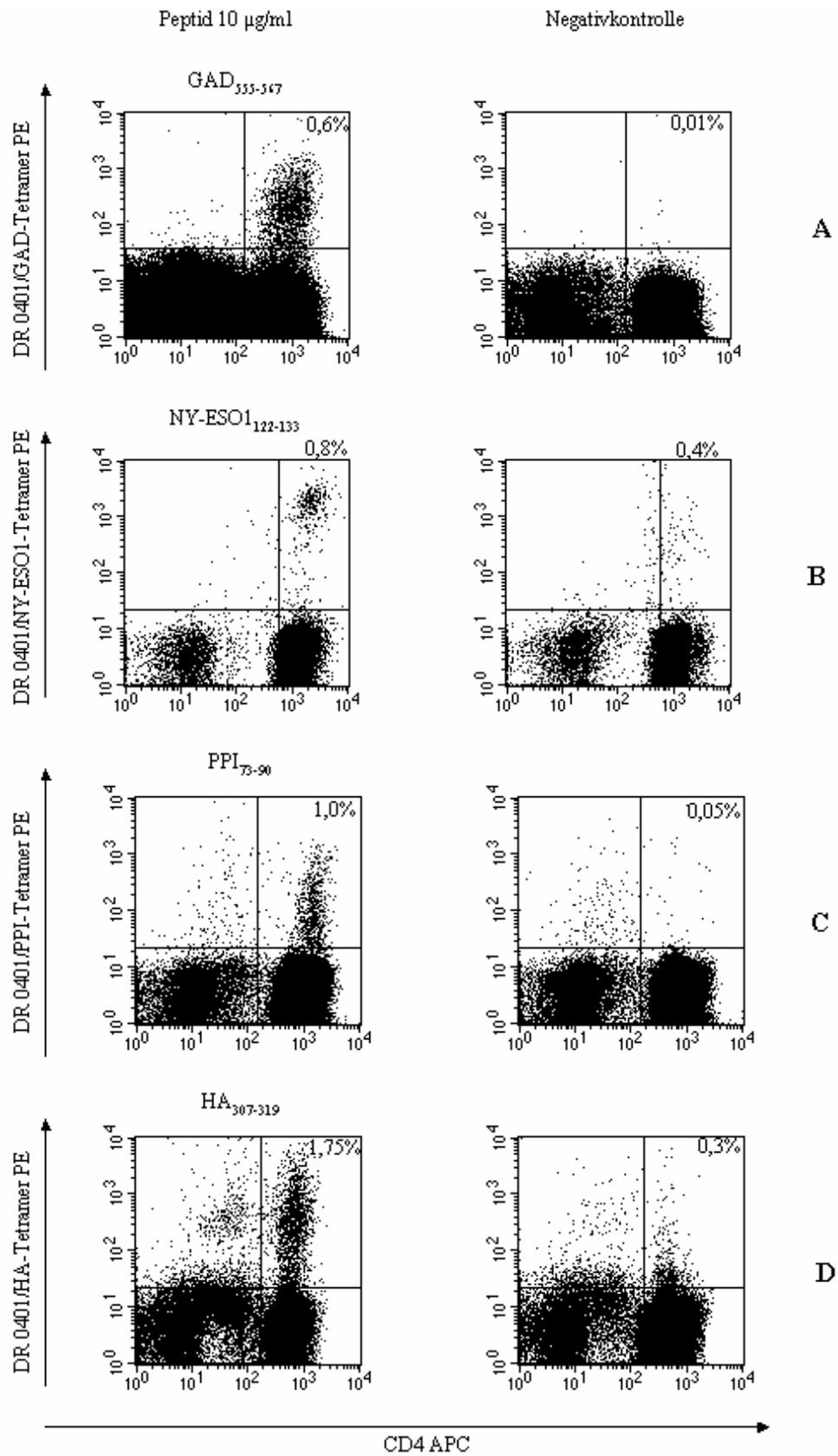


Abb. 5: Tetramerfärbung von T-Zellen eines HLA-DRB1*0401-positiven Donors. (A)

Stimulation GAD65⁵⁵⁵⁻⁵⁶⁷, (B) Stimulation NY-ESO1¹²²⁻¹³³, (C) Stimulation PPI⁷³⁻⁹⁰, (D) Stimulation HA³⁰⁷⁻³¹⁹. Die Peptid-Konzentration zur Stimulation beträgt 10 µg/ml Peptid. $1,5 \times 10^6$ CD4⁺CD25⁻ T-Zellen (A) bzw. CD4⁺ T-Zellen (B-D) wurden mit $1,5 \times 10^6$ APZs stimuliert. Die Zellen wurden mit anti-CD4-APC mAk und HLA-DRB1*0401 Tetramer-PE gefärbt, der mit dem entsprechenden Peptid beladen war (s. 3.12). Die Antigenpezifität und die Expression des T-Zell Korezeptors CD4 wurden im FACS analysiert und als Punktediagramm dargestellt, wobei jeder Punkt im Diagramm einer analysierten Zelle entspricht (s. 3.13). Antigen spezifische CD4⁺ T-Zellen werden im oberen rechten Quadranten der Punktediagramme gefunden, da sie Tetramer-positiv (y-Achse) und CD4-positiv (x-Achse) sind (Tetramer⁺CD4⁺-Zellen). Als Negativkontrollen (rechte Spalte) wurden Zellen ohne Stimulus untersucht, außer (D), hier wurde mit einem leeren HLA-kompatiblen Kontrolltetramer gefärbt.

4.2 Proliferationsmessungen antigenspezifischer CD4⁺ T-Zellen mittels Verdünnung des Farbstoffes CFSE

Bei T-Zellproliferationsexperimenten, bei denen die Anzahl proliferierter T-Zellen und die Antigenpezifität gezeigt werden sollten, wurden die Zellen mit dem Fluoreszenzfarbstoff CFSE (5(6)-Carboxyfluorescein-diacetat-N-succinimidylester) gefärbt. Dieser verteilt sich bei jeder Teilung der Zellen zu gleichen Teilen auf die Tochterzellen (s. 3.8). Diese Methode besitzt den Vorteil, durch zusätzliches Anfärben der Zellen mit anti-CD4 mAk und Peptid-beladenen MHC II-Tetrameren die Auswertung ausschließlich auf antigenspezifische CD4⁺ T-Zellen zu beschränken und gleichzeitig die Proliferation durch Verdünnung des Farbstoffes zu verfolgen. Mittels der Durchflusszytometrie wurde nach 7 Tagen die Anzahl proliferierter T-Zellen durch Messung der Verdünnung des Farbstoffes bestimmt, wobei die Proliferation während der gesamten Stimulation berücksichtigt wird. Da sich der CFSE-Farbstoff bei jeder Teilung zu gleichen Teilen auf die Tochterzellen verteilt, lässt sich die Anzahl der Zellteilungen durch die folgende Formel errechnen: $x:2n$, wobei x die Anzahl der Zellen nach der Teilung und n die Anzahl der Teilungen ist. So kann die Anzahl der Ausgangszellen abgeschätzt werden.

CFSE kann auch zytotoxisch wirken. In unseren Experimenten sahen die CFSE gefärbten Zellen nach einer längeren Inkubationszeit als 7 Tage im FACS sowie nach Färbung mit Trypanblau (s. 3.3) häufig nicht mehr vital aus, weshalb der

Analysezeitpunkt auf Tag 7 festgelegt wurde. In diesem Zeitraum war eine ausreichende Proliferation der Zellen zu beobachten und es wurde die größte Anzahl vitaler antigenspezifischer Zellen detektiert.

In Abbildung 6 ist beispielhaft das CFSE-FACS-Bild der CD4⁺ T-Zellproliferation eines HLA-DRB1*0401-positiven Individuums mit dem antigenen Peptid PPI₇₃₋₉₀ dargestellt, wobei CFSE-Färbung und CD4-APC-Färbung sowie Tetramer-Färbung miteinander verglichen werden. Es handelt sich um den gleichen Versuch mit zwei unterschiedlichen Auswertungsmethoden. Bei beiden Methoden zeigt sich inhaltlich das gleiche Resultat. Die Auswertung der Zellen wurde auf lebende CD4⁺ Zellen begrenzt. Im oberen linken Quadranten befindet sich dabei der Anteil antigenspezifischer CD4⁺ Zellen (Tetramer⁺), die durch Zellteilung den Farbstoff CFSE abgegeben haben (CFSE^{low}). Unstimulierte Zellen (Negativkontrollen) zeigen kaum Proliferation (0,1 % CFSE, 0,05 % CD4-APC) wohingegen PPI₇₃₋₉₀-Stimulation zu einer Proliferation antigenspezifischer Zellen führt (1,3 % CFSE, 1,0 % CD4-APC).

Anhand der CFSE-Versuche wurden die Proliferation und gleichzeitig die Antigenpezifität der autoreaktiven CD4⁺ T-Zellen gezeigt. Aufgrund der Zelltoxizität von CFSE wurde bei mehreren Versuchen auf die CFSE-Färbung verzichtet. In diesen Versuchen wurde dann die Gesamtzahl an lebenden antigenspezifischen T-Zellen ausgewertet, ohne dass direkte Aussagen über die Proliferation oder die Anzahl der Zellteilungen getroffen werden konnten. Wie oben dargestellt, sind allerdings die Ergebnisse der CFSE-/Tetramer-Färbung und der CD4-/Tetramer-Färbung vergleichbar, so dass in den übrigen gezeigten Ergebnissen ohne CFSE-Färbung davon ausgegangen wird, dass Tetramer-positive Zellen gleichzeitig proliferierte Zellen sind.

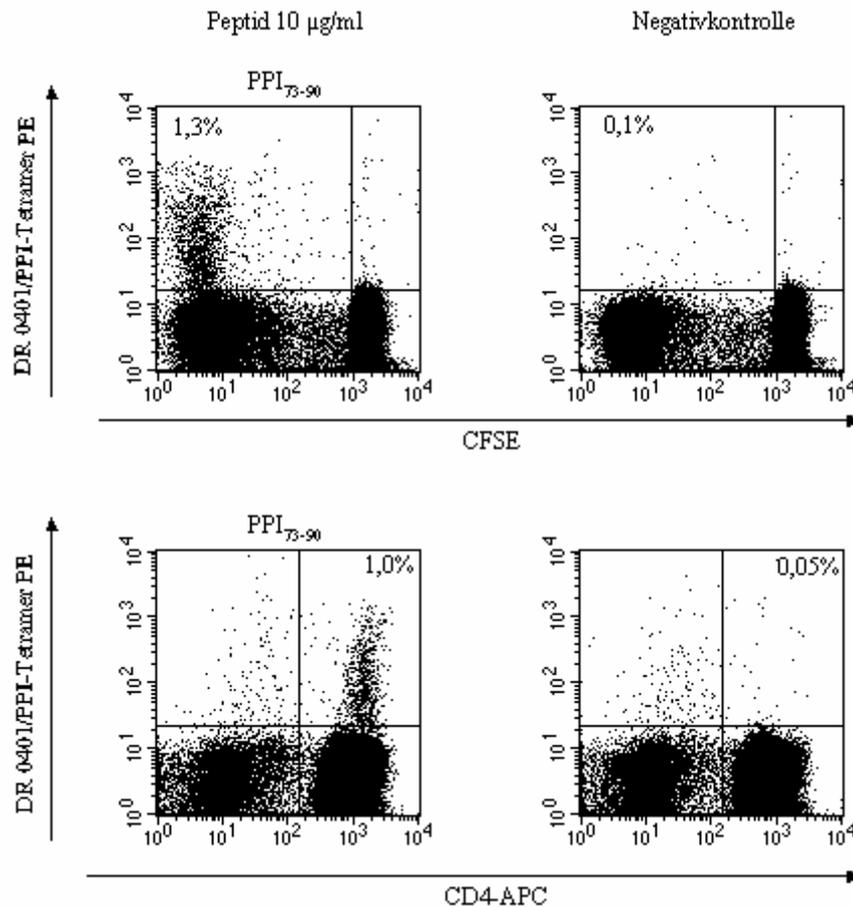


Abb. 6:

CD4⁺ T-Zellen eines HLA-DRB1*0401-positiven Donors. In der oberen Reihe sind CFSE und Tetramer-Färbung gegeneinander aufgetragen, in der unteren Reihe CD4-APC und Tetramer-Färbung. Die Peptid-Konzentration zur Stimulation beträgt 10 µg/ml PPI₇₃₋₉₀-Peptid. 1,5x10⁶ CFSE-gefärbte CD4⁺ T-Zellen mit 1,5x10⁶ APZs wurden stimuliert, die Analyse erfolgte nach 7 Tagen in Kultur (s. 3.4). Die Zellen wurden mit anti-CD4-APC mAk und HLA-DRB1*0401 PPI₇₃₋₉₀-Tetramer-PE gefärbt (s. 3.12). Die Proliferation sowie die Antigen-spezifität wurden im FACS analysiert (s. 3.13).

In der oberen Reihe werden proliferierte CD4⁺ PPI₇₃₋₉₀-spezifische T-Zellen im oberen linken Quadranten der Punktediagramme gefunden (es wurde auf CD4⁺ lebende Zellen begrenzt), da sie den Farbstoff CFSE (x-Achse) verlieren und Tetramer-positiv (antigen-spezifisch) (y-Achse) sind (Tetramer⁺CFSE^{low}-Zellen).

In der unteren Reihe ist auf der x-Achse CD4-APC aufgetragen, auf der y-Achse die Tetramer-Färbung. Hier werden CD4⁺ antigen-spezifische T-Zellen im oberen rechten Quadranten gefunden.

Als Negativkontrollen (rechte Spalte) wurden Zellen ohne Stimulus untersucht.

4.3 Zellzahlverhältnis und Peptidkonzentration

Die Versuche zur Reaktivität der Donoren auf die verschiedenen antigenen

Peptide wurden mit einer definierten Zahl isolierter $CD4^+$ T-Zellen bzw. $CD4^+CD25^-$ T-Zellen, APZs und einer definierten Peptidkonzentration durchgeführt, da im Vorfeld festgestellt wurde, dass die Zahl der APZs und die Antigen-Konzentration einen Einfluss auf die T-Zellproliferation haben (Haug et al. 2005).

Um den Einfluss unterschiedlicher Zellzahlverhältnisse von APZ: $CD4^+$ T-Zellen zu untersuchen, wurden isolierte $CD4^+$ T-Zellen mit unterschiedlichen APZ-Zahlen (APZ: $CD4^+$ T-Zellen = 0:1, 0,1:1, 0,2:1 und 1:1) sowie verschiedenen Peptidkonzentrationen (10 $\mu\text{g/ml}$, 1 $\mu\text{g/ml}$ und 0,1 $\mu\text{g/ml}$) stimuliert. Diese Versuche wurden in einer 96-Loch Flachbodenplatte (200 μl Gesamtvolumen) durchgeführt. Als Negativkontrollen wurde ein Loch ohne APZs, eines nur mit Hsp70 und eines ohne Peptid stimuliert. Die größte Zunahme der Zahl antigenspezifischer $CD4^+$ T-Zellen wurde bei einer Peptidkonzentration von 10 $\mu\text{g/ml}$ Peptid in Kombination mit einem Verhältnis von APZ: $CD4^+$ T-Zellen = 1:1 ($3 \times 10^5:3 \times 10^5$) pro Loch gefunden (s. Abb. 7 und 8). Exemplarisch wird in Abb. 7 ein Versuch von mehreren durchgeführten Versuchen mit ähnlichen Ergebnissen gezeigt, der die Veränderungen der Zahl antigenspezifischer $CD4^+$ T-Zellen durch ein unterschiedliches Zellzahlverhältnis und unterschiedliche Peptidkonzentrationen veranschaulicht. Dies wird in Abb. 8 mit den Daten aller verwertbaren entsprechenden Versuche graphisch demonstriert.

Bei der üblicherweise eingesetzten Zellzahl von $1,5 \times 10^6$ pro Loch wurde ein Zellzahlverhältnis von APZ: $CD4^+$ T-Zellen bzw. $CD4^+CD25^-$ T-Zellen = 1:1 ($1,5 \times 10^6:1,5 \times 10^6$) pro Loch in einer 48-Loch Flachbodenplatte (1000 μl Gesamtvolumen) sowie eine Peptidkonzentration von 10 $\mu\text{g/ml}$ als geeignet gewählt.

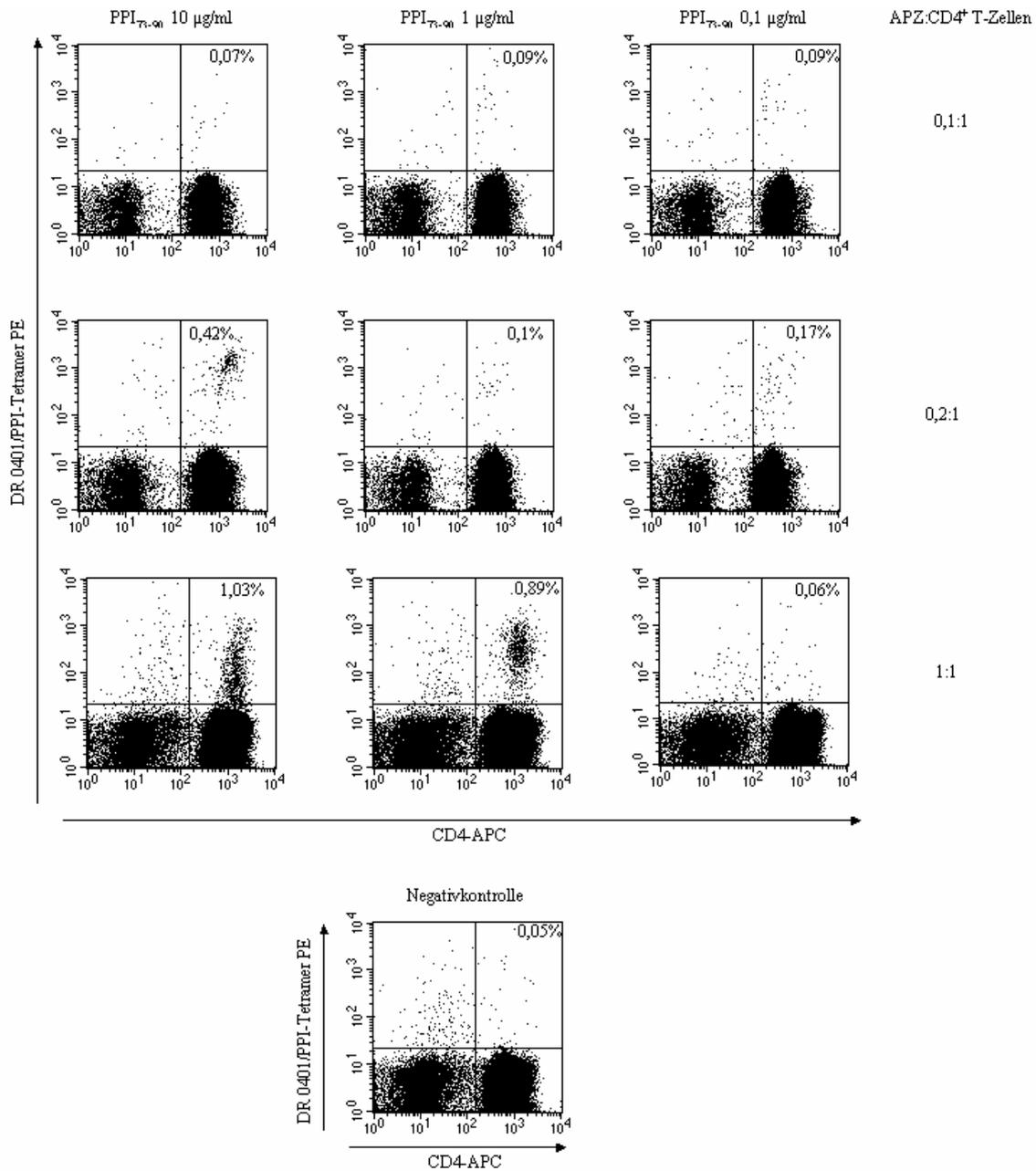


Abb. 7:

Tetramerfärbung CD4⁺ T-Zellen eines HLA-DRB1*0401-positiven Donors. Die verschiedenen PPI₇₃₋₉₀-Peptidkonzentrationen sind 10 µg/ml (linke Spalte), 1 µg/ml (mittlere Spalte) und 0,1 µg/ml (rechte Spalte). 3×10^5 CD4⁺ T-Zellen mit unterschiedlicher Anzahl von APZs (APZ:CD4⁺ T-Zellen = 0,1:1 in der ersten Reihe, 0,2:1 in der zweiten Reihe und 1:1 in der dritten Reihe) wurden mit CFSE gefärbt und stimuliert, die Analyse erfolgte nach 7 Tagen in Kultur (s. 3.4). Die Zellen wurden mit anti-CD4-APC mAk und HLA-DRB1*0401 PPI₇₃₋₉₀-Tetramer-PE gefärbt (s. 3.12). Als Negativkontrolle wurden Zellen ohne Stimulus mit dem gleichen Tetramer untersucht. Übrige Angaben wie in Abb. 5.

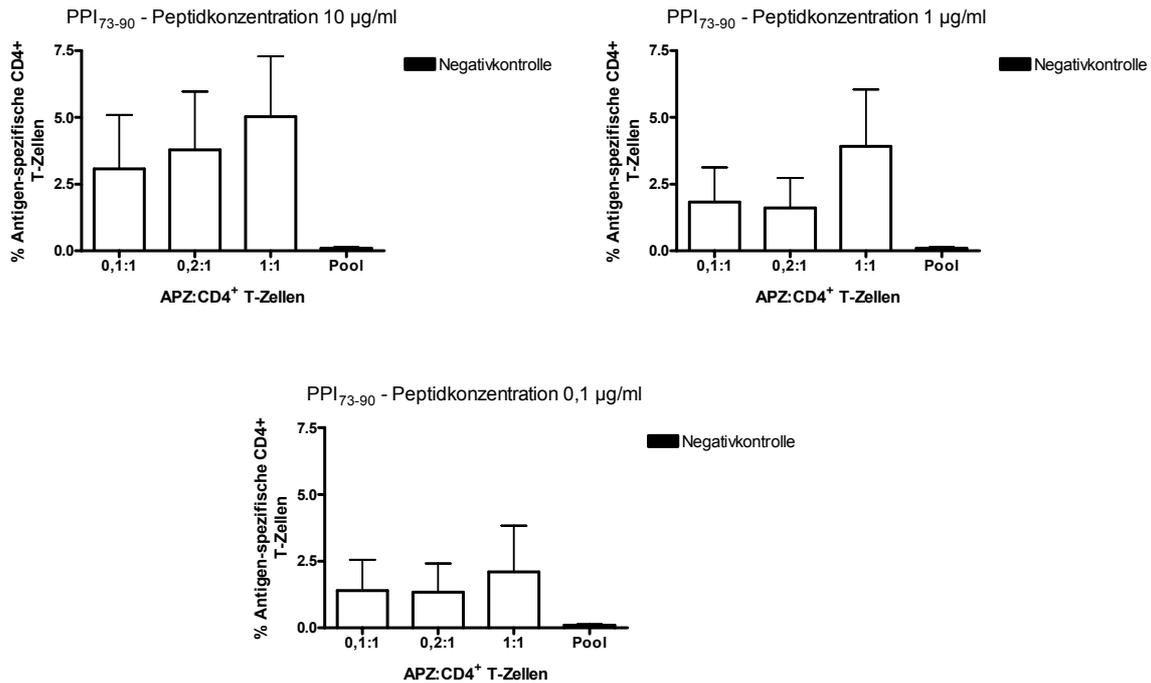


Abb. 8:

Prozentzahl antigenspezifischer CD4⁺ T-Zellen in CD4⁺ T-Zell-Kulturen nach *in vitro* Stimulation mit drei verschiedenen PPI₇₃₋₉₀-Peptidkonzentrationen. Insgesamt sind 3 Versuche mit Zellen von zwei verschiedenen HLA-DRB1*0401-positiven Donoren dargestellt. Das Zellzahlverhältnis APZ:CD4⁺ T-Zellen wurde variiert (x-Achse 0,01:1-1:1). Durch Peptidkonzentration und Zellzahlverhältnis beeinflusste Unterschiede der Anzahl antigenspezifischer CD4⁺ T-Zellen sind auf der y-Achse aufgetragen. Als Negativkontrolle ist ein Pool aus allen Löchern gezeigt, analysiert mit einem leeren HLA-kompatiblen Kontrolltetramer.

4.4 Peptidreaktivität verschiedener Donoren

Von allen ausgewählten Donoren wurde zunächst getestet, auf welche antigene Peptide sie reaktive T_H-Gedächtniszellen besitzen. Die Auswahl gesunder, HLA-typisierter Donoren erfolgte wie in 3.1 beschrieben. Es wurden Donoren mit den HLA-Typen HLA-DRB1*0401 und HLA-DRB1*0404 ausgewählt, weil diese als reaktiv auf die verwendeten Peptide vorbeschrieben sind und das Epitop in die Bindungsstelle dieser HLA-Typen passt (Reijonen et al. 1999, Mandic et al. 2003, Haug et al. 2005, Yang et al. 2008, Gebe et al. 2006). Zu dieser Untersuchung wurden, wie in 3.6.2 und 3.6.3 beschrieben, isolierte CD4⁺ T-Zellen bzw. CD4⁺CD25⁻ T-Zellen mit bzw. ohne CFSE-Färbung 7 bzw. 10 bis 14 Tage in Kultur genommen (1,5x10⁶ T-Zellen:1,5x10⁶ APZs/Loch, 48-Loch

Flachbodenplatte) (s.3.4). Zur Stimulation der CD4⁺ T_H-Gedächtniszellen aus dem peripheren Blut der Donoren wurden in den T-Zell-Experimenten (s. 3.9) die antigenen Peptide GAD65₅₅₅₋₅₆₇, NY-ESO1₁₂₂₋₁₃₃, HA₃₀₇₋₃₁₉, PHA (Phytohämagglutinin), PPI₇₃₋₉₀ und das gesamte C-Peptid verwendet. Diese Peptide waren im Kontext mit bestimmten HLA-DR-Allelen als antigen beschrieben (Reijonen et al. 1999, Mandic et al. 2003, Haug et al. 2005, Yang et al. 2008, Gebe et al. 2006). Die Stimulation erfolgte mit den (auto-) antigenen Peptiden in der Konzentration 10 µg/ml. Als Negativkontrolle dienten unstimulierte T-Zellen, als Positivkontrolle Zellen, die mit 2 µg/ml PHA stimuliert wurden. Die Analyse erfolgte wie in 4.2 beschrieben.

Abb. 5 zeigt als Beispiel Färbungen der T-Zellen eines HLA-DRB1*0401-positiven Donors, der reaktive CD4⁺ T-Zellen auf GAD65₅₅₅₋₅₆₇, NY-ESO1₁₂₂₋₁₃₃, PPI₇₃₋₉₀ und auf HA₃₀₇₋₃₁₉ besitzt. Mit GAD65₅₅₅₋₅₆₇ wurden dabei 0,6 % antigenspezifische CD4⁺ T-Zellen gefunden, mit NY-ESO1₁₂₂₋₁₃₃ 0,8 %, mit PPI₇₃₋₉₀ 1,0 % und mit HA₃₀₇₋₃₁₉ 1,75 %. Für verschiedene Donoren mit den Haplotypen HLA-DRB1*0401 (5 Donoren) und DRB1*0404 (1 Donor), wurde so die Reaktivität auf die antigenen Peptide untersucht.

Folgende gesunde humane Donoren wurden ausgewählt und haben auf die genannten Peptide mit einer antigenspezifischen T-Zellaktivierung reagiert:

Tab. 1:

Ausgewählte gesunde humane Donoren und Peptide, auf die eine *in vitro* Reaktion beobachtet wurde.

<u>Donor:</u>	<u>HLA-DR-</u> <u>Haplotyp:</u>	<u>Positive Reaktion auf die Peptide:</u>
Donor #1	DRB1*0401	GAD65 ₅₅₅₋₅₆₇ , NY-ESO1 ₁₂₂₋₁₃₃ , PPI ₇₃₋₉₀ , HA ₃₀₇₋₃₁₉
Donor #2	DRB1*0401	NY-ESO1 ₁₂₂₋₁₃₃ , PPI ₇₃₋₉₀ , HA ₃₀₇₋₃₁₉
Donor #3	DRB1*0404	GAD65 ₅₅₅₋₅₆₇ , NY-ESO1 ₁₂₂₋₁₃₃
Donor #4	DRB1*0401	GAD65 ₅₅₅₋₅₆₇ , HA ₃₀₇₋₃₁₉
Donor #5	DRB1*0401	GAD65 ₅₅₅₋₅₆₇ , NY-ESO1 ₁₂₂₋₁₃₃ , PPI ₇₃₋₉₀
Donor #6	DRB1*0401	HA ₃₀₇₋₃₁₉

4.5 Einfluss der regulatorischen T-Zellen auf die Zahl antigenspezifischer CD4⁺ T-Zellen

Frühere Arbeiten zeigen, dass nach Aufreinigung von CD4⁺CD25⁻ T-Zellen der Nachweis von autoreaktiven T-Zellen bei gesunden Probanden *in vitro* möglich ist. Es wird vermutet, dass CD4⁺CD25⁺ regulatorische T-Zellen (Tregs) autoreaktive Zellen normalerweise in ihrer Expansion hemmen. Eine Depletion der Tregs scheint deshalb notwendig, um eine Proliferation autoreaktiver CD4⁺ T-Zellen durch ein entsprechendes Antigen auszulösen (Danke et al. 2004). Dies war Grundlage der Hypothese dieser Arbeit. Daher wurden Proliferationsversuche mit T-Zellen und einem bekannten Autoantigen anfänglich mit Treg-depletierten T-Zellen, also CD4⁺CD25⁻ T-Zellen durchgeführt.

Weiterführende Arbeiten derselben Arbeitsgruppe haben allerdings gezeigt, dass die Depletion der CD4⁺CD25⁺ regulatorischen T-Zellen nicht in jedem Fall notwendig ist, um eine Proliferation der autoreaktiven Zellen auszulösen (Danke et al. 2005). Es wurde die Hypothese aufgestellt, dass mit Depletion der Tregs auch die reaktiven/aktivierten Zellen, die ebenfalls CD4⁺CD25⁺ auf der Oberfläche tragen, entfernt werden könnten. Ein statistisch nicht signifikanter Trend wurde beschrieben, wonach GAD65₅₅₅₋₅₆₇-reaktive T-Zellen von Patienten mit Typ-1-Diabetes ohne Treg-Depletion im Vergleich zu Gesunden vermehrt nachzuweisen sind (Danke et al. 2005). Daraus ergab sich dann die Arbeitshypothese, für die folgenden Versuche Tregs nicht mehr zu depletieren, um reagierende autoreaktive Zellen im Zellpool zu behalten. Dieser Trend hat sich in einigen der T-Zell-Versuche bestätigt, ist aber nicht eindeutig belegt. In drei Versuchen wurden innerhalb eines Versuches Gesamt-CD4⁺ T-Zellen mit Treg-depletierten T-Zellen verglichen (s. Tab. 2 Versuche Nr. 6 und Nr. 7, Tab. 3 Versuch Nr. 13 sowie Abb. 9 und 10). Gelegentlich wurden daher weiterhin Gesamt-CD4⁺ und Treg-depletierte T-Zellen zum Vergleich in unterschiedlichen Versuchen analysiert, wobei sich der Trend weiter bestätigte, dass bei Gesamt-CD4⁺ T-Zellen mehr autoreaktive T-Zellen proliferieren (s. Abb. 17). Dies wird deutlicher bei den Versuchen mit Hsp70, worauf ab Kapitel 4.6 näher eingegangen wird.

In Abb. 9 zeigen sich bei unstimulierten Zellen (Negativkontrollen) und stimulierten $CD4^+CD25^-$ T-Zellen kaum antigenspezifische $CD4^+$ T-Zellen, wohingegen bei stimulierten Gesamt- $CD4^+$ T-Zellen antigenspezifische T-Zellen nachweisbar sind. In Abb. 10 wird graphisch die Veränderung der Zahl antigenspezifischer $CD4^+$ T-Zellen in Abhängigkeit der Gesamt- $CD4^+$ bzw. Treg-depletierten Zellen jeweils innerhalb eines Versuches demonstriert.

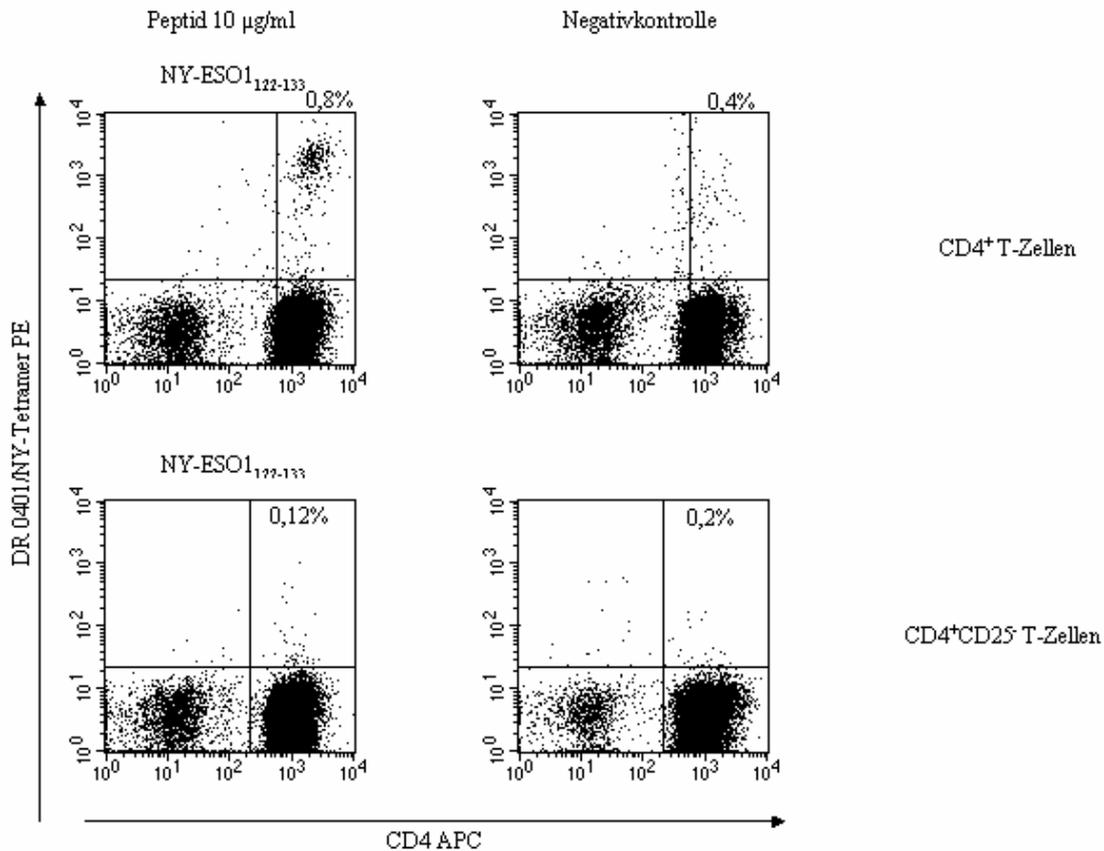


Abb. 9: Tetramerfärbung von T-Zellen eines HLA-DRB1*0401-positiven Donors. Obere Reihe gesamt- $CD4^+$ T-Zellen, untere Reihe $CD4^+CD25^-$ T-Zellen. Die Peptid-Konzentration zur Stimulation beträgt 10 µg/ml NY-ESO1₁₂₂₋₁₃₃-Peptid. $1,5 \times 10^6$ $CD4^+$ bzw. $CD4^+CD25^-$ T-Zellen wurden mit $1,5 \times 10^6$ APZs stimuliert, die Analyse erfolgte nach 14 Tagen in Kultur (s. 3.4). Übrige Angaben wie in Abb. 5.

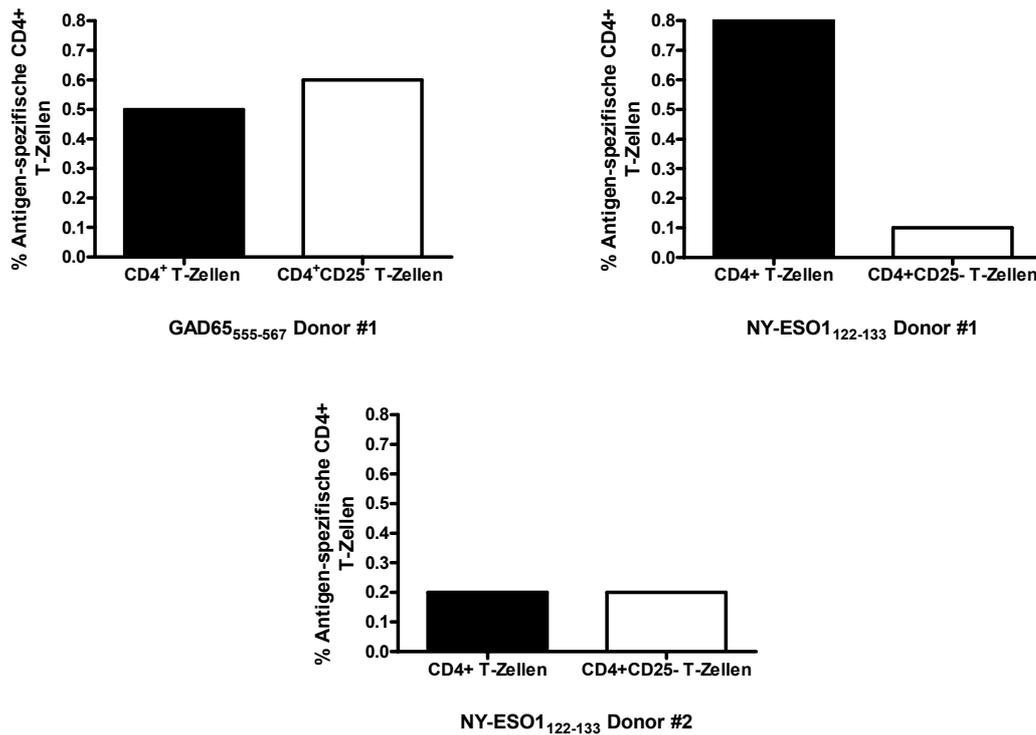


Abb. 10:

T-Zellen von zwei HLA-DRB1*0401-positiven Donoren. Verglichen wird die Veränderung der Zahl antigenspezifischer T-Zellen von Gesamt-CD4⁺ T-Zellen versus CD4⁺CD25⁻ T-Zellen im gleichen Versuch. Die Peptid-Konzentration zur Stimulation beträgt 10 µg/ml Peptid. 1,5x10⁶ gesamt-CD4⁺ bzw. CD4⁺CD25⁻ T-Zellen wurden mit 1,5x10⁶ APZs stimuliert und in Kultur genommen (s. 3.4). Die Prozentzahl der antigenspezifischen Zellen sowie die Expression des T-Zell Korezeptors CD4 wurden im FACS ermittelt und hier graphisch dargestellt.

4.6 Einfluss von Hsp70 auf die Aktivierung antigenspezifischer CD4⁺ T-Zellen

HSP-Moleküle beeinflussen die Präsentation und Reaktion von T-Zellen auf (auto-) antigene Peptide über MHC I und wahrscheinlich auch über MHC II (Mycko et al. 2004). Die zugrunde liegende Hypothese ist, dass HSPs im humanen System (auto-) antigene Peptide binden, ihre Übertragung auf MHC II-Moleküle erleichtern und damit die Peptid-Präsentation beeinflussen. Eine direkte Interaktion von HSPs mit MHC II-Molekülen kann ein entscheidender Schritt in der MHC II-vermittelten Antigenpräsentation und CD4⁺ T-Zellaktivierung sein und so die Pathogenese von Autoimmunerkrankungen

beeinflussen.

Bei Peptidreaktivität der Zellen eines gesunden humanen Donors mit bekanntem HLA-DR-Haplotyp (s. 4.5) sollte daher untersucht werden, ob die Proliferation von CD4⁺ T-Zellen bei Stimulation mit Peptid:Hsp70-Komplexen im Vergleich zur Stimulation mit antigenem Peptid alleine verstärkt oder abgeschwächt wird. Dazu wurden CD4⁺ bzw. CD4⁺CD25⁻ T-Zellen mit Peptid allein sowie mit Peptid:Hsp70-Komplexen stimuliert (s. 3.4), welche wie in 3.10 beschrieben über Nacht bei 37° C in Hanks-Puffer generiert worden waren.

In einer früheren Arbeit aus unserer Arbeitsgruppe wurde gezeigt, dass für einen HSP-Effekt ein Peptid:Hsp70-Komplex erforderlich ist (Haug et al. 2005). Die Affinität der antigenen Peptide GAD65₅₅₅₋₅₆₇, PPI₇₇₋₉₀, NY-ESO1₁₂₂₋₁₃₃ und HA₃₀₇₋₃₁₉ zu Hsp70 wurde mittels eines Europium-Fluoreszenz-Assays untersucht (beschrieben in Haug et al. 2005, die Versuche wurden von Markus Haug durchgeführt). Der Europium-Fluoreszenz-Assay funktioniert ähnlich einem klassischen ELISA. Über Nacht wurde Hsp70 mit einem Biotin-markierten Indikatorpeptid (Biotin-CLIP₁₀₅₋₁₁₇) mit und ohne einem zehnfachen bzw. fünffachen Überschuss der unmarkierten Kompetitorpeptide GAD65₅₅₅₋₅₆₇, NY-ESO1₁₂₂₋₁₃₃, HA₃₀₇₋₃₁₉ und PPI₇₇₋₉₀ inkubiert. Die Peptid:Hsp70-Komplexe wurden auf eine Mikrotiterplatte transferiert, die mit monoklonalen anti-Hsp70 Antikörpern vorbeschichtet war. Nach Zugabe von Europium-markiertem Streptavidin wurde die resultierende Fluoreszenz gemessen (beschrieben in Haug et al. 2005). Abb. 11 zeigt, dass das Diabetes mellitus Typ1-assoziierte Peptid PPI₇₃₋₉₀ keine Affinität zu Hsp70 hat. Das Peptid GAD65₅₅₅₋₅₆₇ besitzt eine Affinität zu Hsp70 (ca. 50 % Competition des Biotin-markierten Indikatorpeptides bei 10-fachem Überschuss). NY-ESO1₁₂₂₋₁₃₃ zeigt eine Affinität die nicht sehr stark ausgeprägt ist, aber etwa gleich stark wie die von unmarkiertem Indikatorpeptid CLIP (bei 5-fachem Überschuss), welches als Kontrolle untersucht wurde. Die stärkste Hsp70-Affinität wurde für das alloantigene Peptid HA₃₀₇₋₃₁₉ gefunden.

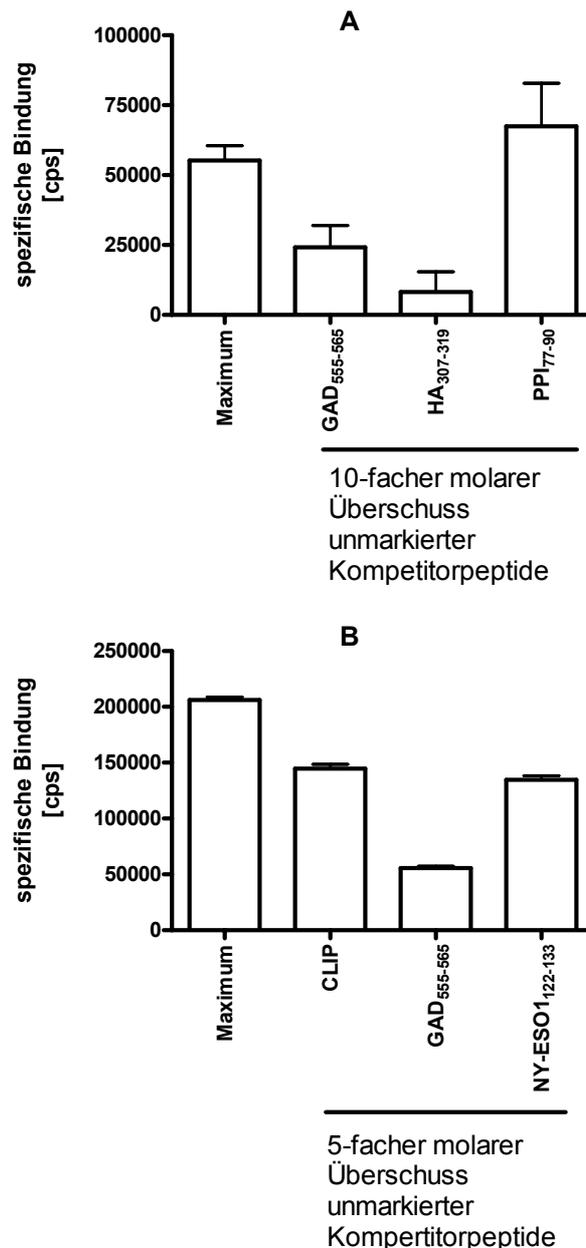


Abb. 11:

Interaktion verschiedener antigener Peptide mit humanem rekombinatem Hsp70.

In einem Europium-Fluoreszenz-Assay wurde Hsp70 mit einem Hsp70-bindenden Biotin-markierten Indikatorpeptid inkubiert (Biotin-CLIP₁₀₅₋₁₁₇ = Maximum). Die Bindung des Indikatorpeptids wurde durch Zugabe eines 10-fachen (A) bzw. 5-fachen (B) Überschusses an unmarkierten antigenen Kompetitorpeptiden versucht zu inhibieren. Die Detektion von Hsp70-gebundenem Biotin-markiertem Indikator-Peptid erfolgte über die Messung fluoreszierender Streptavidin-Europiumkomplexe (Doppelwerte (A), Dreifachwerte (B), unspezifische Bindung jeweils abgezogen). cps=counts per second: Messwert pro Sekunde (Ausführliche Beschreibung der Methode s. Haug et al. 2005, Abbildung mit freundlicher Genehmigung von Markus Haug).

Die Zellen wurden 7 Tage (bei CFSE-Färbung) bzw. 10 bis 14 Tage (ohne CFSE-Färbung) in Kultur genommen, dann erfolgte die Analyse der generierten T-Zellen mittels FACS (s. 3.12, 3.13 und 4.2).

Exemplarisch wird im Folgenden jeweils ein Versuch pro Spender mit den unterschiedlichen Peptiden und der Wirkung von Peptid:Hsp70-Komplex gezeigt (Abb. 12-16). Als Negativkontrolle wurden CD4⁺ T-Zellen nur mit Hsp70 stimuliert und mit den HLA-kompatiblen Tetrameren der Peptide in einzelnen FACS-Röhrchen gefärbt, die in dem jeweiligen Versuch eingesetzt wurden. Außerdem wurde ein Pool aus allen Versuchsansätzen mit einem leeren HLA-kompatiblen Kontrolltetramer gefärbt. Gezeigt ist jeweils nur eine Negativkontrolle. In Abb. 14 ist keine Negativkontrolle gezeigt, da sie nicht verwertbar war, die Populationen sind jedoch eindeutig abgrenzbar (s. 3.13). In allen dargestellten Versuchen zeigen unstimulierte Zellen (Negativkontrollen) kaum Proliferation bzw. kaum antigenspezifische Tetramerfärbung, wohingegen bei stimulierten Zellen die Zahl der antigenspezifischen Zellen zunimmt.

In Tab. 7 ist bei Versuch Nr. 23 in Klammern zusätzlich die Prozentzahl proliferierter (nicht antigenspezifischer) Zellen angegeben, um zu zeigen, dass hier die antigenspezifischen Zellen möglicherweise nicht detektiert werden konnten, auf jeden Fall aber eine Proliferation stattgefunden hat.

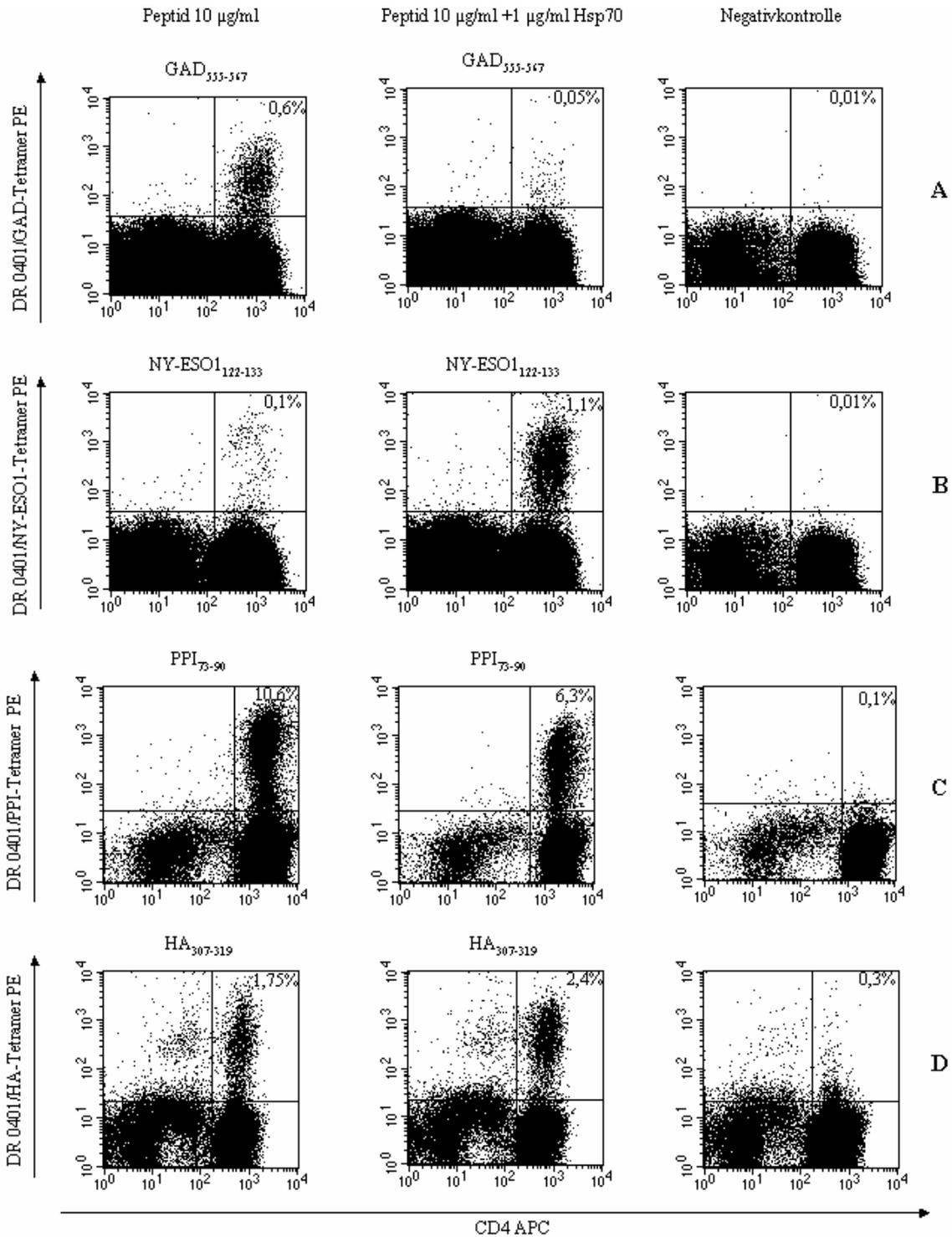


Abb. 12: Tetramerfärbung von T-Zellen eines HLA-DRB1*0401-positiven Donors (Donor #1). (A) Stimulation mit GAD₅₅₅₋₅₆₇, (B) NY-ESO1₁₂₂₋₁₃₃, (C) PPI₇₃₋₉₀, (D) HA₃₀₇₋₃₁₉. Die Peptid-Konzentration beträgt 10 µg/ml Peptid +/- 1 µg/ml Hsp70. $1,5 \times 10^6$ CD4⁺CD25⁻ T-Zellen (A und B) bzw. CD4⁺ T-Zellen ohne CD25-Depletion (C und D) wurden mit $1,5 \times 10^6$ APZs stimuliert, die Analyse erfolgte nach 11 Tagen in Kultur (s. 3.4). Übrige Angaben wie in Abb. 5.

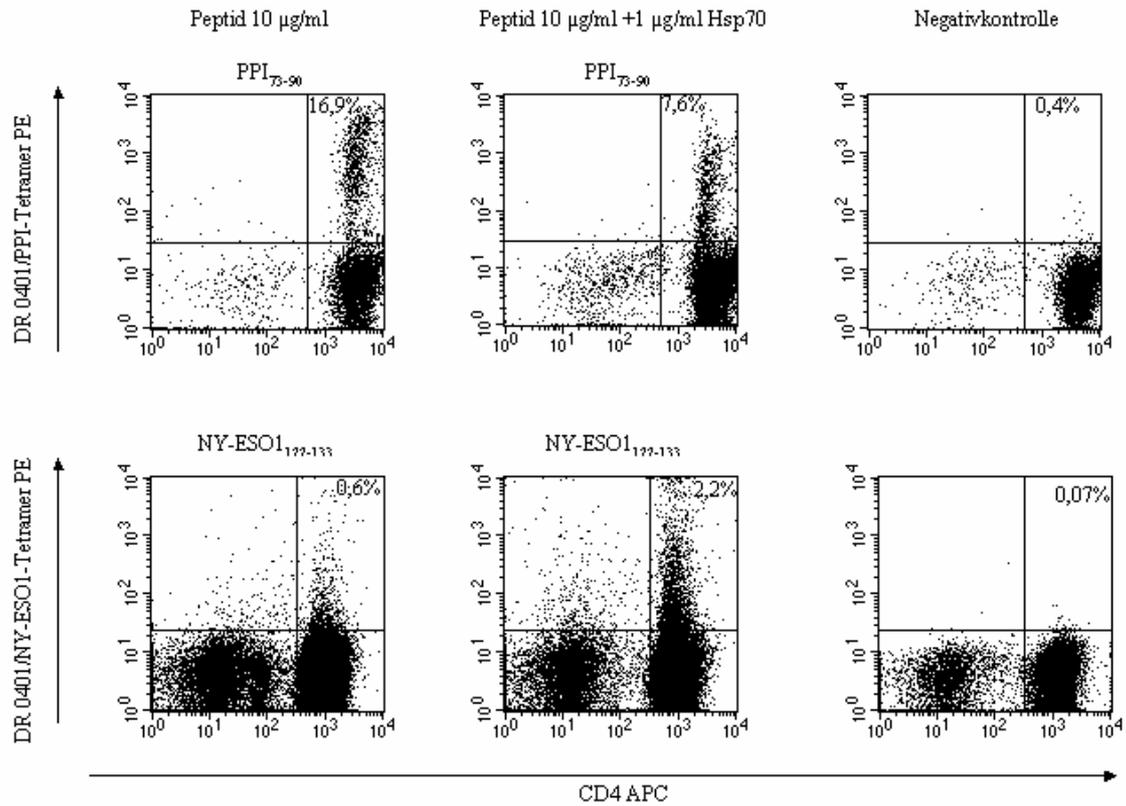


Abb. 13:

Tetramerfärbung CD4⁺ T-Zellen eines HLA-DRB1*0401-positiven Donors (Donor #2). Obere Reihe: PPI₇₃₋₉₀, untere Reihe: NY-ESO1₁₂₂₋₁₃₃. Die Peptid-Konzentration beträgt 10 µg/ml Peptid +/- 1 µg/ml Hsp70. 1,5x10⁶ CD4⁺ T-Zellen wurden mit 1,5x10⁶ APZs mit NY-ESO1₁₂₂₋₁₃₃ stimuliert, die Analyse erfolgte nach 11 Tagen in Kultur. Zellen im gleichen Verhältnis wurden mit PPI₇₃₋₉₀ stimuliert und einmalig restimuliert, die Analyse erfolgte 8 Tage nach erneuter Stimulation in Kultur (s. 3.4). Übrige Angaben wie in Abb. 5.

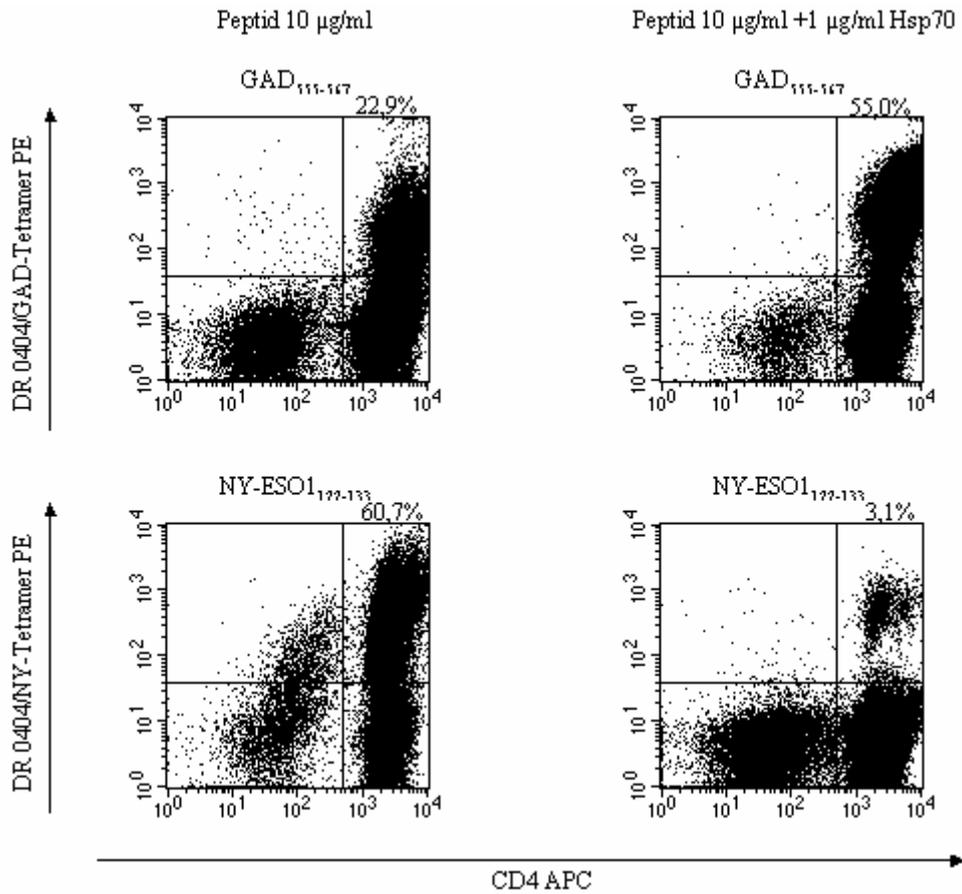


Abb. 14:

Tetramerfärbung CD4⁺ T-Zellen eines HLA-DRB1*0404-positiven Donors (Donor #3). Die Peptid-Konzentration beträgt 10 µg/ml Peptid (obere Reihe: GAD65₅₅₅₋₅₆₇, untere Reihe: NY-ESO1₁₂₂₋₁₃₃) +/- 1 µg/ml Hsp70. 1,5x10⁶ CD4⁺ T-Zellen wurden mit 1,5x10⁶ APZs stimuliert und dreimalig restimuliert, die Analyse erfolgte 9 Tage nach erneuter Stimulation in Kultur (s. 3.4). Die Zellen wurden mit anti-CD4-APC mAk und HLA-DRB1*0404 Tetramer-PE gefärbt, der mit dem entsprechenden Peptid beladen war (s. 3.11). Übrige Angaben wie in Abb. 5.

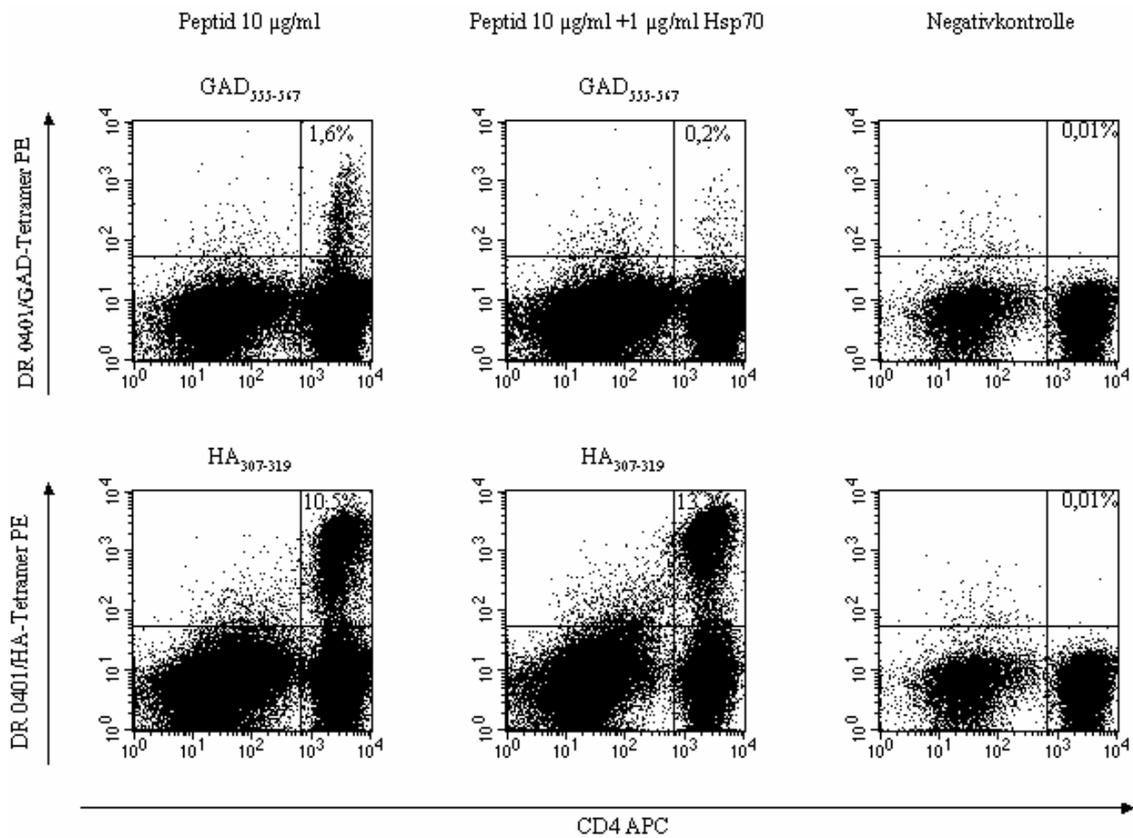


Abb. 15:
 Tetramerfärbung CD4⁺ T-Zellen eines HLA-DRB1*0401-positiven Donors (Donor #4). Die Peptid-Konzentration beträgt 10 µg/ml Peptid (obere Reihe: GAD65₅₅₅₋₅₆₇, untere Reihe: HA₃₀₇₋₃₁₉) +/- 1 µg/ml Hsp70. 1,5x10⁶ CD4⁺ T-Zellen wurden mit 1,5x10⁶ APZs stimuliert, die Analyse erfolgte nach 10 Tagen in Kultur (s. 3.4). Übrige Angaben wie in Abb. 5.

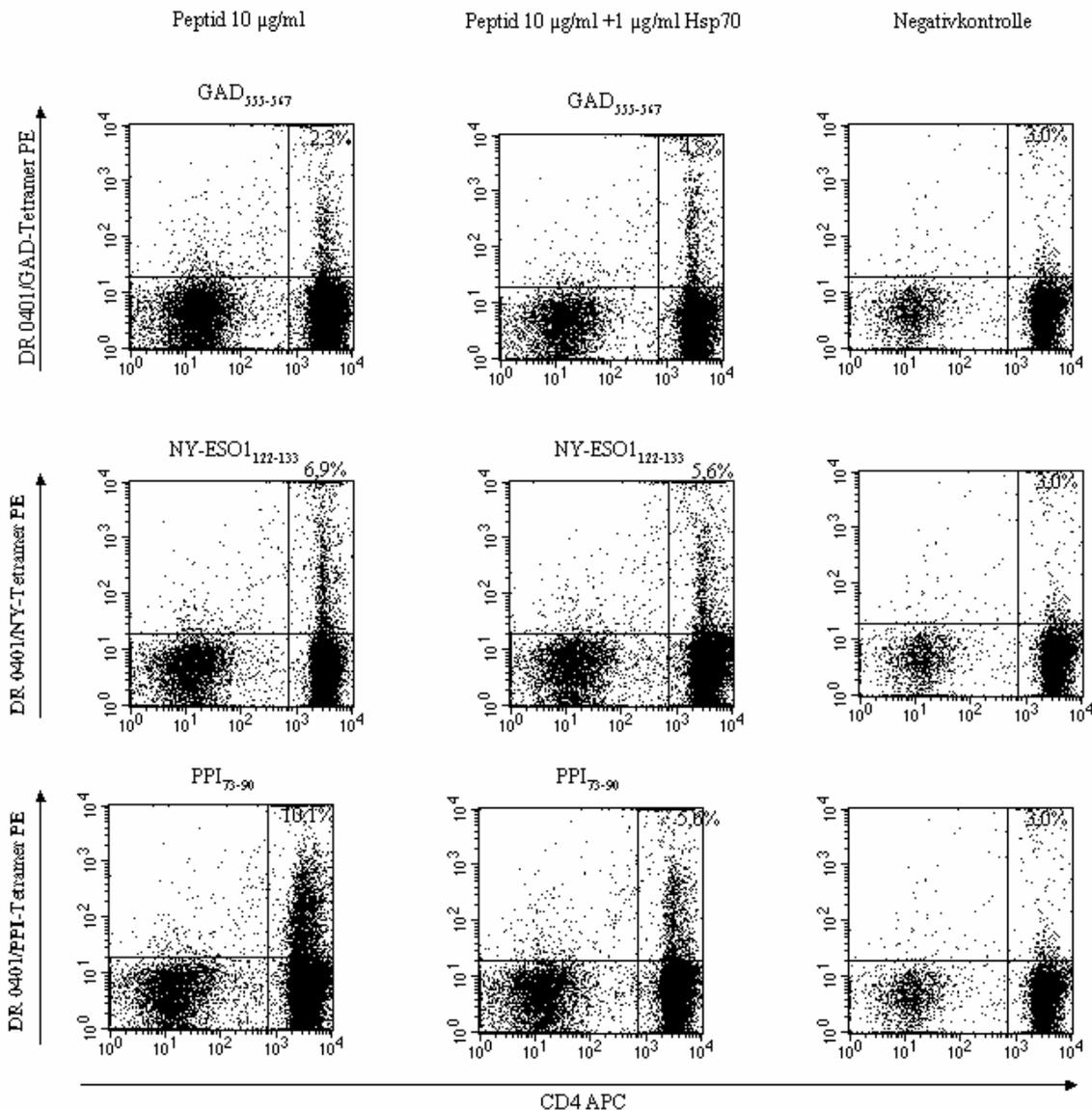


Abb. 16:
Tetramerfärbung CD4⁺ T-Zellen eines HLA-DRB1*0401-positiven Donors (Donor #5). Die Peptid-Konzentration beträgt 10 µg/ml Peptid (obere Reihe: GAD₅₅₅₋₅₆₇, mittlere Reihe: NY-ESO1₁₂₂₋₁₃₃, untere Reihe: PPI₇₃₋₉₀) +/- 1 µg/ml Hsp70. 1,5x10⁶ CD4⁺ T-Zellen wurden mit 1,5x10⁶ APZs stimuliert, die Analyse erfolgte nach 11 Tagen in Kultur (s. 3.4). Übrige Angaben wie in Abb. 5.

Tabellarisch und graphisch sind im Folgenden die verwertbaren Versuche zusammengestellt, in denen antigenspezifische CD4⁺ T-Zellen bzw. eine Proliferation dieser Zellen detektiert wurde. Bei Versuch Nr. 19 (Tab. 5) wurde bei Stimulation von CD4⁺CD25⁻ T-Zellen mit HA₃₀₇₋₃₁₉ eine sehr starke Reaktion gemessen. Eventuell ist hier kein bzw. kaum mehr Einfluss von Hsp70 möglich.

Tab. 7 zeigt die Ergebnisse bei Stimulation von Zellen des Donors #6, die ausschließlich auf das HA₃₀₇₋₃₁₉-Peptid reagiert haben. Sowohl in Versuch Nr. 21 (starke Reaktion) als auch in Versuch Nr. 22 war nur nach Stimulation von CD4⁺CD25⁻ T-Zellen mit HA₃₀₇₋₃₁₉ eine eindeutige Tetramer-positive Population abzugrenzen, wobei jeweils keine Stimulation mit Peptid+Hsp70 erfolgte.

Tab. 2:

Prozentzahl antigenspezifischer CD4⁺ T-Zellen in CD4⁺ und CD4⁺CD25⁻ T-Zell-Kulturen des HLA-DRB1*0401-positiven Donors #1 nach *in vitro* Stimulation mit verschiedenen Peptiden in der Konzentration 10 µg/ml in Hsp70-Komplexierung und ohne Hsp70. Unterstrichen: Hsp70-vermittelte Proliferationsverstärkung bzw. Zunahme der Anzahl antigenspezifischer CD4⁺ T-Zellen, nicht unterstrichen: Hsp70-vermittelte Proliferationsabschwächung bzw. Abnahme der Anzahl antigenspezifischer CD4⁺ T-Zellen, *kursiv*: kein Effekt durch Hsp70 bzw. keine Tetramer-positive Population (s. 3.13).

Versuch Nummer	Peptid	CD4 ⁺ T-Zellen		CD4 ⁺ CD25 ⁻ T-Zellen	
		- Hsp70	+ Hsp70	- Hsp70	+ Hsp70
1	PPI ₇₃₋₉₀	<u>1,0 %</u>	<u>1,6 %</u>	--	--
1	PPI ₇₃₋₉₀ (CFSE)	<u>1,3 %</u>	<u>1,9 %</u>	--	--
2	C-Peptid	0,02 %	0,01 %	--	--
2	PPI ₇₃₋₉₀	<u>8,8 %</u>	<u>9,5 %</u>	--	--
3	PPI ₇₃₋₉₀	10,6 %	6,3 %	--	--
4	GAD65 ₅₅₅₋₅₆₇	0,1 %	0,2 %	--	--
4	NY-ESO1 ₁₂₂₋₁₃₃	0,1 %	0,3 %	--	--
4	HA ₃₀₇₋₃₁₉	4,3 %	1,3 %	--	--
4	PPI ₇₃₋₉₀	1,3 %	0,8 %	--	--
5	HA ₃₀₇₋₃₁₉	<u>1,75 %</u>	<u>2,4 %</u>	--	--
6	NY-ESO1 ₁₂₂₋₁₃₃	0,8 %	0,2 %	0,1 %	0,07 %
7	GAD65 ₅₅₅₋₅₆₇	<u>0,5 %</u>	<u>5,2 %</u>	0,6 %	0,5 %
8	GAD65 ₅₅₅₋₅₆₇	--	--	0,6 %	0,05 %
8	NY-ESO1 ₁₂₂₋₁₃₃	--	--	<u>0,1 %</u>	<u>1,1 %</u>
9	GAD65 ₅₅₅₋₅₆₇	--	--	1,0 %	0,1 %
9	NY-ESO1 ₁₂₂₋₁₃₃	--	--	<u>0,3 %</u>	<u>1,3 %</u>

Tab. 3:

Prozentzahl antigenspezifischer CD4⁺ T-Zellen in CD4⁺ und CD4⁺CD25⁻ T-Zell-Kulturen des HLA-DRB1*0401-positiven Donors #2. Übrige Angaben wie in Tab. 2.

Versuch Nummer	Peptid	CD4 ⁺ T-Zellen		CD4 ⁺ CD25 ⁻ T-Zellen	
		- Hsp70	+ Hsp70	- Hsp70	+ Hsp70
10	PPI ₇₃₋₉₀	5,2 %	4,6 %	--	--
10	PPI ₇₃₋₉₀ (CFSE)	5,2 %	4,6 %	--	--
11	PPI ₇₃₋₉₀	16,9 %	7,6 %	--	--
11	NY-ESO1 ₁₂₂₋₁₃₃	3,1 %	0,3 %	--	--
11	HA ₃₀₇₋₃₁₉	24,9 %	3,0 %	--	--
12	PPI ₇₃₋₉₀	1,0 %	0,7 %	--	--
12	NY-ESO1 ₁₂₂₋₁₃₃	<u>0,6 %</u>	<u>2,2 %</u>	--	--
13	NY-ESO1 ₁₂₂₋₁₃₃	<u>0,2 %</u>	<u>0,6 %</u>	0,2 %	0,2 %

Tab. 4:

Prozentzahl antigenspezifischer CD4⁺ T-Zellen in CD4⁺ T-Zell-Kulturen des HLA-DRB1*0404-positiven Donors #3. Übrige Angaben wie in Tab. 2.

Versuch Nummer	Peptid	CD4 ⁺ T-Zellen	
		- Hsp70	+ Hsp70
14	GAD65 ₅₅₅₋₅₆₇	<u>22,9 %</u>	<u>55,0 %</u>
14	NY-ESO1 ₁₂₂₋₁₃₃	60,7 %	3,1 %
15	GAD65 ₅₅₅₋₅₆₇	<u>6,9 %</u>	<u>37,8 %</u>
15	NY-ESO1 ₁₂₂₋₁₃₃	40,1 %	2,5 %
16	GAD65 ₅₅₅₋₅₆₇	<u>3,7 %</u>	<u>7,8 %</u>
16	NY-ESO1 ₁₂₂₋₁₃₃	14,3 %	3,1 %
17	GAD65 ₅₅₅₋₅₆₇	<u>0,8 %</u>	<u>5,8 %</u>
17	NY-ESO1 ₁₂₂₋₁₃₃	8,1 %	1,3 %

Tab. 5:

Prozentzahl antigenspezifischer CD4⁺ T-Zellen in CD4⁺ und CD4⁺CD25⁻ T-Zell-Kulturen des HLA-DRB1*0401-positiven Donors #4. GAD65₅₅₅₋₅₆₇^{*} und HA₃₀₇₋₃₁₉^{*}: doppelt so viele CD4⁺CD25⁻ T-Zellen wie APZs. Übrige Angaben wie in Tab. 2.

Versuch Nummer	Peptid	CD4 ⁺ T-Zellen		CD4 ⁺ CD25 ⁻ T-Zellen	
		- Hsp70	+ Hsp70	- Hsp70	+ Hsp70
18	HA ₃₀₇₋₃₁₉	--	--	<u>2,9 %</u>	<u>21,4 %</u>
19	GAD65 ₅₅₅₋₅₆₇ [*]	--	--	4,3 %	0,7 %
19	HA ₃₀₇₋₃₁₉ [*]	--	--	<u>11,7 %</u>	<u>20,1 %</u>
19	GAD65 ₅₅₅₋₅₆₇	--	--	<u>1,2 %</u>	<u>1,4 %</u>
19	HA ₃₀₇₋₃₁₉	--	--	39,1 %	40,9 %
19	GAD65 ₅₅₅₋₅₆₇	1,6 %	0,2 %	--	--
19	HA ₃₀₇₋₃₁₉	<u>10,5 %</u>	<u>13,2 %</u>	--	--

Tab. 6:

Prozentzahl antigenspezifischer CD4⁺ T-Zellen in CD4⁺ T-Zell-Kulturen des HLA-DRB1*0401-positiven Donors #5. Übrige Angaben wie in Tab. 2.

Versuch Nummer	Peptid	CD4 ⁺ T-Zellen	
		- Hsp70	+ Hsp70
20	PPI ₇₃₋₉₀	10,1 %	5,6 %
20	GAD65 ₅₅₅₋₅₆₇	<u>2,3 %</u>	<u>4,8 %</u>
20	NY-ESO1 ₁₂₂₋₁₃₃	6,9 %	5,6 %

Tab. 7:

Prozentzahl antigenspezifischer CD4⁺ T-Zellen in CD4⁺CD25⁻ T-Zell-Kulturen des HLA-DRB1*0401-positiven Donors #6. Eindeutige Tetramer-positive Population: unterstrichen. Bei Versuch Nr. 23 ist in Klammern zusätzlich die Prozentzahl proliferierter (nicht antigenspezifischer) Zellen angegeben. Übrige Angaben wie in Tab. 2.

Versuch Nummer	Peptid	CD4 ⁺ CD25 ⁻ T-Zellen	
		- Hsp70	+ Hsp70
21	GAD65 ₅₅₅₋₅₆₇	0,3 %	0,2 %
21	NY-ESO1 ₁₂₂₋₁₃₃	0,2 %	0,1 %
21	HA ₃₀₇₋₃₁₉	<u>4,9 %</u>	--
22	GAD65 ₅₅₅₋₅₆₇	0,1 %	0,1 %
22	NY-ESO1 ₁₂₂₋₁₃₃	0,1 %	0,1 %
22	HA ₃₀₇₋₃₁₉	<u>0,4 %</u>	--
23	GAD65 ₅₅₅₋₅₆₇ (CFSE)	0,05 % (3,0 %)	0,04 % (3,4 %)
23	NY-ESO1 ₁₂₂₋₁₃₃ (CFSE)	0,02 % (1,4 %)	0,02 % (0,9 %)

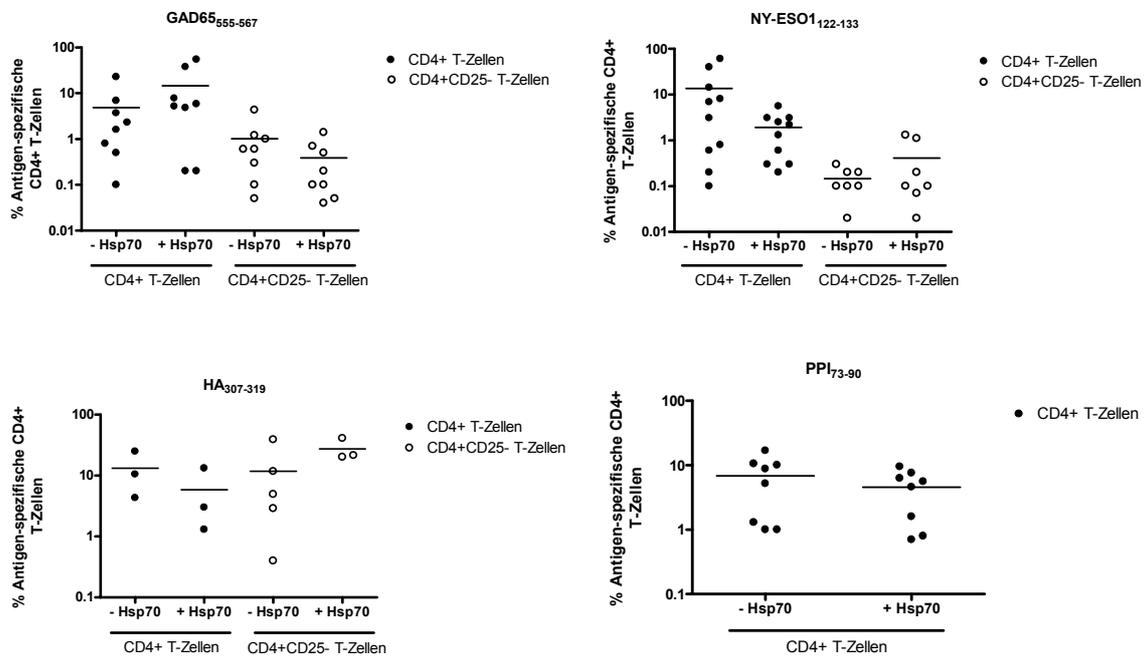


Abb. 17:

Graphische Zusammenfassung der Tabellen 2 bis 7. Prozentzahl antigenspezifischer CD4⁺ T-Zellen in CD4⁺ und CD4⁺CD25⁻ T-Zell-Kulturen der Donoren #1 bis #6 nach *in vitro* Stimulation mit verschiedenen Peptiden in Hsp70-Komplexierung und ohne Hsp70. In den einzelnen

Diagrammen sind die auswertbaren Ergebnisse der verschiedenen Donoren zusammengefasst, die mit demselben Peptid stimuliert wurden. Jeder Punkt entspricht einem Messwert aus den Tab. 2 bis 7.

Wie aus Abb. 17 ersichtlich ist, führt im Gesamtdurchschnitt aller verwertbaren Versuche bei allen Donoren die Stimulation $CD4^+$ T-Zellen mit dem Autoantigen $GAD65_{555-567}$ + Hsp70 tendenziell zu einer Zunahme der Zahl antigenspezifischer $CD4^+$ T-Zellen. Die entsprechende Stimulation $CD4^+CD25^-$ T-Zellen bewirkt dagegen eher eine Abnahme der Zahl antigenspezifischer $CD4^+$ T-Zellen. Bei Stimulation $CD4^+$ T-Zellen mit dem Alloantigen/Tumorantigen $NY-ESO1_{122-133}$ + Hsp70 sieht es folgendermaßen aus: Es kommt zu einer Abnahme der Zahl antigenspezifischer $CD4^+$ T-Zellen, wobei die entsprechende Stimulation $CD4^+CD25^-$ T-Zellen eine Zunahme der Zahl antigenspezifischer $CD4^+$ T-Zellen bewirkt. Die Stimulation mit dem Influenza-Protein $HA_{307-319}$ + Hsp70 bewirkt eher eine Abnahme der Zahl antigenspezifischer $CD4^+$ T-Zellen. Die entsprechende Stimulation $CD4^+CD25^-$ T-Zellen führt hingegen zu einer leichten Zunahme der Zahl antigenspezifischer $CD4^+$ T-Zellen. Stimulation $CD4^+$ T-Zellen mit dem Präproinsulin $_{73-90}$ + Hsp70 zeigt eine leichte Abnahme der Zahl antigenspezifischer $CD4^+$ T-Zellen.

Die Berechnung der P-Werte mittels eines gepaarten zweiseitigen T-Tests mit dem Programm GraphPad Prism 4.0 zeigte für die Proliferationsversuche keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen der Stimulation mit Peptid:Hsp70-Komplex versus Peptid allein.

In Abb. 18 ist ergänzend zu Abb. 7 der Einfluss von Hsp70 dargestellt, in der das optimale Zellzahlverhältnis und die optimale Peptidkonzentration ermittelt wurden. In Abb. 19 wird analog zu Abb. 8 die Hsp70-vermittelte Veränderung der Zahl antigenspezifischer $CD4^+$ T-Zellen mit den Daten aller verwertbaren entsprechenden Versuche graphisch demonstriert. Die stärkste Reaktion entsteht bei einem Zellzahlverhältnis $APZ:CD4 = 1:1$. Hsp70 hat im Zusammenhang mit PPI_{73-90} keinen wesentlichen Effekt.

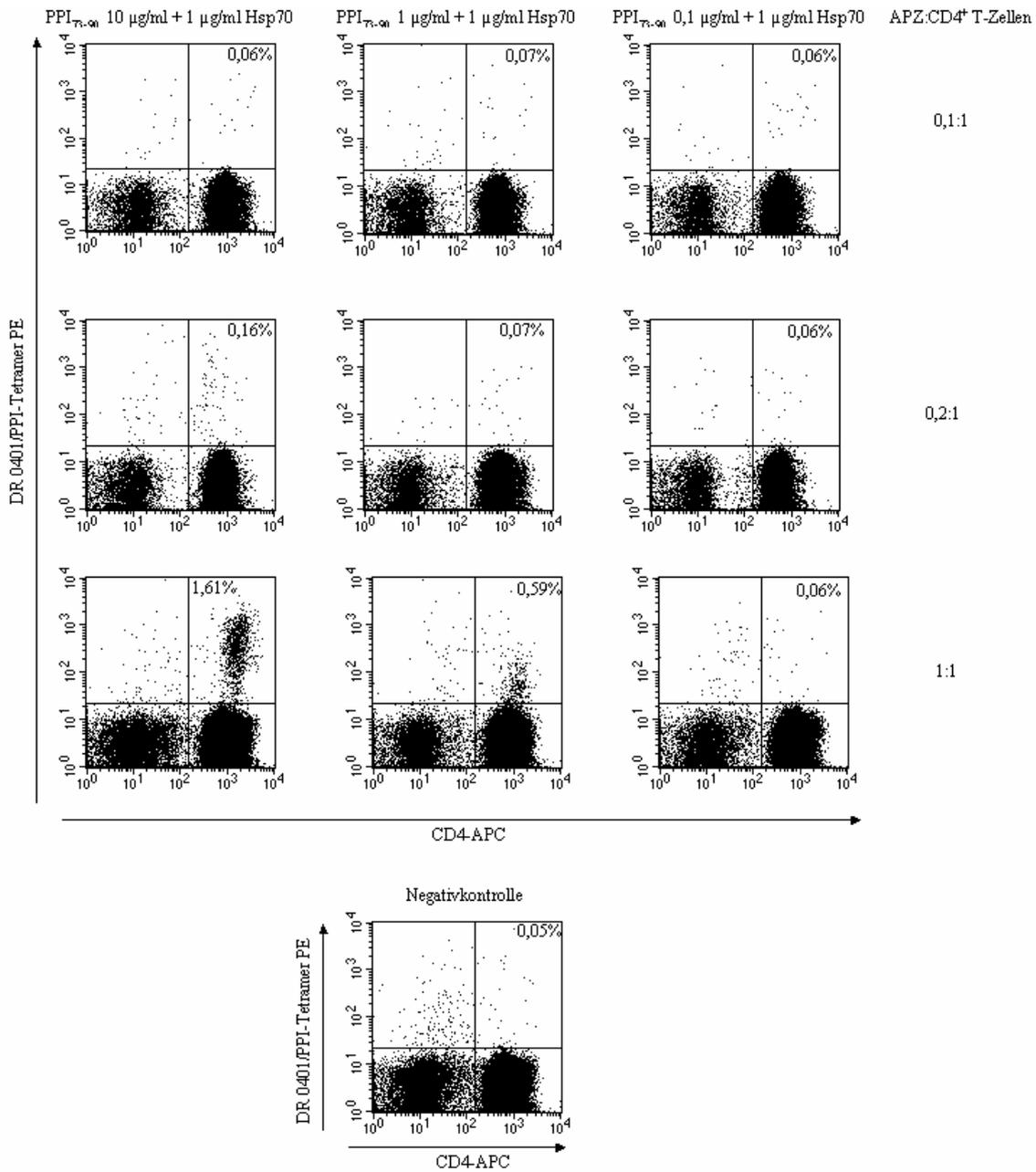


Abb. 18:
 Tetramerverfärbung CD4⁺ T-Zellen eines HLA-DRB1*0401-positiven Donors. Die verschiedenen PPI₇₃₋₉₀-Peptidkonzentrationen sind 10 µg/ml (linke Spalte), 1 µg/ml (mittlere Spalte) und 0,1 µg/ml (rechte Spalte) jeweils + 1 µg/ml Hsp70. Übrige Angaben wie in Abb. 7.

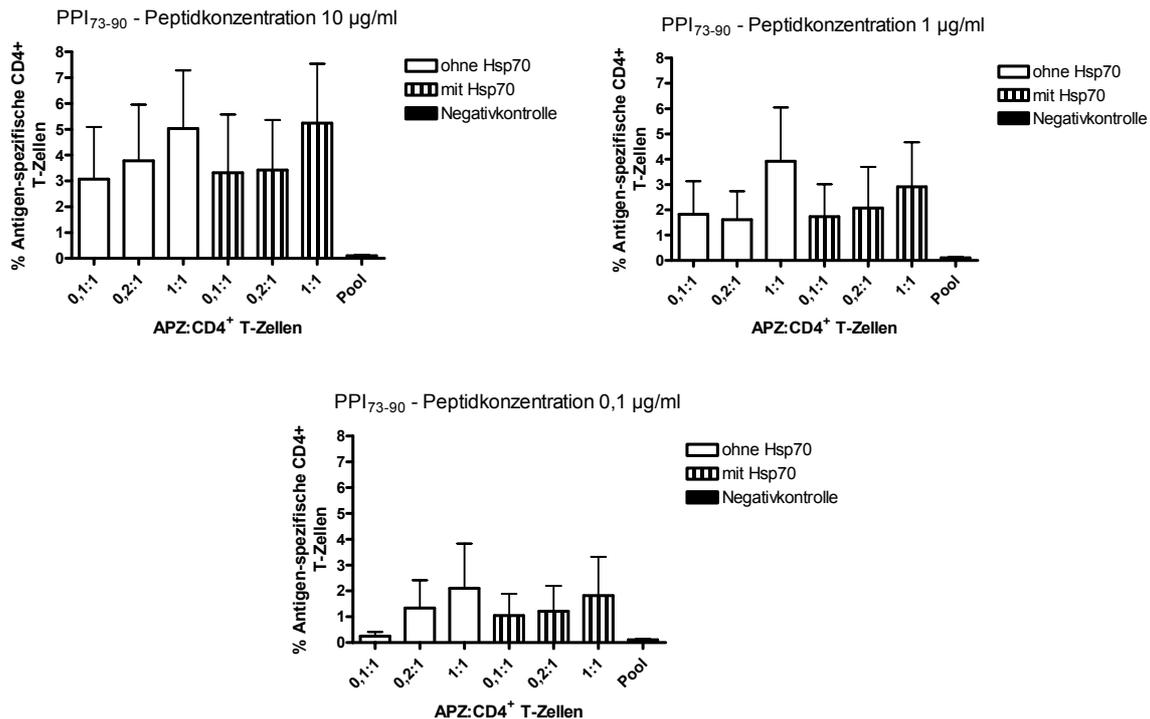


Abb. 19: Prozentzahl antigenspezifischer CD4⁺ T-Zellen in CD4⁺ T-Zell-Kulturen nach *in vitro* Stimulation mit drei verschiedenen PPI₇₃₋₉₀-Peptidkonzentrationen in Hsp70-Komplexierung und ohne Hsp70. Insgesamt sind 3 Versuche mit Zellen von zwei verschiedenen HLA-DRB1*0401-positiven Donoren dargestellt. Das Zellzahlverhältnis APZ:CD4⁺ T-Zellen wurde variiert (x-Achse 0,01:1-1:1). Durch Peptidkonzentration und Zellzahlverhältnis beeinflusste Unterschiede der Anzahl antigenspezifischer CD4⁺ T-Zellen, jeweils der zusätzlichen Hsp70-vermittelten Veränderung gegenübergestellt, sind auf der y-Achse aufgetragen. Negativkontrolle s. Abb. 8.

4.7 Untersuchung des Zytokinmusters stimulierter T-Zellen unter dem Einfluss von Hsp70

Da insbesondere bei den Versuchen mit GAD65₅₅₅₋₅₆₇ sowie HA₃₀₇₋₃₁₉ uneinheitliche Ergebnisse vorliegen und Autoimmunerkrankungen meist T_H1-dominiert sind, war es von Interesse das Zytokinmuster der stimulierten Zellen zu untersuchen. Dies wurde mittels Cytokine Secretion Assay (s. 3.14) und ELISA (s. 3.15) durchgeführt, um zwischen T_H1- und T_H2-Zytokinmustern differenzieren zu können. Zu erwarten wäre mit Hsp70 eine höhere T_H1-Antwort (mehr IFN-γ- und erniedrigte IL-5-Produktion), die bei autoimmunem Reaktionen beobachtet wird. In der Literatur sind vielerlei HSP-Effekte beschrieben, die im

Sinne einer höheren T_H1 -Antwort polarisieren (z. B. Wan et al. 2004).

4.7.1 Messung von IFN- γ im Cytokine Secretion Assay (CSA)

Mit Hilfe des Cytokine Secretion Assays (s. 3.14) können bei antigenspezifischen T-Zellen bestimmte Zytokinsekretionsmuster bestimmt werden. Exemplarisch wird in Abb. 20 ein Versuch gezeigt: bei antigenspezifischen Zellen ist eine Zytokinproduktion erkennbar, wohingegen unstimulierte Zellen (Negativkontrolle) kaum Zytokine sezernieren. Die Positivkontrolle wurde mit anti-CD3- und anti-CD28-Antikörpern stimuliert, es zeigt sich eine deutliche Zytokinproduktion nicht-antigenspezifischer Zellen.

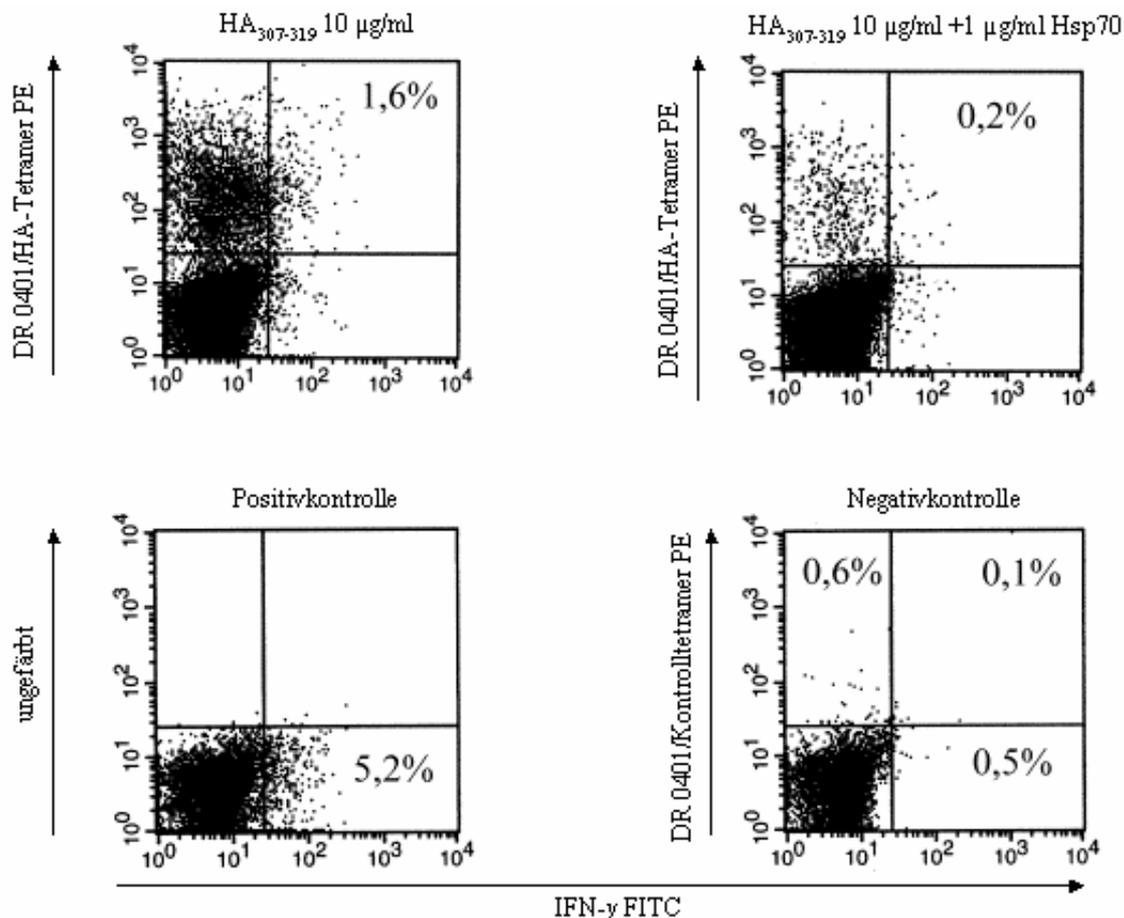


Abb. 20: Cytokine Secretion Assay mit restimulierten $CD4^+$ T-Zellen eines HLA-DRB1*0401-positiven Donors. Zunächst wurden $1,5 \times 10^6$ $CD4^+$ T-Zellen und $1,5 \times 10^6$ APZs mit 10 µg/ml Peptid +/- 1 µg/ml Hsp70 stimuliert. Nach 12 Tagen

in Kultur (s. 3.4) wurde einmalig restimuliert. Nach weiteren 8 Tagen in Kultur wurde der Cytokine Secretion Assay durchgeführt (s. 3.14). Auf der x-Achse ist IFN- γ -FITC aufgetragen. Zytokin produzierende antigenspezifische CD4⁺ T-Zellen werden daher im oberen rechten Quadranten der Punktediagramme gefunden, da sie Tetramer-positiv (y-Achse) und IFN- γ -FITC-positiv (x-Achse) sind (Tetramer⁺IFN- γ ⁺-Zellen). Unstimulierte Zellen (Negativkontrolle) sind im Diagramm unten rechts dargestellt. Die Positivkontrolle (unten links) wurde mit 1 μ g/ml anti-CD3- und 1 μ g/ml anti-CD28-Antikörpern stimuliert.

Tabellarisch und graphisch sind im Folgenden die verwertbaren Versuche zusammengestellt, bei denen sich eine Zytokinproduktion antigenspezifischer CD4⁺ T-Zellen im Cytokine Secretion Assay gezeigt hat. Die Angaben stellen die Prozentzahl antigenspezifischer CD4⁺ T-Zellen dar, für die eine IFN- γ -Sekretion gefunden wurde.

Tab. 8:

Prozentzahl antigenspezifischer IFN- γ -produzierender CD4⁺ T-Zellen in CD4⁺ T-Zell-Kulturen verschiedener Donoren nach *in vitro* Stimulation mit verschiedenen Peptiden in Hsp70-Komplexierung und ohne Hsp70. Unterstrichen: Hsp70-vermittelte Zunahme der Anzahl antigenspezifischer IFN- γ -produzierender CD4⁺ T-Zellen, nicht unterstrichen: Hsp70-vermittelte Abnahme der Anzahl antigenspezifischer IFN- γ -produzierender CD4⁺ T-Zellen (s. 3.13).

Versuch Nummer	Donor	Peptid	IFN- γ -Produktion	
			-Hsp70	+Hsp70
24	#1	PPI ₇₃₋₉₀	0,7 %	0,2 %
25	#2	PPI ₇₃₋₉₀	0,7 %	0,3 %
25	#2	HA ₃₀₇₋₃₁₉	1,6 %	0,2 %
26	#3	GAD65 ₅₅₅₋₅₆₇	<u>1,1 %</u>	<u>2,8 %</u>
26	#3	NY-ESO1 ₁₂₂₋₁₃₃	1,8 %	1,4 %
27	#3	GAD65 ₅₅₅₋₅₆₇	7,1 %	4,3 %
27	#3	NY-ESO1 ₁₂₂₋₁₃₃	5,1 %	2,9 %
28	#5	PPI ₇₃₋₉₀	1,7 %	0,9 %

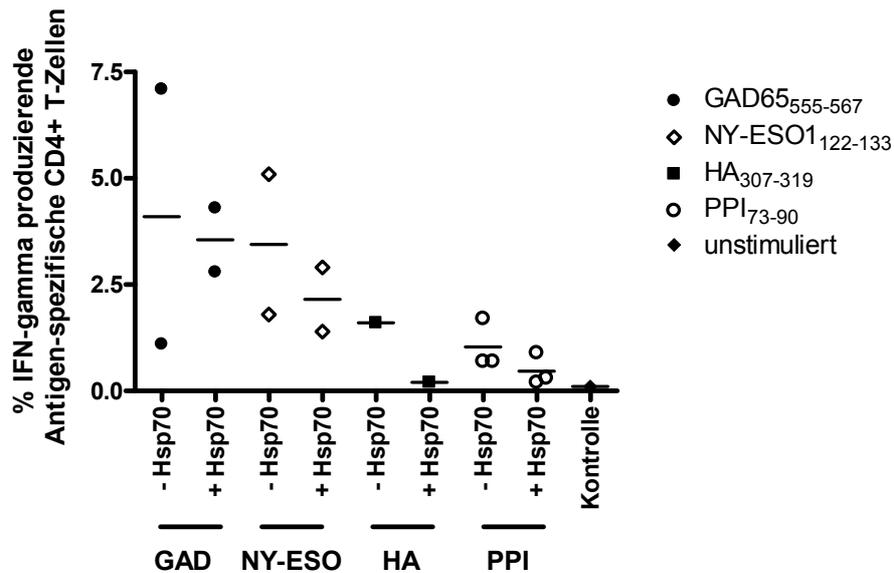


Abb. 21:

Graphische Darstellung der Tab. 8.

Prozentzahl antigenspezifischer IFN- γ -produzierender CD4⁺ T-Zellen in CD4⁺ T-Zell-Kulturen verschiedener gesunder HLA-DRB1*0401-positiver Donoren sowie eines gesunden HLA-DRB1*0404-positiven Donors nach *in vitro* Stimulation mit verschiedenen Peptiden in Hsp70-Komplexierung und ohne Hsp70. Hsp70-vermittelte Unterschiede der Anzahl antigenspezifischer IFN- γ -produzierender CD4⁺ T-Zellen. Jeder Punkt entspricht einem Messwert aus der Tab. 8.

Es zeigte sich im Gesamtdurchschnitt aller Donoren in den Cytokine Secretion Assays eine tendenziell geringere IFN- γ -Produktion bei den mit Peptid:Hsp70-Komplex stimulierten Zellen als bei den mit Peptid allein stimulierten Zellen. Unstimulierte Zellen (Negativkontrolle) produzieren kaum IFN- γ . Die Berechnung der P-Werte mittels eines gepaarten zweiseitigen T-Tests mit dem Programm GraphPad Prism 4.0 zeigte nur für die Cytokine Secretion Assays mit PPI₇₃₋₉₀ einen statistisch signifikanten Unterschied (P=0,0422) zwischen der Stimulation mit Peptid:Hsp70-Komplex versus Peptid allein. Für die anderen Peptide sind noch zu wenige Messergebnisse vorhanden, um eindeutige Aussagen zu treffen.

4.7.2 Messung von IL-5 und IFN- γ im Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Als weitere Methode zur Messung der von T-Zellen produzierten Zytokine wurde der Zytokingehalt mittels ELISA (s. 3.15) in den Überständen der T-Zellkulturen bestimmt. Es wurden die Zytokine IL-5 und IFN- γ in den Überständen der restimulierten Zellen gemessen, die 48 bis 72 h nach der Restimulation antigenspezifischer CD4⁺ T-Zellen produziert worden waren.

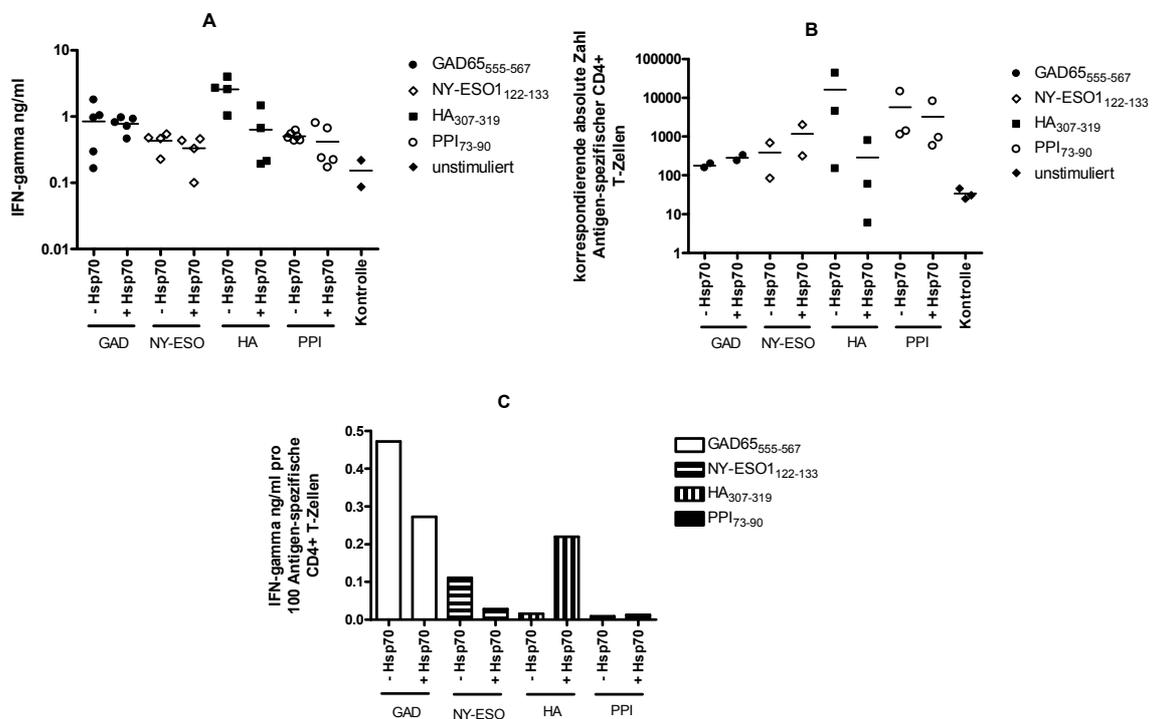


Abb. 22:

(A) Messung der IFN- γ -Sekretion im Zellkulturüberstand restimulierter CD4⁺ T-Zellen verschiedener Versuche von zwei HLA-DRB1*0401-positiven Donoren. Zellkulturüberstände restimulierter antigenspezifischer CD4⁺ T-Zellen wurden analysiert, die 48 bis 72 h nach Restimulation gewonnen wurden. Die Analyse des Zytokins IFN- γ erfolgte mittels ELISA (s. 3.15). Jeder Punkt entspricht einem Messwert im ELISA.

(B) Korrespondierende absolute Zahl antigenspezifischer CD4⁺ T-Zellen einen Tag vor Restimulation. Jeder Punkt entspricht der absoluten Zahl antigenspezifischer CD4⁺ T-Zellen in einem Versuch, wovon die Überstände (teilweise Mehrfachwerte) für die ELISA-Analyse abgenommen wurden.

(C) Verhältnis der Menge IFN- γ (Mittelwert aus A) bezogen auf 100 antigenspezifische CD4⁺ T-Zellen des Mittelwertes aus B, dargestellt als Zytokinproduktion in ng/ml pro 100 antigenspezifische CD4⁺ T-Zellen.

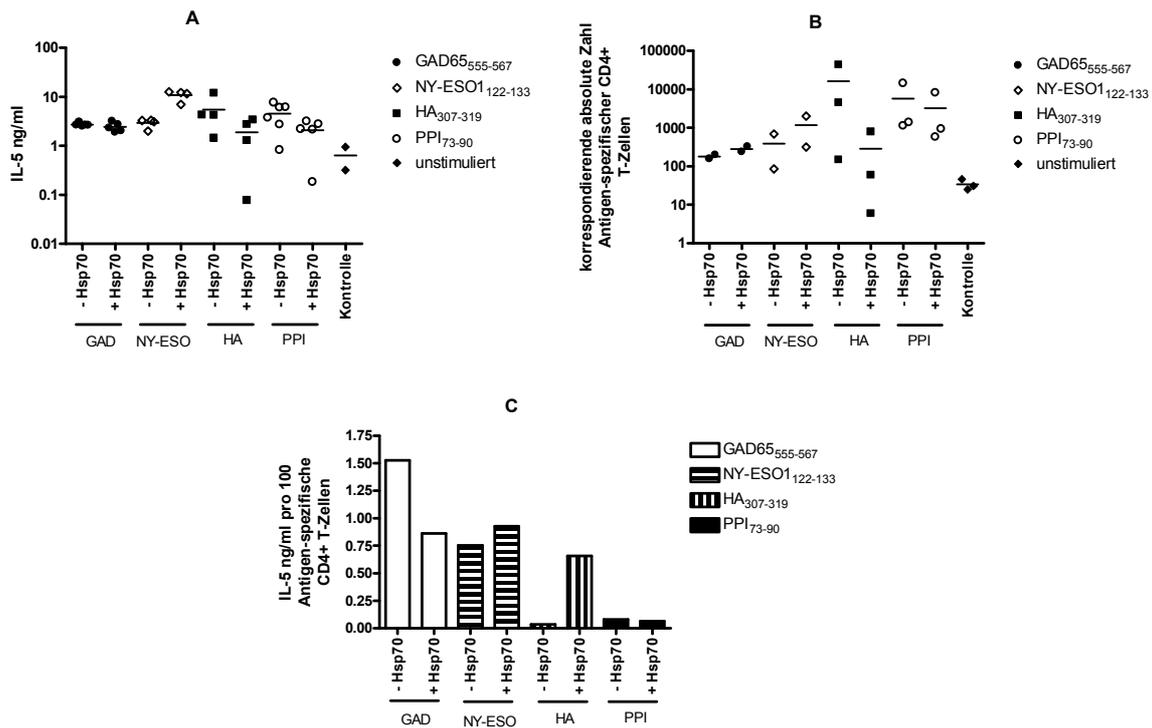


Abb. 23:

(A) Messung der IL-5-Sekretion im Zellkulturüberstand restimulierter CD4⁺ T-Zellen verschiedener Versuche von zwei HLA-DRB1*0401-positiven Donoren. Zellkulturüberstände restimulierter antigenspezifischer CD4⁺ T-Zellen wurden analysiert, die 48 bis 72 h nach Restimulation gewonnen wurden. Die Analyse des Zytokins IL-5 erfolgte mittels ELISA (s. 3.15). Jeder Punkt entspricht einem Messwert im ELISA.

(B) Korrespondierende absolute Zahl antigenspezifischer CD4⁺ T-Zellen einen Tag vor Restimulation. Jeder Punkt entspricht der absoluten Zahl antigenspezifischer CD4⁺ T-Zellen in einem Versuch, wovon die Überstände (teilweise Mehrfachwerte) für die ELISA-Analyse abgenommen wurden.

(C) Verhältnis der Menge IL-5 (Mittelwert aus A) bezogen auf 100 antigenspezifische CD4⁺ T-Zellen des Mittelwertes aus B, dargestellt als Zytokinproduktion in ng/ml pro 100 antigenspezifische CD4⁺ T-Zellen.

Wie aus dem Säulendiagramm C in den Abbildungen 22 und 23 ersichtlich ist, führt die Stimulation mit HA₃₀₇₋₃₁₉ und Hsp70 zu einer vermehrten Produktion sowohl von dem T_H1-Zytokin IFN- γ als auch von dem T_H2-Zytokin IL-5.

Während für die Auto- und Tumorantigene GAD65₅₅₅₋₅₆₇ und NY-ESO1₁₂₂₋₁₃₃ nach Stimulation mit Hsp70:Peptidkomplex weniger T_H1-Zytokin IFN- γ detektiert wurde. Dies ist in Übereinstimmung mit den entsprechenden Ergebnissen im CSA.

Für das T_H2-Zytokin IL-5 wurde eine Abnahme bei Stimulation mit GAD65₅₅₅₋₅₆₇

und Hsp70 beobachtet. NY-ESO1₁₂₂₋₁₃₃ führte mit Hsp70 zu einer statistisch signifikanten Zunahme von IL-5 ($P=0,0042$) bei Betrachtung der Stimulation mit Peptid:Hsp70-Komplex versus Peptid allein, wobei die Berechnung der P-Werte aus A der Abb. 23 mittels eines gepaarten zweiseitigen T-Tests mit dem Programm GraphPad Prism 4.0 durchgeführt wurde. Bei PPI₇₃₋₉₀ hat Hsp70 keinen Einfluss auf die Zytokinproduktion.

Insgesamt zeigt sich bei Betrachtung der Zytokinproduktion pro 100 antigenspezifische Zellen durch Hsp70 (C in den Abbildungen 22 und 23) keine Zunahme des T_H1-Zytokins IFN- γ außer bei HA₃₀₇₋₃₁₉. Zumindest für NY-ESO1₁₂₂₋₁₃₃ wird eine eindeutige T_H2-Antwort deutlich, wenn man für dieses Peptid auch die statistisch signifikante absolute Zytokin-Produktion (A in Abb. 23) miteinbezieht. Mit zwei verschiedenen Donoren kam in zwei unterschiedlichen Versuchen heraus, dass NY-ESO1₁₂₂₋₁₃₃-stimulierte Zellen mit Peptid:Hsp70-Komplex deutlich mehr IL-5 (statistisch signifikant: $P=0,0042$) und weniger IFN- γ produziert haben (A und C in den Abbildungen 22 und 23).

5. Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss von Hsp70 auf die Immunantwort im humanen System bei gesunden HLA-DR-typisierten Spendern im Zusammenhang mit (auto-) antigenen Peptiden untersucht. Die Kernfragen waren, welchen Einfluss Tregs bei der Expansion von antigenspezifischen T-Zellen *in vitro* haben, ob durch Hsp70-gebundenes Peptid autoreaktive T-Zellen verstärkt stimuliert sowie detektiert werden können und wie sich die Zytokinproduktion unter dem Einfluss von Hsp70 verändert.

Zur Beantwortung dieser Fragen wurden Proliferationsversuche mit isolierten CD4⁺ T-Zellen gesunder Spender durchgeführt und die mit sowie ohne Hsp70-Komplexierung generierten (auto-) antigenspezifischen humanen T-Zellen u. a. mittels HLA-DR-Tetramerfärbung analysiert.

Im Gesamtzusammenhang sollte ein möglicher Einfluss von Hsp70 auf die Pathogenese von Autoimmunkrankheiten wie z. B. dem Diabetes mellitus Typ 1 untersucht werden.

5.1 Auswahl der antigenen Peptide

Für die oben genannten Fragestellungen wurde die T-Zellaktivierung mit den antigenen Peptidsequenzen GAD65₅₅₅₋₅₆₇, PPI₇₃₋₉₀, NY-ESO1₁₂₂₋₁₃₃ und HA₃₀₇₋₃₁₉ untersucht, da diese im Kontext mit bestimmten HLA-DR-Allelen als antigen vorbeschrieben waren. Die Typen HLA-DRB1*0401 und HLA-DRB1*0404 sind reaktiv auf die verwendeten Peptide und das Epitop derselben passt in die Bindungsstelle dieser HLA-Typen, weshalb sie in der vorliegenden Arbeit untersucht wurden (Reijonen et al. 1999, Mandic et al. 2003, Haug et al. 2005, Yang et al. 2008, Gebe et al. 2006).

Das Diabetes mellitus Typ 1-assoziierte Autoantigen GAD65₅₅₅₋₅₆₇ bindet an die Bindungsstelle des HLA-DRB1*0401-Moleküls (Reijonen et al. 1999) sowie des HLA-DRB1*0404-Moleküls (Gebe et al. 2006) und ist somit für die entsprechende HLA-Bindung geeignet, da hierdurch das Peptid über das entsprechende HLA an T-Zellen mit dem entsprechendem TZR präsentiert

werden kann. Bei dem Autoantigen Präproinsulin₇₃₋₉₀ (PPI₇₃₋₉₀) handelt es sich um eine Teilsequenz aus dem C-Peptid des Proinsulins p73-90 mit Substitution von Serin anstatt Lysin in Position 88 für eine bessere HLA-DRB1*0401-Bindung (Yang et al. 2008). Aktuelle Studien deuten darauf hin, dass Insulin ein hauptsächliches Autoantigen für Diabetes mellitus Typ 1 ist und einige Untersuchungen haben Präproinsulin als ein immundominierendes CD4⁺ T-Zell-Epitop identifiziert (Yang et al. 2008). Das Alloantigen/Tumorantigen NY-ESO1₁₂₂₋₁₃₃ bindet ebenfalls an die Bindungsstelle des HLA-DRB1*0401-Moleküls (Mandic et al. 2003). Die Untersuchungen dieser Arbeitsgruppe unterstützen die Annahme der Immunogenität von NY-ESO1 und demonstrieren die Fähigkeit dieses Peptids CD4⁺ T_H1-Zellen zu stimulieren (Mandic et al. 2003). Das Influenza-Protein Hämagglutinin₃₀₇₋₃₁₉ (HA₃₀₇₋₃₁₉) weist eine HLA-DRB1*0401-Bindung auf und es wurde eine antigenspezifische Proliferation CD4⁺ T-Zellen nach Stimulation mit diesem Antigen gezeigt (Haug et al. 2005, Danke et al. 2003), weshalb HA₃₀₇₋₃₁₉ in der vorliegenden Arbeit gewissermaßen als Kontrolle mituntersucht wurde.

5.2 Einfluss der CD4⁺CD25⁺ regulatorischen T-Zellen auf die Anzahl autoreaktiver antigenspezifischer CD4⁺ T-Zellen

Danke et al. haben beschrieben, dass autoreaktive T-Zellen in gesunden Personen wahrscheinlich von CD4⁺CD25⁺ regulatorischen T-Zellen (Tregs) in ihrer Expansion gehemmt werden und dass nach Aufreinigung von CD4⁺CD25⁻ (Treg-depletierten) T-Zellen der Nachweis von autoantigenspezifischen CD4⁺ T-Zellen *in vitro* auch bei gesunden Spendern möglich war (Danke et al. 2004). Die Hypothese dieser Publikation war also, dass eine Depletion der Tregs notwendig scheint, um eine Proliferation autoreaktiver CD4⁺ T-Zellen auszulösen. In der vorliegenden Arbeit wurde daher der Einfluss von Tregs bei T-Zell-Proliferationsversuchen mit und ohne CD4⁺CD25⁺ regulatorischen T-Zellen untersucht. Vergleicht man die Ergebnisse dieser Versuche, zeigte sich bei den Treg-depletierten Zellen gesunder Donoren insgesamt weniger Proliferation autoreaktiver Zellen als bei Stimulation der gesamten CD4⁺

Population (s. 4.5), was somit im Widerspruch zu dieser Hypothese steht. Eine weitere, in der Zwischenzeit erschienene Arbeit derselben Arbeitsgruppe hat gezeigt, dass die Depletion der CD4⁺CD25⁺ regulatorischen T-Zellen nicht in jedem Fall notwendig ist, um eine Proliferation der autoreaktiven Zellen in Gesunden und Typ-1-Diabetikern auszulösen. Ganz im Gegenteil wurde die Hypothese aufgestellt, dass mit Depletion der Tregs auch die reaktiven/aktivierten Zellen entfernt werden. Ein statistisch nicht signifikanter Trend wurde beschrieben, wonach GAD65₅₅₅₋₅₆₇-reaktive T-Zellen von Patienten mit Typ-1-Diabetes ohne Treg-Depletion im Vergleich zu Gesunden vermehrt nachzuweisen sind (Danke et al. 2005). Dieser Trend der Ergebnisse von Danke et al. hat sich in der vorliegenden Arbeit übertragen auf den gesunden Spender in einigen der T-Zell-Versuche bestätigt, ist aber nicht eindeutig belegt (s. 4.5). In drei Versuchen wurden innerhalb eines Versuches Gesamt-CD4⁺ T-Zellen mit Treg-depletierten T-Zellen verglichen (s. Tab. 2 Versuche Nr. 6 und Nr. 7, Tab. 3 Versuch Nr. 13 sowie Abb. 9 und 10), wobei sich in einem Versuch bei stimulierten CD4⁺CD25⁻ T-Zellen kaum antigenspezifische CD4⁺ T-Zellen zeigten, wohingegen bei stimulierten Gesamt-CD4⁺ T-Zellen antigenspezifische T-Zellen nachweisbar waren und in zwei Versuchen kaum ein Unterschied zu beobachten war. Gelegentlich wurden weiterhin Gesamt-CD4⁺ und Treg-depletierte T-Zellen zum Vergleich in unterschiedlichen Versuchen analysiert, wobei sich der Trend weiter bestätigte, dass bei Gesamt-CD4⁺ T-Zellen mehr autoreaktive T-Zellen proliferieren (s. Abb. 17).

Lindley et al. haben berichtet, dass Tregs von frisch manifestierten Typ-1-Diabetikern im Vergleich zu Gesunden ihre suppressive Funktion gegenüber autoreaktiven T-Zellen weniger effektiv ausüben (Lindley et al. 2005). Aus diesen Ergebnissen könnte man interpretieren, dass bei Typ-1-Diabetikern mehr aktivierte und damit autoreaktive T-Zellen mit reduzierten Treg-Eigenschaften in der CD4⁺CD25⁺ Zellpopulation vorkommen. Bei Depletion der CD4⁺CD25⁺ T-Zellen würde man damit vor allem reaktive Zellen entfernen und somit den Nachweis proliferierender autoreaktiver CD4⁺ Zellen beeinträchtigen. Eine andere Untersuchung mit Typ-1-Diabetikern hat keine signifikanten

Unterschiede im Bezug auf die regulatorische Funktion CD4⁺CD25⁺ Zellen zwischen Gesunden und lang manifestierten Typ-1-Diabetikern beobachtet (Putnam et al. 2005). Diese Diskrepanz könnte an unterschiedlichen Herangehensweisen der Zellisolierung und der unterschiedlichen Krankheitsdauer der Diabetes-Patienten liegen.

Die vorliegenden Ergebnisse sind also mit der aktuellen Literatur in Übereinstimmung. Um die reaktiven/aktivierten Zellen im Zellpool zu behalten, wurden die Tregs in den meisten Versuchen daher nicht depletiert.

Zunächst wurden die Proliferationsversuche mit CFSE-gefärbten Zellen durchgeführt. Hierbei war einerseits das Problem aufgetreten, dass bei sehr kurzen Kulturzeiten keine antigenspezifischen T-Zellen detektiert wurden. Eine mögliche Ursache hierfür könnte sein, dass bei aktivierten Zellen T-Zell-Rezeptoren aufgrund der Peptid-Aktivierung bei sich schnell teilenden Zellen nur zu einem geringen Anteil an die Oberfläche kommen und erst bei langsamerer Teilung bzw. zur Ruhe kommenden Zellen wieder auf der Oberfläche zu detektieren sind (Novak et al. 2001, Macaubas et al. 2006). Deshalb wäre eine zu frühe Färbung mit HLA-DR Tetrameren nicht Erfolg versprechend. Andererseits macht sich bei längeren Kulturzeiten, die eigentlich für die erfolgreiche T-Zell-Kultur notwendig sind, die zytotoxische Wirkung von CFSE bemerkbar, was sich negativ auf die Vitalität der Zellen auswirkt. Bei Färbung mit Trypanblau (s. 3.3) waren die Zellen häufig nicht mehr vital und die Detektion von wenigen antigenspezifischen Zellen bei einem hohen Prozentsatz an toten Zellen weisen auf eine toxische Wirkung von CFSE hin. Um die Ergebnisse mit CFSE-gefärbten T-Zellen zu verbessern, wurden die Zellen nach unterschiedlichen Zellkulturzeiten analysiert (Daten nicht gezeigt) und als optimaler Mittelweg eine Kulturdauer von 7 Tagen gewählt (s. 4.2). Dennoch lieferten die Versuche mit CFSE-Färbung insgesamt keine optimalen Ergebnisse, weshalb vermehrt Versuche ohne CFSE-Färbung durchgeführt wurden. Wie in 4.2 dargestellt, kann auch bei den Versuchen ohne CFSE-Färbung davon ausgegangen werden, dass Tetramer-positive Zellen gleichzeitig proliferierte Zellen sind.

5.3 Einfluss von Hsp70 auf die Aktivierung antigenspezifischer CD4⁺ T-Zellen

Kernuntersuchung dieser Arbeit ist der Einfluss von Hsp70 auf die Proliferation (auto-) antigenspezifischer humaner CD4⁺ T-Zellen nach Peptidstimulation.

Hitzeschockproteine besitzen neben ihren Housekeeping-Funktionen eine wesentliche Funktion bei der Immunantwort. Sie beeinflussen sowohl die angeborene als auch die adaptive Immunität. Der Einfluss auf die MHC I-Antigenpräsentation ist bereits gut untersucht, die Rolle in der MHC II-Antigenpräsentation ist bislang weniger bekannt. Allerdings scheinen insbesondere HSPs der 70 kDa Klasse (Hsp70) in die MHC II-vermittelte Präsentation involviert zu sein (Haug et al. 2005, Schild et al. 1999, Suto et al. 1995, Mycko et al. 2004 und Doody et al. 2004). Die beschriebene direkte Interaktion von HSPs mit MHC II-Molekülen (Haug et al. 2007) könnte dabei in der MHC II-vermittelten Antigenpräsentation und CD4⁺ T-Zellaktivierung eine Rolle spielen. Die zugrunde liegende Hypothese ist, dass HSPs im humanen System als Träger von (auto-) antigenen Peptiden dienen können, ihre Übertragung auf MHC II-Moleküle erleichtern und damit die Peptid-Präsentation beeinflussen. Tobian et al. haben gezeigt, dass Hsp70 die MHC-II-Präsentation nur dann verstärkt, wenn das Peptid mit HSP komplexiert ist. Dies deutet darauf hin, dass die Schlüsselfunktion von diesem Hitzeschockprotein eher eine verstärkte Auslieferung oder Prozessierung chaperonierter antigener Peptide als eine generalisierte Verstärkung der Funktion antigenpräsentierender Zellen ist. Desweiteren verstärken HSPs die Aufnahme von Peptiden, die zu der vermehrten MHC-II-Präsentation beitragen können (Tobian et al. 2004).

Es wäre möglich, dass das Vorhandensein von HSP, z. B. nach dem Zelltod, in die Auslösung von Autoimmunerkrankungen involviert sein könnte, indem eine Immunreaktion auf ein mögliches autoantigenes Peptid durch HSP in Konzentrationen erleichtert wird, in denen die Peptide ohne HSP nicht immunogen wirken würden (Haug et al. 2005, Mycko et al. 2004, Millar et al. 2003, Pockley 2003, van Eden et al. 2005, Houlihan et al. 2009). Eine erhöhte Reaktivität von T-Zellen gegenüber dem gebundenen Peptid in einem

HSP:Peptid-Komplex versus eine Immunantwort durch T-Zellen gegen HSP selbst sind unterschiedliche Aspekte der möglichen Beteiligung von HSP an der Pathogenese von Autoimmunerkrankungen. Die Aufnahme von extrazellulärem HSP durch APZs könnte somit entweder in der Auslösung regulatorischer T-Zell-Antworten durch T-Zellen resultieren, die auf HSP reaktiv sind, oder in einer verstärkten Aktivierung von T-Zellen, die auf das durch Hsp70 chaperonierte Peptid in einem HSP:Peptid-Komplex Reaktivität zeigen. Die Balance zwischen diesen zwei Phänomenen könnte eine entscheidende Rolle im Hinblick auf die Auslösung und Remission dieser Krankheiten wie z. B. dem Diabetes mellitus Typ 1 spielen (Haug et al. 2005). Mittels HLA-DR-Tetramerfärbung wurde von Haug et al. mit T-Zellexperimenten in einem humanen antigenspezifischen Versuchsaufbau gezeigt, dass humanes stressinduzierbares Peptid-bindendes Hsp70 komplexiert mit dem antigenen Tetanus-Peptid TT₉₄₇₋₉₆₆ und dem Influenza-Protein Hämagglutinin₃₀₇₋₃₁₉ (HA₃₀₇₋₃₁₉) in niedrigen Konzentrationen die Präsentation antigener Peptide über MHC II und somit die Aktivierung von (allo-) antigenspezifischen CD4⁺ T-Zellen im humanen System verstärkt und folglich zu einer Proliferationsverstärkung alloreaktiver antigenspezifischer T-Lymphozyten führt (Haug et al. 2005). Zu dieser durch Hsp70 verstärkten MHC II Präsentation antigener Peptide und gesteigerten T-Zell-Immunantwort standen bisher nur wenige Daten, vor allem aus dem Tiermodell, zur Verfügung (Tobian et al. 2004, Mycko et al. 2004, Roth et al. 2002, Panjwani et al. 1999, DeNagel et al. 1992).

Einerseits könnte durch Hsp70 die Immunantwort auf Alloantigene wie das Tetanustoxin und Grippeviren wie *in vitro* gezeigt (Haug et al. 2005) bzw. diskutiert (Tobian et al. 2004), verstärkt werden und wäre damit z. B. als Adjuvans für Vakzine denkbar. Andererseits könnte dies unter Umständen aber auch zu einer verstärkten Reaktion gegenüber Autoantigenen und damit zu Autoimmunerkrankungen führen (Mycko et al. 2004 und 2008). Mycko et al. haben beschrieben, dass im Zusammenhang mit dem mutmaßlichen Haupt-Autoantigen der Multiplen Sklerose MBP (myelin basic protein) eine Überexpression von Hsp70 *in vitro* zu einer verstärkten Autoantigenerkennung, einer Verstärkung von Autoimmunantworten und somit zur Auslösung von

dieser Autoimmunkrankheit führen kann (Mycko et al. 2004). Dieselbe Arbeitsgruppe hat später in einem Mausmodell gezeigt, dass bei defektem Hsp70 kodierendem Gen und Sensibilisierung für experimentelle autoimmune Encephalomyelitis (EAE) mit dem MOG-Peptid (myelin oligodendrocyte glycoprotein) eine fast komplette Resistenz gegen EAE besteht und Hsp70 somit bei der Auslösung dieser Krankheit einen gefährlichen immunstimulatorischen Beitrag leistet. Die Hsp70-Defizienz war außerdem assoziiert mit einer Dysfunktion in der Aktivierung autoreaktiver T-Zellen. Ferner beschreiben sie einen generalisierten, durch Hsp70 vermittelten Effekt in der Erkennung von Antigenen und Autoantigenen, der das Zytokinmuster der Immunantwort und damit die Autoimmunreaktion beeinflusst (Mycko et al. 2008).

Zwei weitere Arbeitsgruppen haben demonstriert, dass HSPs eine andere wichtige Rolle im Zusammenhang mit Autoimmunkrankheiten wie dem Diabetes mellitus Typ 1 spielen, eventuell sogar therapeutisch bzw. präventiv genutzt werden könnten um immunregulatorische Stimulationswege zu triggern und so autoimmune Krankheiten zu unterdrücken (van Eden et al. 2007). Hier wird also eine immunmodulatorische Wirkung beschrieben. Die Untersuchungen dieser Arbeitsgruppe wurden allerdings mit Hsp60 durchgeführt, welches im Gegensatz zu dem in der vorliegenden Arbeit untersuchten Hsp70 kein Peptid bindet und somit unterschiedliche Phänomene betrachtet wurden. Es handelt sich viel mehr um ein weiteres Phänomen von HSP-Einflussmöglichkeiten im Gegensatz zu dem oben beschriebenen Effekt, dass das Peptid-bindende Hsp70 bei der Auslösung von Autoimmunkrankheiten eine immunstimulatorische Rolle spielt.

Burkart et al. haben eine unzureichende Hsp70-Antwort bei Stress in Leukozyten im Zusammenhang mit dem Beginn des Diabetes mellitus Typ 1 beschrieben, wobei die Hitze-induzierten Hsp70-Spiegel in PBMCs nur 25 % derer von Gesunden erreichten, was für einen protektiven Effekt von Hsp70 sprechen würde. Desweiteren wurde beobachtet, dass eine Hyperthermie-induzierte Hsp70-Expression durch das T_H1-assoziierte Zytokin IFN- γ gesenkt und durch das T_H2-assoziierte TGF- β erhöht wurde. Daraus wird geschlossen,

dass eine beeinträchtigte zelluläre HSP-Stressantwort, also eine HSP-Insuffizienz, verstärkt durch das entzündliche Milieu beim Beginn des Diabetes mellitus Typ 1, zur Manifestation der Erkrankung beiträgt (Burkart et al. 2008).

Die beiden oben beschriebenen und bei Haug et al. 2005 diskutierten unterschiedlichen Aspekte der möglichen Beteiligung von HSP an der Pathogenese von Autoimmunerkrankungen, die erhöhte T-Zell-Reaktivität gegen HSP:Peptidkomplexe versus eine Autoimmunantwort gegen HSP selbst, könnten die folgende Hypothese vorstellbar machen. Die durch Burkart et al. 2008 postulierte HSP-Insuffizienz könnte durch die von Haug et al. 2005 diskutierte Autoimmunantwort gegen HSP selbst entstehen.

In der vorliegenden Arbeit sollte nun untersucht werden, ob Hsp70-Moleküle auf die CD4⁺ T-Zellantwort gegenüber (auto-) antigenen Peptidsequenzen einen Einfluss ausüben und damit bei der Pathogenese von Autoimmunerkrankungen wie z. B. dem Diabetes mellitus Typ 1 beteiligt sein könnten. Hierfür wurde die Stimulation von humanen CD4⁺ T-Zellen mit verschiedenen (auto-) antigenen Peptiden allein und nach der Stimulation mit humanem Stress-induzierbarem Hsp70 komplexiert mit verschiedenen Peptiden verglichen. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass Hsp70 in Komplexierung mit verschiedenen (auto-) antigenen Peptiden bei der Stimulation von T-Zellen einen Einfluss hat.

5.3.1 Proliferationsveränderung durch Stimulation mit Peptid:Hsp70-Komplex bei Aktivierungsversuchen mit T-Zellen

Insgesamt wurden Zellen von sechs gesunden Donoren bei annähernd gleichen Kulturbedingungen untersucht, davon zeigten fünf den Haplotyp HLA-DRB1*0401 und eine Person HLA-DRB1*0404. Zellen eines Donors mit dem HLA-DRB1*0401-Haplotyp zeigten nur auf Stimulation mit HA₃₀₇₋₃₁₉ eine Reaktion. Eine genaue Auflistung der Peptidreaktivität der verschiedenen Donoren ist Tab. 1 zu entnehmen.

Wie aus Abb. 17 ersichtlich ist, führt im Gesamtdurchschnitt aller verwertbaren Versuche bei allen Donoren die Stimulation CD4⁺ T-Zellen mit dem Diabetes

mellitus Typ 1-assoziierten Autoantigen GAD65₅₅₅₋₅₆₇ + Hsp70 tendenziell zu einer Zunahme der Zahl antigenspezifischer CD4⁺ T-Zellen. Die entsprechende Stimulation CD4⁺CD25⁻ T-Zellen bewirkt dagegen eher eine Abnahme der Zahl antigenspezifischer CD4⁺ T-Zellen. Bei Stimulation CD4⁺ T-Zellen mit dem Alloantigen/Tumorantigen NY-ESO1₁₂₂₋₁₃₃ + Hsp70 sieht es folgendermaßen aus: Es kommt zu einer Abnahme der Zahl antigenspezifischer CD4⁺ T-Zellen, wobei die entsprechende Stimulation CD4⁺CD25⁻ T-Zellen eine Zunahme der Zahl antigenspezifischer CD4⁺ T-Zellen bewirkt. Die Stimulation mit dem Influenza-Protein HA₃₀₇₋₃₁₉ + Hsp70 bewirkt eher eine Abnahme der Zahl antigenspezifischer CD4⁺ T-Zellen. Die entsprechende Stimulation CD4⁺CD25⁻ T-Zellen führt hingegen zu einer leichten Zunahme der Zahl antigenspezifischer CD4⁺ T-Zellen. Stimulation CD4⁺ T-Zellen mit dem Präproinsulin₇₃₋₉₀ + Hsp70 zeigt eine Abnahme der Zahl antigenspezifischer CD4⁺ T-Zellen.

Die Berechnung der P-Werte zeigte für die Proliferationsversuche keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen der Stimulation mit Peptid:Hsp70-Komplex versus Peptid allein. Diese uneinheitlichen Ergebnisse bezüglich des Einflusses von Hsp70 auf die Proliferation antigenspezifischer Zellen nach der Stimulation mit den verschiedenen Peptiden könnte einerseits damit in Zusammenhang gebracht werden, dass die Methode nicht optimal oder die Anzahl verwertbarer Versuche noch zu niedrig ist. Andererseits könnte es möglicherweise daran liegen, dass verhältnismäßig zu hohe Peptidkonzentrationen eingesetzt wurden (meist 10 µg/ml), während der HSP-Effekt bei Haug et al. bei einer niedrigen Peptidkonzentration von 0,1 µg/ml oder 0,01 µg/ml als maximal beschrieben ist (Haug et al. 2005). Dafür spricht z. B. dass mit dem HA₃₀₇₋₃₁₉-Peptid in den Konzentrationen der vorliegenden Versuche tendenziell keine Verstärkung gesehen wird, ein verstärkender HSP-Effekt aber bereits vorbeschrieben war (Haug et al. 2005). Eventuell kann dieses Phänomen dadurch erklärt werden, dass bei hohen Konzentrationen freies Peptid im Verhältnis zu HSP-gebundenem Peptid im Überschuss vorliegt und der HSP-Effekt dadurch nicht zu beobachten ist. Um diese Theorie zu untersuchen, wurden Versuche mit unterschiedlichen Peptidkonzentrationen durchgeführt (s. Abb. 7 und 8), wobei mit niedrigeren Peptidkonzentrationen

nicht genügend autoantigenspezifische Zellen erzielt werden konnten. Daher waren keine Versuche mit niedrigeren Peptidkonzentrationen erfolgreich.

Eine weitere denkbare Möglichkeit wäre, dass Hsp70 bei Autoantigenen möglicherweise keine Verstärkung bewirkt. Insgesamt konnte in dieser Arbeit jedenfalls gezeigt werden, dass autoantigenspezifische T-Zellen gegenüber verschiedenen Autoantigenen (GAD65₅₅₅₋₅₆₇, PPI₇₃₋₉₀) detektiert werden können und in den meisten Versuchen Unterschiede bei Stimulation mit und ohne Hsp70 bestehen.

Bei Versuchen mit HA₃₀₇₋₃₁₉ konnte durch die relativ hohe Peptid-Konzentration von 10 µg/ml nach obiger Theorie die Verstärkung durch Hsp70 nicht beobachtet werden.

Ausserdem könnte ein mögliches Problem sein, dass Hsp70 unterschiedlich starke Affinitäten zu den verschiedenen antigenen Peptiden hat.

Dass Hsp70 einen Einfluss auf die Stimulation mit PPI₇₃₋₉₀ zeigt ist insofern erstaunlich, da dieses Peptid nicht an Hsp70 zu binden scheint, wie im Europium-Fluoreszenz-Assay demonstriert (s. Abb. 11 und 4.6, außerdem beschrieben in Haug et al. 2005). Eine Möglichkeit dies zu erklären wäre, dass die gemeinsame Inkubation von Peptid und Hsp70 mit der APZ zu einer sterischen Behinderung durch das hinzugefügte Hsp70 führt und damit weniger Peptid von der Zelle aufgenommen werden kann. Es wäre auch möglich, dass freies Hsp70 die Aufnahme bzw. Präsentation von Peptid z. B. durch direkte Bindung an das HLA-DR-Molekül verhindert. Die Bindung von HLA-DRB1*0401 und Hsp70 konnte in einer Arbeit von Haug et al. gezeigt werden (Haug et al. 2005). Peptide die an HSP binden wirken möglicherweise immunogener (zusammengefasst in Mycko et al. 2008), wohingegen bei Nicht-binden eher ein protektiver Effekt eintritt, wie in 5.3 im Zusammenhang mit dem nicht-Peptid-bindenden Hsp60 angeführt wurde.

Bei Stimulation von CD4⁺ Zellen mit NY-ESO1₁₂₂₋₁₃₃ war es eindeutig, dass eine Vorinkubation mit Hsp70 fast immer zu einer Abnahme der Zahl antigenspezifischer Zellen führte. Auch dies könnte an einer niedrigen Affinität liegen, welche von Markus Haug gezeigt wurde (s. Abb. 11).

Eine weitere, eventuell auch zusätzliche Möglichkeit wäre, dass wie bei Lindley

et al. beschrieben, die regulatorischen Zellen bei den verschiedenen Donoren unterschiedlich effektiv sind (Lindley et al. 2005), sich daher der Einfluss von Hsp70 bei den Einen stärker auswirken kann und antigenspezifische Zellen unter dem Einfluss von Hsp70 besser proliferieren können als bei den Anderen. Dieses Phänomen könnte auch eine Erklärung für die unterschiedlichen Ergebnisse mit und ohne Tregs der Aktivierungsversuche der verschiedenen Donoren der vorliegenden Arbeit sein.

Insgesamt hat die Stimulation mit Hsp70-gebundenen (auto-) antigenen Peptiden in dieser Arbeit nicht zu einer eindeutigen Zunahme der Anzahl (auto-) antigenspezifischer CD4⁺ T-Zellen bei gesunden Spendern geführt. Um dennoch weitere Informationen über einen Hsp70-Einfluss auf die mit oder ohne Hsp70 generierten T-Zellen zu erhalten, wurden die Zellen hinsichtlich ihrer Zytokinproduktion charakterisiert.

5.4 Einfluss von Hsp70 auf das Zytokinmuster im Zusammenhang mit Aktivierungsversuchen antigenspezifischer CD4⁺ T-Zellen

Autoimmunerkrankungen sind meist T_H1-dominiert. In der Literatur sind vielerlei HSP-Effekte beschrieben, die im Sinne einer höheren T_H1-Antwort polarisieren (z. B. Wan et al. 2004). Mit Hsp70 wäre daher eine höhere T_H1-Antwort zu erwarten, die bei autoimmunen Reaktionen beobachtet wird. Da T_H1-Zellen IFN- γ , IL-2 sowie TNF- α produzieren und T_H2-Zellen IL-4, IL-5, IL-10 und IL-13 (Romagnani 1999, Bashyam 2007, Annunziato et al. 2009), wäre unter dem Einfluss von Hsp70 eine erhöhte IFN- γ -Produktion und eine erniedrigte IL-5-Produktion zu erwarten, da IFN- γ das Wachstum der T_H2-Zellen hemmt. Insbesondere bei den Proliferationsversuchen mit GAD65₅₅₅₋₅₆₇ und HA₃₀₇₋₃₁₉ liegen im Zusammenhang mit Hsp70 und der detektierten Zahl antigenspezifischer Zellen uneinheitliche Ergebnisse vor (s. 5.3.1). Daher war es von Interesse mittels einer weiteren Methode zusätzlich zu den Proliferationsversuchen das Zytokinmuster der stimulierten Zellen zu untersuchen, um eindeutiger zwischen T_H1- und T_H2-Zytokinmustern differenzieren zu können und so festzustellen, ob Hsp70 einen Einfluss auf die

Immunantwort der aktivierten T-Zellen hat. Dies wurde mittels eines IFN- γ -Cytokine Secretion Assays (CSA) und eines IFN- γ - bzw. IL-5-ELISAs durchgeführt.

5.4.1 Veränderungen des IFN- γ Zytokinmusters durch Stimulation mit Peptid:Hsp70-Komplex im Cytokine Secretion Assay (CSA)

Im Cytokine Secretion Assay wird die IFN- γ -Zytokinproduktion vitaler antigenspezifischer CD4⁺ T-Zellen gemessen, indem das Zytokin durch einen Antikörper auf der Zelloberfläche gebunden wird und mittels FACS direkt detektiert werden kann (s. 3.14).

Mit dieser Methode zeigte sich bei allen drei untersuchten HLA-DRB1*0401-positiven Donoren und dem HLA-DRB1*0404-Donor im Gesamtdurchschnitt aller Cytokine Secretion Assays bis auf einen Versuch mit GAD65₅₅₅₋₅₆₇ kontinuierlich eine geringere IFN- γ -Produktion bei den mit Peptid:Hsp70-Komplex stimulierten Zellen als bei den mit Peptid allein stimulierten Zellen, wobei die Peptide GAD65₅₅₅₋₅₆₇, NY-ESO1₁₂₂₋₁₃₃, HA₃₀₇₋₃₁₉ und PPI₇₃₋₉₀ untersucht wurden (s. Abb. 21). Die Berechnung der P-Werte zeigte nur für die Cytokine Secretion Assays mit PPI₇₃₋₉₀ einen statistisch signifikanten Unterschied (P=0,0422) zwischen der Stimulation mit Peptid:Hsp70-Komplex versus Peptid allein. Für die anderen Peptide sind noch zu wenige Messergebnisse vorhanden, um eindeutige Aussagen zu treffen.

Da es sich bei GAD65₅₅₅₋₅₆₇ um ein autoimmun-assoziiertes Autoantigen handelt, würde man durch diese Begebenheit, wie einleitend in 5.4 beschrieben, eine T_H1-Antwort erwarten. Diese müsste durch Hsp70 betont werden und somit durch dieses Protein eine noch höhere T_H1-Antwort (mehr IFN- γ -Produktion) zur Folge haben, da HSPs wie z. B. bei Wan et al. 2004 beschrieben, im Sinne einer höheren T_H1-Antwort polarisieren. Diese Hypothese wird dadurch untermauert, dass eine T_H1-Antwort durch hohe Antigen-Konzentrationen und eine T_H2-Antwort durch niedrige Antigen-Konzentrationen begünstigt wird (Holzer et al. 2003), wobei in den angeführten Versuchen der vorliegenden Arbeit verhältnismäßig hohe Antigen-

Konzentrationen eingesetzt wurden. Bei NY-ESO1₁₂₂₋₁₃₃ könnte man ebenfalls durch Hsp70 mit einer höheren T_H1-Antwort rechnen, da es ein Tumorantigen ist. In einem Mausmodell wurde gezeigt, dass Hsp70-angereicherte Exosomen im Zusammenhang mit Tumorantigenen eine starke T_H1-Antwort auslösen (Cho et al. 2009). Auch Wan et al. beschrieben den Effekt von einem Hsp70 in Struktur und Funktion sehr ähnlichen Protein (Hsp70L1) als polarisierend im Sinne einer höheren T_H1-Antwort im Zusammenhang mit anti-Tumor- und anti-Infektions-Immunität, wobei die Experimente mit Ovalbumin durchgeführt wurden (Wan et al. 2004). Ebenso im Zusammenhang mit HA₃₀₇₋₃₁₉ würde man nach obiger Theorie durch die verhältnismäßig hohe Antigen-Konzentration (Holzer et al. 2003) und der T_H1-Polarisierung durch Hsp70 (Wan et al. 2004) eher mit einer verstärkten T_H1-Antwort rechnen. Dass Hsp70 einen Einfluss auf die Zytokinproduktion nach Stimulation mit PPI₇₃₋₉₀ zeigt ist insofern erstaunlich, da dieses Peptid nicht an Hsp70 zu binden scheint (s. 5.3.1). Die Überlegungen hierzu wurden bereits in dem genannten Abschnitt diskutiert.

Die mit dem Cytokine Secretion Assay gemessenen IFN- γ -Werte lassen also, im Gegensatz zu vorausgegangenen Publikationen, nicht den Schluss zu, dass Hsp70 zu T_H1-Zellen polarisiert.

5.4.2 Veränderungen des IFN- γ und IL-5 Zytokinmusters durch Stimulation mit Peptid:Hsp70-Komplex im Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Mit dieser Methode zeigte sich im Durchschnitt aller Versuche eine geringere IFN- γ -Produktion bei den mit Peptid:Hsp70-Komplex stimulierten Zellen als bei den mit Peptid allein stimulierten Zellen (s. Abb. 22). Ähnlich verhält es sich mit der IL-5 Produktion, außer nach Stimulation mit NY-ESO1₁₂₂₋₁₃₃ + Hsp70. Hier wurde eine deutlich vermehrte, statistisch signifikante (P=0,0042) Zytokinproduktion beobachtet (s. Abb. 23). Hervorstechend ist dabei das Ergebnis, dass mit zwei verschiedenen Donoren in zwei unterschiedlichen Versuchen NY-ESO1₁₂₂₋₁₃₃-stimulierte Zellen mit Peptid:Hsp70-Komplex deutlich mehr IL-5 und weniger IFN- γ produziert haben, also im Sinne einer

T_H2-Sekretion. Dies ist in Übereinstimmung mit den CSA-Ergebnissen, wobei eine verringerte IFN- γ -Produktion (reduzierte T_H1-Antwort) beobachtet wurde. Allerdings würde man auch hier bei dem autoimmun-assoziierten Autoantigen GAD65₅₅₅₋₅₆₇ mit Hsp70 eine höhere T_H1-Antwort erwarten, also mehr IFN- γ -Produktion und erniedrigte IL-5-Produktion, da T-Zellen durch Hsp70, wie vorbeschrieben, zur Sekretion von T_H1-Zytokinen induziert werden. Tian et al. zeigten, dass Mäuse, die mit dem GAD65-Peptid behandelt wurden, eine erniedrigte IFN- γ - und eine erhöhte IL-5-Produktion im Sinne einer T_H2-Antwort aufwiesen (Tian et al. 1996). Hierbei wurde der Einfluss von Hsp70 allerdings nicht untersucht und lässt man diesen außen vor, gibt es im Hinblick auf die Zytokin-Antwort des Autoantigens GAD65 in der Literatur also widersprüchliche Angaben.

Möglicherweise ist das Zytokinmuster der T-Helferzellen schon weitgehend festgelegt und dadurch gelingt die Polarisierung bei einmaliger Stimulation mit Hsp70 eventuell nicht. In diesem Zusammenhang könnten auch die spezifischen Transkriptionsfaktoren GATA-3 und T-bet eine entscheidende Rolle spielen. T-bet ist ein T_H1-spezifischer Transkriptionsfaktor, der die IFN- γ -Expression stimuliert und gleichzeitig der T_H2-Entwicklung entgegenwirkt. Ein T_H2-spezifischer Transkriptionsfaktor ist GATA-3. GATA-3 stimuliert die Transkription von T_H2-Zytokingenen und hemmt die von T_H1-Zytokingenen (Hwang et al. 2005, Rengarajan et al. 2000).

Wie in 5.4.1 beschrieben, könnte man auch bei NY-ESO1₁₂₂₋₁₃₃ durch Hsp70 mit einer höheren T_H1-Antwort rechnen, da es ein Tumorantigen ist (Wan et al. 2004). Bei diesem Tumor-assoziierten Antigen NY-ESO1₁₂₂₋₁₃₃ bewirkt Hsp70 in den vorliegenden Ergebnissen eine vermehrte T_H2-Antwort im Vergleich zum antigenen Peptid allein. Qian et al. haben beschrieben, dass NY-ESO1 als Tumorantigen ein idealer Angriffspunkt für eine Immuntherapie zu sein scheint, da es eine Schlüsselrolle in der Auslösung einer zellulären und humoralen Immunantwort gegen NY-ESO1-exprimierende Tumoren spielt (Qian et al. 2004). Diese Untersuchung bekräftigt die Relevanz von Untersuchungen zu Impfstoffen mit dem NY-ESO1-Epitop für Patienten mit NY-ESO1-exprimierenden Tumoren sowie Strategien zu finden, um das T_H1-dominierte

Tumor-reaktive CD4⁺ T-Zell-Gleichgewicht zu verbessern. Aus den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit könnte man schließen, dass Hsp70 möglicherweise die Polarisierung in Richtung T_H2 verändert und somit in diesem Zusammenhang einen negativen Effekt auf die T_H1-vermittelten zytotoxischen Effekte hätte. Im Rahmen der oben erwähnten Immuntherapie könnte es damit sinnvoll sein, die Hsp70-Spiegel niedrig zu halten. Zwei andere Arbeitsgruppen haben in der Zwischenzeit erfolgreich Versuche zu diesen Impfungen durchgeführt (Kwataba et al. 2007, Gnjatic et al. 2009), bei denen Hsp70 eine Rolle spielen könnte.

In der vorliegenden Arbeit konnte noch kein eindeutiges Ergebnis mit Proliferationsversuchen im Zusammenhang mit Hsp70 erzielt werden. Möglicherweise existieren Unterschiede bei der T_H1/T_H2-Balance der aktivierten Zellen mit und ohne Hsp70. Auch dies würde für den Einfluss von Hsp70 auf die Pathogenese autoimmuner Erkrankungen sprechen. Die Problematik der hier gezeigten Versuche ist vermutlich, dass sie mit geringeren Peptidkonzentrationen nicht durchgeführt werden konnten, da sehr niedrige Zahlen antigenspezifischer Zellen erhalten wurden und dass Unterschiede auf alle Fälle nicht ausgeschlossen werden können, wie sich in den Zytokinversuchen gezeigt hat. Dieses Problem könnte man vielleicht angehen, indem man versucht, durch mehrfache Restimulation eine spezifische Zelllinie mit einer deutlich erhöhten Anzahl antigenspezifischer Zellen zu erhalten.

5.5 Einordnung im Kontext aktueller Literatur und Ausblick

Erste Hinweise für eine immunregulatorische Rolle von HSPs im Zusammenhang mit Autoimmunerkrankungen wurde von van Eden et al. 1985 durch die Analyse von T-Zellantworten in einem Arthritis-Rattenmodell und die Beobachtung, dass Immunisierungen mit HSP-Molekülen in verschiedenen Tiermodellen vor Arthritis schützen konnten, erlangt (van Eden et al. 1985). Seither wurden Immunantworten gegen HSPs gefunden, die sich aus Entzündung in verschiedenen Krankheitsmodellen und menschlichen Autoimmunkrankheiten wie z. B. dem Diabetes mellitus Typ 1 ergeben.

Wie in 5.3 beschrieben, haben Mycko et al. gezeigt, dass eine Überexpression von Hsp70 *in vitro* zur Auslösung der Autoimmunkrankheit Multiple Sklerose (MS) führen kann (Mycko et al. 2004) und im Mausmodell, dass Hsp70 bei der Auslösung der EAE einen gefährlichen immunstimulatorischen Beitrag leistet (Mycko et al. 2008).

Burkart et al. haben gezeigt, dass eine beeinträchtigte zelluläre HSP-Stressantwort, verstärkt durch das entzündliche Milieu beim Beginn des Diabetes mellitus Typ 1, zur Manifestation der Erkrankung beiträgt, was auf einen protektiven Effekt von Hsp70 hindeutet (Burkart et al. 2008).

Eine andere Arbeitsgruppe hat eine immunmodulatorische Wirkung von Hsp60 demonstriert, welches möglicherweise therapeutisch bzw. präventiv verwendet werden könnte um immunregulatorische Stimulationswege zu triggern und so autoimmune Krankheiten zu unterdrücken (van Eden et al. 2007). Hsp60 bindet allerdings im Gegensatz zu Hsp70 kein Peptid, es wurden also unterschiedliche Phänomene analysiert.

Dies alles unterstreicht, dass HSPs einerseits eine gefährliche immunstimulatorische Rolle bei der Auslösung von Autoimmunkrankheiten wie MS und EAE spielen, was im Rahmen der vorliegenden Arbeit übertragen im Hinblick auf den Diabetes mellitus Typ 1 untersucht wurde und andererseits eine immunmodulatorische und protektive Funktion im Zusammenhang mit Autoimmunkrankheiten wie dem Diabetes mellitus Typ 1 übernehmen. Längerfristig wäre es spannend, die vorliegende Arbeit auf die Untersuchung von Patienten mit verschiedenen Autoimmunerkrankungen wie z. B. dem Diabetes mellitus Typ 1 zu erweitern. So könnte man die Rolle von HSPs bei diesem Krankheitsbild am Patienten weiter klären und festlegen, wie diese Proteine therapeutisch bzw. präventiv beeinflusst werden könnten, um entweder die auslösende Wirkung von Hsp70 zu vermeiden, z. B. indem man die Spiegel desselben niedrig hält oder den immunmodulatorischen Effekt von Hsp60 zu unterstützen, z. B. durch zusätzliche Applikation (Impfung) von diesem Protein. Außerdem könnte man den im Zusammenhang mit der Publikation von Burkart et al. 2008 vermuteten protektiven Effekt von Hsp70 im Zusammenhang mit Diabetes mellitus Typ 1 genauer betrachten.

In Zusammenschau der Ergebnisse der oben genannten Arbeitsgruppen, denen von Haug et al. 2005 und 2007, von Danke et. al 2004 und 2005 sowie denen der vorliegenden Arbeit wäre eine genaue Untersuchung weiterer Zytokine im Zusammenhang mit HSPs z. B. mittels Cytometric bead array (CBA) oder eines anderen (Multiplex-)Assays, bei dem Profile verschiedener Zytokine in einer einzigen Probe untersucht werden können interessant, um das Zytokinmuster noch genauer eingrenzen und bestätigen zu können. Damit würden die Ideen der hier zitierten Arbeitsgruppen in einem etwas abgeänderten Setting neu aufgegriffen und erweitert sowie der Einfluss von HSPs auf die Pathogenese autoimmuner Erkrankungen im Kontext des Diabetes mellitus Typ 1 am Patienten beleuchtet. Hierdurch käme man der Prävention und Therapie verschiedener Autoimmunerkrankungen vielleicht einen kleinen Schritt näher.

6. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde der Hsp70-Einfluss auf die Immunantwort im humanen System im Zusammenhang mit autoantigenen Peptiden untersucht. Mittels HLA-DR Tetrameren wurde *in vitro* die spezifische CD4⁺ T-Zellantwort gesunder HLA-typisierter Spender auf autoantigene Peptide charakterisiert. Die Kernfragen waren, welchen Einfluss Tregs auf die Expansion antigenspezifischer T-Zellen haben, ob durch Hsp70-gebundenes Peptid autoantigenspezifische CD4⁺ T-Zellen verstärkt aktiviert werden und wie Hsp70 die Zytokinproduktion der T-Zellen verändert. Es wurde gezeigt, dass die Depletion der Tregs nicht in jedem Fall notwendig ist, um eine Proliferation der autoreaktiven T-Zellen auszulösen. Hsp70 scheint in Komplexierung mit autoantigenen Peptiden bei der Stimulation von CD4⁺ T-Zellen einen Einfluss zu haben, allerdings statistisch nicht signifikant. In einem durchflusszytometrischen Zytokinassay wurde, bei Stimulation mit Peptid:Hsp70-Komplex eine gegenüber Stimulation mit Peptid alleine, verringerte Produktion des pro-inflammatorischen T_H1-Zytokins IFN- γ im Sinne einer T_H2-Antwort gezeigt. Dies wurde im Zytokin-ELISA mit einer zweiten Methode und zusätzlich anhand von IL-5 bestätigt. Für das T_H2-Zytokin IL-5 wurde bei einem tumorassoziierten Antigen eine statistisch signifikant vermehrte Produktion gemessen. Insgesamt wurde kein eindeutiger Hsp70-Effekt auf die autoantigenspezifische CD4⁺ T-Zellaktivierung gezeigt, vermutlich weil die Versuche mit sehr hohen Peptidkonzentrationen durchgeführt werden mussten, um antigenspezifische Zellen zu detektieren. Ein Einfluss von Hsp70 kann nicht ausgeschlossen werden, wie die Versuche zur Zytokinproduktion gezeigt haben. Möglicherweise beeinflusst Hsp70 die Zytokinproduktion und damit die T_H1/T_H2-Balance der aktivierten Zellen zur T_H1-Polarisierung. Dies würde neben Beobachtungen anderer Arbeitsgruppen für den Einfluss von Hsp70 auf die Pathogenese autoimmuner Erkrankungen sprechen. Hsp70 spielt einerseits eine gefährliche immunstimulatorische Rolle bei der Auslösung von Autoimmunkrankheiten wie möglicherweise dem Diabetes Typ 1, was bei MS und EAE vorbeschrieben ist. Andererseits hat Hsp60 eine immunmodulatorische und protektive Wirkung. Die Beeinflussung der HSP-Spiegel könnte daher immuntherapeutisch/präventiv genutzt werden.

7. Literaturverzeichnis

Aderem,A. and Ulevitch,R.J., Toll-like receptors in the induction of the innate immune response. *Nature* 2000. **406**: 782-787.

Akira,S. and Takeda,K., Toll-like receptor signalling. *Nat.Rev.Immunol.* 2004. **4**: 499-511.

Annunziato,F., Cosmi,L., Liotta,F., Maggi,E., and Romagnani,S., Human Th17 cells: are they different from murine Th17 cells? *Eur.J.Immunol.* 2009. **39**: 637-640.

Asea,A., Kabingu,E., Stevenson,M.A., and Calderwood,S.K., HSP70 peptidembearing and peptide-negative preparations act as chaperokines. *Cell Stress.Chaperones.* 2000. **5**: 425-431.

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

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

Bashyam,H., Th1/Th2 cross-regulation and the discovery of IL-10. *J.Exp.Med.* 2007. **204**: 237.

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

Bausero,M.A., Gastpar,R., Multhoff,G., and Asea,A., Alternative mechanism by which IFN-gamma enhances tumor recognition: active release of heat shock protein 72. *J.Immunol.* 2005. **175**: 2900-2912.

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

Buckner,J.H., Holzer,U., Novak,E.J., Reijonen,H., Kwok,W.W., and Nepom,G.T., Defining antigen-specific responses with human MHC class II tetramers. *J.Allergy Clin.Immunol.* 2002. **110**: 199-208.

Burkart,V., Germaschewski,L., Schloot,N.C., Bellmann,K., and Kolb,H., Deficient heat shock protein 70 response to stress in leukocytes at onset of type 1 diabetes. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 2008.

Carroll,M.C., The complement system in regulation of adaptive immunity. *Nat.Immunol.* 2004. **5**: 981-986.

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

Cho,J.A., Lee,Y.S., Kim,S.H., Ko,J.K., and Kim,C.W., MHC independent anti-tumor immune responses induced by Hsp70-enriched exosomes generate tumor regression in murine models. *Cancer Lett.* 2009. **275**: 256-265.

Danke,N.A. and Kwok,W.W., HLA class II-restricted CD4+ T cell responses directed against influenza viral antigens postinfluenza vaccination. *J.Immunol.* 2003. **171**: 3163-3169.

Danke,N.A., Koelle,D.M., Yee,C., Beheray,S., and Kwok,W.W., Autoreactive T cells in healthy individuals. *J.Immunol.* 2004. **172**: 5967-5972.

Danke,N.A., Yang,J., Greenbaum,C., and Kwok,W.W., Comparative study of GAD65-specific CD4+ T cells in healthy and type 1 diabetic subjects. *J.Autoimmun.* 2005. **25**: 303-311.

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

DeNagel,D.C. and Pierce,S.K., A case for chaperones in antigen processing. *Immunol.Today* 1992. **13**: 86-89.

Doody,A.D., Kovalchin,J.T., Mihalyo,M.A., Hagymasi,A.T., Drake,C.G., and Adler,A.J., Glycoprotein 96 can chaperone both MHC class I- and class II-restricted epitopes for in vivo presentation, but selectively primes CD8+ T cell effector function. *J.Immunol.* 2004. **172**: 6087-6092.

Feder,M.E. and Hofmann,G.E., Heat-shock proteins, molecular chaperones, and the stress response: evolutionary and ecological physiology. *Annu.Rev.Physiol* 1999. **61**: 243-282.

Flajnik,M.F., Comparative analyses of immunoglobulin genes: surprises and portents. *Nat.Rev.Immunol.* 2002. **2**: 688-698.

Gebe,J.A., Unrath,K.A., Falk,B.A., Ito,K., Wen,L., Daniels,T.L., Lernmark,A., and Nepom,G.T., Age-dependent loss of tolerance to an immunodominant epitope of glutamic acid decarboxylase in diabetic-prone RIP-B7/DR4 mice. *Clin.Immunol.* 2006. **121**: 294-304.

Gething,M.J. and Sambrook,J., Protein folding in the cell. *Nature* 1992. **355**: 33-45.

Gnjatic,S., Altorki,N.K., Tang,D.N., Tu,S.M., Kundra,V., Ritter,G., Old,L.J., Logothetis,C.J., and Sharma,P., NY-ESO-1 DNA vaccine induces T-cell responses that are suppressed by regulatory T cells. *Clin.Cancer Res.* 2009. **15**: 2130-2139.

Haas,I.G., BiP--a heat shock protein involved in immunoglobulin chain assembly. *Curr.Top.Microbiol.Immunol.* 1991. **167**: 71-82.

Haug,M., Dannecker,L., Schepp,C.P., Kwok,W.W., Wernet,D., Buckner,J.H., Kalbacher,H., Dannecker,G.E., and Holzer,U., The heat shock protein Hsp70 enhances antigen-specific proliferation of human CD4+ memory T cells. *Eur.J.Immunol.* 2005. **35**: 3163-3172.

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

Heath,W.R. and Carbone,F.R., Cross-presentation, dendritic cells, tolerance and immunity. *Annu.Rev.Immunol.* 2001. **19**: 47-64.

Herold, G., *Innere Medizin*, Herold Verlag, 2009.

Holzer,U., Kwok,W.W., Nepom,G.T., and Buckner,J.H., Differential antigen sensitivity and costimulatory requirements in human Th1 and Th2 antigen-specific CD4+ cells with similar TCR avidity. *J.Immunol.* 2003. **170**: 1218-1223.

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

Hwang,E.S., Szabo,S.J., Schwartzberg,P.L., and Glimcher,L.H., T helper cell fate specified by kinase-mediated interaction of T-bet with GATA-3. *Science* 2005. **307**: 430-433.

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

Janeway, C.A., Jr. and Travers, P., *Immunologie*. Spektrum Akademischer Verlag GmbH, 2002.

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

Kawabata,R., Wada,H., Isobe,M., Saika,T., Sato,S., Uenaka,A., Miyata,H., Yasuda,T., Doki,Y., Noguchi,Y., Kumon,H., Tsuji,K., Iwatsuki,K., Shiku,H., Ritter,G., Murphy,R., Hoffman,E., Old,L.J., Monden,M., and Nakayama,E., Antibody response against NY-ESO-1 in CHP-NY-ESO-1 vaccinated patients. *Int.J.Cancer* 2007. **120**: 2178-2184.

Knip,M. and Siljander,H., Autoimmune mechanisms in type 1 diabetes. *Autoimmun.Rev.* 2008. **7** : 550-557.

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

Kwok,W.W., Liu,A.W., Novak,E.J., Gebe,J.A., Ettinger,R.A., Nepom,G.T., Reymond,S.N., and Koelle,D.M., HLA-DQ tetramers identify epitope-specific T cells in peripheral blood of herpes simplex virus type 2-infected individuals: direct detection of immunodominant antigen-responsive cells. *J.Immunol.* 2000. **164:** 4244-4249.

Lee,D.S., Ahn,C., Ernst,B., Sprent,J., and Surh,C.D., Thymic selection by a single MHC/peptide ligand: autoreactive T cells are low-affinity cells. *Immunity.* 1999. **10:** 83-92.

Lehner,T., Bergmeier,L.A., Wang,Y., Tao,L., Sing,M., Spallek,R., and van der,Z.R., Heat shock proteins generate beta-chemokines which function as innate adjuvants enhancing adaptive immunity. *Eur.J.Immunol.* 2000. **30:** 594-603.

Lindley,S., Dayan,C.M., Bishop,A., Roep,B.O., Peakman,M., and Tree,T.I., Defective suppressor function in CD4(+)CD25(+) T-cells from patients with type 1 diabetes. *Diabetes* 2005. **54:** 92-99.

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

Lindquist,S. and Craig,E.A., The heat-shock proteins. *Annu.Rev.Genet.* 1988. **22:** 631-677.

Macaubas,C., Wahlstrom,J., Galvao da Silva,A.P., Forsthuber,T.G., Sonderstrup,G., Kwok,W.W., DeKruyff,R.H., and Umetsu,D.T., Allergen-specific MHC class II tetramer+ cells are detectable in allergic, but not in nonallergic, individuals. *J.Immunol.* 2006. **176:** 5069-5077.

Malaitsev,V.V., Bogdanova,I.M., and Makarova,O.V., [Heat shock proteins and their role in the development of pathological processes]. *Arkh.Patol.* 2008. **70:** 31-38.

Mandic,M., Almunia,C., Vicel,S., Gillet,D., Janjic,B., Coval,K., Maillere,B., Kirkwood,J.M., and Zarour,H.M., The alternative open reading frame of LAGE-1 gives rise to multiple promiscuous HLA-DR-restricted epitopes recognized by T-helper 1-type tumor-reactive CD4+ T cells. *Cancer Res.* 2003. **63:** 6506-6515.

Millar,D.G., Garza,K.M., Odermatt,B., Elford,A.R., Ono,N., Li,Z., and Ohashi,P.S., Hsp70 promotes antigen-presenting cell function and converts T-cell tolerance to autoimmunity in vivo. *Nat.Med.* 2003. **9:** 1469-1476.

Morimoto,R.I., Regulation of the heat shock transcriptional response: cross talk between a family of heat shock factors, molecular chaperones, and negative regulators. *Genes Dev.* 1998. **12:** 3788-3796.

Moroi,Y., Mayhew,M., Trcka,J., Hoe,M.H., Takechi,Y., Hartl,F.U., Rothman,J.E., and Houghton,A.N., Induction of cellular immunity by

immunization with novel hybrid peptides complexed to heat shock protein 70. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 2000. **97**: 3485-3490.

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

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

Nedjic,J., Aichinger,M., and Klein,L., Autophagy and T cell education in the thymus: eat yourself to know yourself. *Cell Cycle* 2008. **7**: 3625-3628.

Nepom,G.T., Lippolis,J.D., White,F.M., Masewicz,S., Marto,J.A., Herman,A., Luckey,C.J., Falk,B., Shabanowitz,J., Hunt,D.F., Engelhard,V.H., and Nepom,B.S., Identification and modulation of a naturally processed T cell epitope from the diabetes-associated autoantigen human glutamic acid decarboxylase 65 (hGAD65). *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 2001. **98**: 1763-1768.

Nepom,G.T., Buckner,J.H., Novak,E.J., Reichstetter,S., Reijonen,H., Gebe,J., Wang,R., Swanson,E., and Kwok,W.W., HLA class II tetramers: tools for direct analysis of antigen-specific CD4+ T cells. *Arthritis Rheum.* 2002. **46**: 5-12.

Novak,E.J., Liu,A.W., Nepom,G.T., and Kwok,W.W., MHC class II tetramers identify peptide-specific human CD4(+) T cells proliferating in response to influenza A antigen. *J.Clin.Invest* 1999. **104**: R63-R67.

Novak,E.J., Liu,A.W., Gebe,J.A., Falk,B.A., Nepom,G.T., Koelle,D.M., and Kwok,W.W., Tetramer-guided epitope mapping: rapid identification and characterization of immunodominant CD4+ T cell epitopes from complex antigens. *J.Immunol.* 2001. **166**: 6665-6670.

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

Panjwani,N.N., Popova,L., and Srivastava,P.K., Heat shock proteins gp96 and hsp70 activate the release of nitric oxide by APCs. *J.Immunol.* 2002. **168**: 2997-3003.

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

Pockley,A.G., Heat shock proteins as regulators of the immune response. *Lancet* 2003. **362**: 469-476.

Putnam,A.L., Vendrame,F., Dotta,F., and Gottlieb,P.A., CD4+CD25high regulatory T cells in human autoimmune diabetes. *J.Autoimmun.* 2005. **24:** 55-62.

Qian,F., Gnjjatic,S., Jager,E., Santiago,D., Jungbluth,A., Grande,C., Schneider,S., Keitz,B., Driscoll,D., Ritter,G., Lele,S., Sood,A., Old,L.J., and Odunsi,K., Th1/Th2 CD4+ T cell responses against NY-ESO-1 in HLA-DPB1*0401/0402 patients with epithelial ovarian cancer. *Cancer Immun.* 2004. **4:** 12.

Rajewsky,K., Clonal selection and learning in the antibody system. *Nature* 1996. **381:** 751-758.

Reeves,R.H., Patch,D., Sharpe,A.H., Borriello,F., Freeman,G.J., Edelhoff,S., and Distechc,C., The costimulatory genes Cd80 and Cd86 are linked on mouse chromosome 16 and human chromosome 3. *Mamm.Genome* 1997. **8:** 581-582.

Reichstetter,S., Ettinger,R.A., Liu,A.W., Gebe,J.A., Nepom,G.T., and Kwok,W.W., Distinct T cell interactions with HLA class II tetramers characterize a spectrum of TCR affinities in the human antigen-specific T cell response. *J.Immunol.* 2000. **165:** 6994-6998.

Reijonen,H., Elliott,J.F., van Endert,P., and Nepom,G., Differential presentation of glutamic acid decarboxylase 65 (GAD65) T cell epitopes among HLA-DRB1*0401-positive individuals. *J.Immunol.* 1999. **163:** 1674-1681.

Rengarajan,J., Szabo,S.J., and Glimcher,L.H., Transcriptional regulation of Th1/Th2 polarization. *Immunol.Today* 2000. **21:** 479-483.

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

Romagnani,S., Th1/Th2 cells. *Inflamm.Bowel.Dis.* 1999. **5:** 285-294.

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

Sakaguchi,S., Sakaguchi,N., Asano,M., Itoh,M., and Toda,M., Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J.Immunol.* 1995. **155:** 1151-1164.

Schild,H., Arnold-Schild,D., Lammert,E., and Rammensee,H.G., Stress proteins and immunity mediated by cytotoxic T lymphocytes. *Curr.Opin.Immunol.* 1999. **11:** 109-113.

Sebzda,E., Wallace,V.A., Mayer,J., Yeung,R.S., Mak,T.W., and Ohashi,P.S., Positive and negative thymocyte selection induced by different concentrations of a single peptide. *Science* 1994. **263**: 1615-1618.

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., Cross-presentation of glycoprotein 96-associated antigens on major histocompatibility complex class I molecules requires receptor-mediated endocytosis. *J.Exp.Med.* 2000. **191**: 1965-1974.

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

Suto,R. and Srivastava,P.K., A mechanism for the specific immunogenicity of heat shock protein-chaperoned peptides. *Science* 1995. **269**: 1585-1588.

Tian,J., Atkinson,M.A., Clare-Salzler,M., Herschenfeld,A., Forsthuber,T., Lehmann,P.V., and Kaufman,D.L., Nasal administration of glutamate decarboxylase (GAD65) peptides induces Th2 responses and prevents murine insulin-dependent diabetes. *J.Exp.Med.* 1996. **183**: 1561-1567.

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

Van Eden,W., Holoshitz,J., Nevo,Z., Frenkel,A., Klajman,A., and Cohen,I.R., Arthritis induced by a T-lymphocyte clone that responds to Mycobacterium tuberculosis and to cartilage proteoglycans. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 1985. **82**: 5117-5120.

Van Eden,W., van der,Z.R., and Prakken,B., Heat-shock proteins induce T-cell regulation of chronic inflammation. *Nat.Rev.Immunol.* 2005. **5**: 318-330.

Van Eden,W., Wick,G., Albani,S., and Cohen,I., Stress, heat shock proteins, and autoimmunity: how immune responses to heat shock proteins are to be used for the control of chronic inflammatory diseases. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 2007. **1113**: 217-237.

Wan,T., Zhou,X., Chen,G., An,H., Chen,T., Zhang,W., Liu,S., Jiang,Y., Yang,F., Wu,Y., and Cao,X., Novel heat shock protein Hsp70L1 activates dendritic cells and acts as a Th1 polarizing adjuvant. *Blood* 2004. **103**: 1747-1754.

Wang,S. and Chen,L., Co-signaling molecules of the B7-CD28 family in positive and negative regulation of T lymphocyte responses. *Microbes.Infect.* 2004. **6**: 759-766.

Wang,X.Y., Li,Y., Manjili,M.H., Repasky,E.A., Pardoll,D.M., and

Subjeck,J.R., Hsp110 over-expression increases the immunogenicity of the murine CT26 colon tumor. *Cancer Immunol.Immunother.* 2002. **51**: 311-319.

Yang,J., Danke,N., Roti,M., Huston,L., Greenbaum,C., Pihoker,C., James,E., and Kwok,W.W., CD4+ T cells from type 1 diabetic and healthy subjects exhibit different thresholds of activation to a naturally processed proinsulin epitope. *J.Autoimmun.* 2008. **31**: 30-41.

Danksagung

Sehr herzlich möchte ich mich bei allen bedanken, die zum Entstehen meiner Doktorarbeit beigetragen und mir zur Seite gestanden haben.

Mein besonderer Dank gilt Frau Dr. med. Ursula Holzer für die Überlassung des interessanten Projektes sowie für die wissenschaftliche Betreuung der Experimente und die kritische Korrektur der schriftlichen Ausarbeitung.

Herrn Professor Dr. Rupert Handgretinger danke ich sehr für die Überlassung des Arbeitsplatzes sowie für die wissenschaftliche Betreuung und Begutachtung dieser Arbeit.

Ganz besonders danken möchte ich Herrn Dr. rer. nat. Markus Haug, der mich in alle angewandten Methoden eingewiesen hat. Durch die wissenschaftliche Betreuung des Projektes und die Unterstützung in jeder Hinsicht, auch nach seinem Umzug nach Norwegen, hat er einen wesentlichen Beitrag geleistet.

Ein weiteres Dankeschön möchte ich aussprechen:

Frau Professor Dr. I. Kötter für die Zweitbegutachtung dieser Arbeit,

Herrn Professor Dr. Günther Dannecker für sein Interesse an der Diskussion der Ergebnisse dieser Arbeit,

Herrn Dr. Hubert Kalbacher und seiner Arbeitsgruppe für die Synthese der verwendeten Peptide,

Professor William W. Kwok vom Benaroya Research Institute (BRI) at Virginia Mason, Seattle, USA für die im Rahmen einer Kooperation zur Verfügung gestellten, in dieser Arbeit verwendeten HLA-DR-Tetramere,

Frau Prof. Dr. Dorothee Wernet, Transfusionsmedizin der Universitätsklinik Tübingen für die HLA-DR-Typisierung der Donoren und

Herrn Dr. Christoph Meisner, Institut für Medizinische Biometrie der Universität Tübingen für die Überprüfung der statistischen Berechnungen.

Ebenfalls großen Dank den Donoren, die regelmäßig Blut gegeben haben, hier aber aus Datenschutzgründen nicht namentlich genannt werden.

Herzlichen Dank auch allen Kolleginnen und Kollegen im Labor für die freundliche Aufnahme und eine unübertroffen gute Arbeitsatmosphäre sowie ihre große Hilfsbereitschaft. Bei Frau Luciana Dannecker speziell für das

Erlernen vieler Methoden.

Schließlich möchte ich einen ganz persönlichen Dank meiner Freundin Nike und meiner Familie aussprechen, die mich stets fürsorglich unterstützten.