

**Hitzeschockprotein 60 (Hsp60) als immunologischer  
Signalverstärker in der Maus (*Mus musculus*)**

**Dissertation**

zur Erlangung des Doktorgrades

vorgelegt von

**Anke Osterloh**

aus Wildeshausen

beim Fachbereich Biologie der  
Universität Hamburg

Hamburg, Mai 2005

Genehmigt vom  
Fachbereich Biologie der  
Universität Hamburg  
auf Antrag von Herrn Professor Dr. B. FLEISCHER  
Weitere Gutachterin der Dissertation:  
Frau Priv.-Doz. Dr. I. BRUCHHAUS  
Tag der Disputation: 26. August 2005

Hamburg, den 12. August 2005



A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Arno Frühwald', written in a cursive style.

Professor Dr. Arno Frühwald  
Dekan

## Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung .....</b>	<b>1</b>
1.1	Das Immunsystem.....	1
1.2	Die angeborene Immunantwort.....	1
1.3	Die adaptive Immunantwort.....	4
1.3.1	Grundlagen der B- und T-Zellaktivierung.....	4
1.4	Die T-Zellaktivierung erfordert kostimulatorische Signale.....	7
1.4.1	Die Gefahrensignal-Theorie .....	8
1.5	Immunmodulatorische Funktionen von Hitzeschockproteinen.....	10
1.6	Fragestellung und Ziel der Arbeit .....	13
<b>2</b>	<b>Material und Methoden .....</b>	<b>15</b>
2.1	Material .....	15
2.1.1	Herkunft häufig verwendeter Laborgeräte und Chemikalien.....	15
2.1.1.1	Laborgeräte und Hilfsmittel.....	15
2.1.1.2	Chemikalien und Reagenzien .....	17
2.1.1.2.1	Biochemische Arbeiten.....	17
2.1.1.2.2	Molekularbiologische Arbeiten.....	18
2.1.1.2.3	Zellkulturarbeiten .....	20
2.1.2	Antikörper .....	21
2.1.3	Peptide und Proteine .....	22
2.1.4	Bakterien.....	23
2.1.5	Zelllinien.....	23
2.1.6	Tiere .....	23
2.1.7	Puffer und Stammlösungen .....	24
2.1.7.1	Biochemische Arbeiten.....	24
2.1.7.2	Molekularbiologische Arbeiten.....	26
2.1.7.3	Zellkulturarbeiten .....	27
2.2	Methoden.....	29
2.2.1	Molekularbiologische Methoden .....	29
2.2.1.1	Isolierung von RNA aus eukaryontischen Zelllinien .....	29
2.2.1.2	Reverse Transkription zur Herstellung von cDNA (RT-PCR).....	29

2.2.1.3	Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	30
2.2.1.4	Analytische und präparative Gelelektrophorese von DNA .....	30
2.2.1.5	Extraktion von DNA aus Agarose-Gelen .....	31
2.2.1.6	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren .....	31
2.2.1.7	Restriktionsverdau von DNA .....	32
2.2.1.8	Ligation von DNA-Fragmenten in Plasmid-Vektoren.....	32
2.2.1.9	Transformation von kompetenten <i>Escherichia coli</i> DH5 $\alpha$ F' .....	34
2.2.1.9.1	Herstellung kompetenter <i>E. coli</i> DH5 $\alpha$ F'-Bakterien.....	34
2.2.1.9.2	Transformation kompetenter Bakterien mit Plasmid-DNA.....	34
2.2.1.10	PCR-Nachweis transformierter Bakterienkolonien.....	34
2.2.1.11	Einfrieren von Bakterien.....	35
2.2.1.12	Plasmid-Mini- und -Maxipräparation aus Bakterien.....	35
2.2.1.13	DNA-Sequenzierung.....	35
2.2.2	Biochemische Methoden .....	37
2.2.2.1	Aufreinigung von Ig-Fusionsproteinen über HiTrap/Protein A-Säulen ...	37
2.2.2.2	Herstellung von Zelllysaten für die gelelektrophoretische Analyse .....	37
2.2.2.3	Fluoreszenzmarkierung von Proteinen .....	37
2.2.2.4	Proteinanalyse.....	38
2.2.2.4.1	Diskontinuierliche SDS-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	38
2.2.2.4.2	Coomassie-Blau-Färbung .....	39
2.2.2.4.3	Silberfärbung .....	39
2.2.2.4.4	Trocknen von Polyacrylamidgelen.....	40
2.2.2.4.5	Semi-Dry Western-Blotting.....	40
2.2.2.4.6	Immunodetektion der Proteine mit Chemilumineszenzreaktion.....	40
2.2.2.4.7	Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford.....	41
2.2.2.4.8	ELISA zum Nachweis von Ig-Fusionsproteinen.....	42
2.2.2.5	Zytokin-ELISA.....	42
2.2.3	Methoden der Zellkultur .....	43
2.2.3.1	Allgemeine Bedingungen der Zellkultur und Sterilisation.....	43
2.2.3.2	Auftauen und Einfrieren eukaryontischer Zellen .....	44
2.2.3.3	Zellzählung durch den Trypanblau-Ausschlusstest .....	44
2.2.3.4	Kultur und Expansion eukaryontischer Zelllinien.....	44
2.2.3.5	Transfektion eukaryontischer Zellen und Zelllinien .....	45
2.2.3.5.1	Elektroporation muriner Zelllinien.....	45

2.2.3.5.2	DEAE-Dextran-Transfektion .....	45
2.2.3.5.3	Transfektion mit komplexen Transfektionsreagenzien.....	46
2.2.3.5.4	Selektion stabil transfizierter Zellen .....	46
2.2.3.5.5	Subklonierung stabil transfizierter Zellen.....	47
2.2.3.6	Präparation muriner Milzzellen.....	47
2.2.3.7	Anreicherung von T-Zellen aus Milzzellpräparationen.....	47
2.2.3.8	Isolierung muriner peritonealer Exudatzellen (PEC).....	48
2.2.3.9	Färbung von Zelloberflächenmolekülen für durchflusszytometrische Analysen .....	48
2.2.3.10	Färbung intrazellulärer Moleküle für die durchflusszytometrische Analyse .....	50
2.2.3.11	Durchflusszytometrischer Nachweis der Bindung von rekombinantem humanen Hsp60 und Hsp60-Ig-Fusionsprotein an PEC .....	50
2.2.3.12	Zytospin-Färbungen.....	51
2.2.4	<i>In vitro</i> -Stimulationsexperimente.....	51
2.2.4.1	<i>in vitro</i> -Testsysteme zur Stimulation von Makrophagen und naiven T-Zellen.....	51
2.2.4.2	ELISPOT-Test.....	52
2.2.5	Tierversuche .....	53
2.2.5.1	Immunisierung von Mäusen mit bestrahlten Tumorzellen.....	53
2.2.5.2	Wachstum Hsp60-positiver und -negativer X63-Tumoren <i>in vivo</i> .....	54
 <b>3 Ergebnisse .....</b>		<b>55</b>
3.1	Überblick.....	55
3.2	Teil I: Vektorkonstruktion und Expression von murinem Hsp60 in eukaryontischen Zellen .....	55
3.2.1	Konstruktion eukaryontischer Hsp60-Expressionsvektoren .....	55
3.2.1.1	Konstruktion von Vektoren zur Expression von membranständigem Hsp60: pDisplay-mHsp60, pFM92-mHsp60 und pEF-BOS-mHsp60 .....	56
3.2.1.2	Konstruktion eines Expressionsvektors zur Produktion von Hsp60-Ig- Fusionsprotein: pcDNA1.1-Hsp60-Ig .....	59
3.2.2	Expression des Hsp60-Proteins in eukaryontischen Zelllinien .....	61
3.2.2.1	Transiente Expression von membranständigem Hsp60 auf der Oberfläche von COS1-Zellen .....	61

3.2.2.2	Stabile Expression von membranständigem Hsp60 auf der Oberfläche von murinen X63-Tumorzellen .....	64
3.2.2.3	Transiente Expression von Hsp60-Ig-Fusionsprotein in COS1-Zellen .....	66
3.3	Teil II: Untersuchung des immunstimulatorischen Potentials des Hsp60-Proteins in <i>in vitro</i> -Testsystemen .....	68
3.3.1	Etablierung eines <i>in vitro</i> -Testsystems zur Stimulation naiver T-Zellen ..	68
3.3.2	Hsp60 steigert die IFN $\gamma$ -Produktion in CD4 <sup>+</sup> -T-Zellen.....	70
3.3.3	Rolle von NK-Zellen.....	73
3.4	Teil III: Untersuchungen zum Mechanismus der adjuvanten Wirkung von Hsp60.....	75
3.4.1	Mechanismen der Hsp60-vermittelten T-Zellstimulation .....	75
3.4.2	Wirkung von Hsp60 auf APZ.....	78
3.4.2.1	Hsp60 bindet an peritoneale Makrophagen.....	78
3.4.2.2	Einfluss von Hsp60 auf die Expression kostimulatorischer Moleküle auf der Oberfläche von PEC .....	79
3.4.2.3	Hsp60 aktiviert in Makrophagen nicht die Produktion von IL-6, IL-12 und TNF $\alpha$ .....	81
3.4.2.4	Bedeutung von IL-6, IL-12 und TNF $\alpha$ bei der Hsp60-vermittelten Verstärkung der IFN $\gamma$ -Produktion in T-Zellen.....	83
3.4.2.5	Rolle der Typ I-Interferone IFN $\alpha$ und IFN $\beta$ bei der Hsp60-vermittelten Steigerung der IFN $\gamma$ -Produktion in T-Zellen .....	88
3.4.3	Welche Rolle spielen TLR4 und TLR-assoziierte Signaltransduktionsmechanismen? .....	91
3.4.3.1	Rolle von TLR4 bei der Hsp60 induzierten IFN $\gamma$ -Antwort.....	91
3.4.3.2	Rolle des MyD88-Signalwegs bei der Hsp60-vermittelten IFN $\gamma$ -Produktion in T-Zellen.....	93
3.5	Teil IV: Modulation der Tumorummunität durch Hsp60 <i>in vivo</i> .....	95
3.5.1	Die Oberflächenexpression von Hsp60 steigert die Tumorummunität <i>in vivo</i> .....	95
3.5.2	Hsp60 als Adjuvanz in der Tumorabwehr.....	100
3.5.3	Hsp60-negative und mHsp60-exprimierende X63-Tumorzellen infiltrieren Leber und Milz .....	102
3.5.4	Expression von Oberflächen-Hsp60 auf <i>ex vivo</i> -präparierten Tumorzellen.....	103

<b>4</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>105</b>
4.1	Hsp60 als endogenes Gefahrensignal – ein LPS-Artefakt?.....	105
4.2	Expression des murinen Hsp60-Proteins in eukaryontischen Zelllinien .	106
4.3	Hsp60 ist ein immunologischer Signalverstärker.....	108
4.4	Untersuchungen zum Mechanismus der adjuvanten Funktion von Hsp60 .....	110
4.4.1	Rezeptoren.....	110
4.4.1.1	Hsp60 bindet an spezifische Rezeptoren auf der Oberfläche von APZ...	110
4.4.1.2	Funktion von TLR.....	112
4.4.2	Modulation von APZ-Funktionen.....	114
4.4.2.1	Expression kostimulatorischer B7-Moleküle .....	114
4.4.2.2	Zytokinexpression.....	115
4.4.2.3	Rolle von Zytokinen bei der Hsp60-vermittelten T-Zellstimulation .....	117
4.4.3	Kostimulation mit LPS-kontaminiertem und LPS-freiem Hsp60 – zwei voneinander unabhängige biologisch relevante Mechanismen? .....	120
4.4.4	Aktiviert Hsp60 T-Zellen direkt? .....	121
4.5	Hsp60 als immunologisches Adjuvanz in der Tumorabwehr .....	124
4.6	Ausblick .....	127
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>128</b>
<b>6</b>	<b>Literatur.....</b>	<b>130</b>

---

## Abkürzungsverzeichnis

Ag	Antigen	EDTA	Ethylendiamintetraacetat
AK	Antikörper	EGTA	Ethylenglykolbis-(2-aminoethylether)- N, N, N', N'-tetraacetat
Amp	Ampicillin	ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
AP	Alkalische Phosphatase	ER	Endoplasmatisches Retikulum
APS	Ammoniumpersulfat	EtOH	Ethanol
AS	Aminosäure	FACS	Fluoreszenz-aktivierter Zell-Sortierer
APZ	antigenpräsentierende Zellen ( <i>antigen presenting cells</i> )	F <sub>c</sub>	Antikörperfragment, das aus dem Verdau von IgG mit Papain hervorgeht ( <i>fragment crystallisable</i> )
ATCC	<i>American type culture collection</i>	FCS	Fötales Kälberserum ( <i>fetal calf serum</i> )
ATP	Adenosintriphosphat	FITC	Fluoresceinisothiocyanat
BSA	Rinderserumalbumin ( <i>bovine serum albumine</i> )	hCD83-Ig	humanes CD83-Ig-Fusionsmolekül
CD	Nomenklatur für Oberflächenantigene ( <i>cluster of differentiation</i> )	HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-1- piperazinethansulfonat
CTL	cytotoxische T-Lymphocyten	hHsp60	rekombinantes humanes Hsp60-Protein
CTLA-4	Cytotoxisches T-Lymphocyten Antigen 4 ( <i>cytotoxic T lymphocyte antigen 4</i> )	HRP	Meerrettichperoxidase ( <i>horseradish peroxidase</i> )
DAPI	4',6-Diamino-2-phenyl-indol- dihydrochlorid	HSP	Hitzeschockprotein
DC	dendritische Zellen ( <i>dendritic cells</i> )	Hsp60-Ig	murines Hsp60-Ig-Fusionsprotein
ddNTP	Didesoxyribonukleosidtriphosphat	IFN	Interferon
dH <sub>2</sub> O	deionisiertes Wasser	Ig	Immunglobulin
DMSO	Dimethylsulfoxid	IL	Interleukin
DNA	Desoxyribonukleinsäure ( <i>desoxyribonucleotide acid</i> )	kDa	Kilodalton
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat	KO	Knockout
DTT	Dithiothreitol	LBP	LPS-bindendes Protein



---

LPS	Lipopolysaccharid	PRR	Rezeptoren für Pathogen-assoziierte molekulare Muster ( <i>pattern recognition receptors</i> )
MARCO	<i>macrophage receptor with collagenous structure</i>	rpm	Umdrehungen pro Minute ( <i>rounds per minute</i> )
MBL	Mannose-bindendes Lektin	RPMI	Roswell Park Memorial Institute
MBP	Mannose-bindendes Protein	SDS	Natriumdodecylsulfat ( <i>sodium dodecyl sulphate</i> )
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex ( <i>major histocompatibility complex</i> )	SDS- PAGE	Natriumdodecylsulfat- Polyacrylamidgelelektrophorese
mHsp60	membrangebundenes murines Hsp60-Protein	TCR	T-Zell-Rezeptor ( <i>T cell receptor</i> )
Min	Minuten	TEMED	N, N, N', N'-Tetramethylethylendiamin
NF-κB	Nukleärer Faktor kappa B	TGF	Transformierender Wachstumsfaktor ( <i>transforming growth factor</i> )
NK-Zelle	Natürliche Killer-Zelle ( <i>natural killer cell</i> )	T <sub>H</sub> -Zelle	T-Helfer-Zelle
OD <sub>x</sub>	Optische Dichte bei einer Wellenlänge von x nm	TLR	<i>Drosophila</i> -Toll-Protein homologer Rezeptor ( <i>Toll-like receptor</i> )
OT	Ovalbumin-transgen	TMB	Tetramethylbenzidin
OVA	Ovalbumin	TNF	Tumornekrosefaktor
PAMP	Pathogen-assoziiertes molekulares Muster ( <i>pathogen associated molecular pattern</i> )	TMB	Tetramethylbenzidin
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung ( <i>phosphate buffered saline</i> )	Triton- X100	Alkylphenylpolyethylenglykol (TX 100)
PCR	Polymerasekettenreaktion ( <i>polymerase chain reaction</i> )	U	Einheit ( <i>unit</i> )
PEC	Peritoneale Exudat-Zellen ( <i>peritoneal exudate cells</i> )	UV	Ultraviolett
PFA	Paraformaldehyd	v/v	Volumen/Volumen
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Konzentration an H <sub>3</sub> O <sup>+</sup>	w	Gewicht ( <i>weight</i> )
PmB	Polymyxin B	WT	Wildtyp
PKR	Proteinkinase R	X-Gal	5-Chlor-4-Brom-3-indolyl-β-D-thiogalactosid

---

### Einbuchstaben-Bezeichnung der Aminosäuren:

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

---

Danksagungen:

Ich danke Herrn Professor Fleischer für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes und die freundliche Unterstützung meiner Arbeit.

Frau Dr. Iris Bruchhaus möchte ich für die Bereitschaft danken, diese Dissertation als Gutachterin zu lesen und zu bewerten.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. Arne von Bonin und Frau Dr. Minka Breloer für die intensive und konstruktive wissenschaftliche Betreuung meiner Arbeit und ihre Diskussionsbereitschaft.

Schließlich danke ich allen Mitgliedern der Abteilung für die vielen praktischen Tipps und Anregungen während meiner Arbeit und das hervorragende Arbeitsklima.

# 1 Einleitung

## 1.1 Das Immunsystem

Das Immunsystem ist ein hochdifferenziertes und anpassungsfähiges biologisches Abwehrsystem, das dem Schutz eines Organismus vor Krankheitserregern wie Bakterien, Viren, Pilzen und Parasiten, aber auch vor Fremd- und Schadstoffen, denen er in seiner Umwelt ausgesetzt ist, und vor körpereigenen maligne entarteten Zellen dient. Eine wesentliche Aufgabe des Immunsystems ist es, dabei zwischen „fremd“ und „körpereigen“ beziehungsweise „gefährlich“ und „ungefährlich“ zu unterscheiden (Janeway Jr., 1992; Matzinger, 1994; Übersicht bei Janeway et al., 2002).

Das komplexe Immunsystem höherer Vertebraten setzt sich aus Abwehrzellen der weißen Blutkörperchen (Leukozyten), löslichen Faktoren und aus den lymphatischen Organen und Geweben zusammen und unterliegt strengen Regulationsmechanismen. Aufgrund ihrer Funktion werden zwei Typen von lymphatischen Organen unterschieden. Die primären lymphatischen Organe, zu denen das Knochenmark und der Thymus gehören, dienen der Entstehung und Reifung von Immunzellen. In den sekundären lymphatischen Organen, zu denen die Lymphknoten, die Mandeln, die Milz und lymphatische Gewebe der Schleimhäute, wie zum Beispiel die Peyerschen-Plaques im Darm zählen, werden die zirkulierenden Immunzellen aktiviert (Übersicht bei Janeway et al., 2002).

Funktionell läßt sich das Immunsystem in die entwicklungsgeschichtlich älteren angeborenen Abwehrmechanismen und die spezifische adaptive Immunantwort unterteilen.

## 1.2 Die angeborene Immunantwort

Das Eindringen von Erregern, Schad- und Fremdstoffen in den Organismus verhindern zunächst physikalische Barrieren und unspezifische Schutzmechanismen. Dazu zählen der Säuremantel der Haut und die Schleimhäute, die durch die enzymatische Aktivität von Proteasen und Lysozym sowie chemische Abwehrmechanismen wie die bakterizide Funktion von Schleimen und anderen Sekreten eine weitere Barriere darstellen.

Erreger und Schadstoffe, die diese Barrieren durchdringen, initiieren zunächst weitere unspezifische Abwehrreaktionen, die sowohl durch lösliche Faktoren wie die

Komplementfaktoren, Akute-Phase-Proteine, Zytokine und aggressive Sauerstoffverbindungen als auch zelluläre Komponenten vermittelt werden. Zu den Zellen der nicht-adaptiven Immunantwort gehören Monozyten/Makrophagen, dendritische Zellen (*dendritic cells*, DC), neutrophile, eosinophile und basophile Granulozyten, Mastzellen und natürliche Killerzellen (NK-Zellen). Letztere sind zytotoxische Zellen, die insbesondere gegen Virus-infizierte Zellen und Tumorzellen aktiv werden (Übersicht bei Janeway et al., 2002). Phagozytierende Zellen wie Monozyten/Makrophagen, DC und neutrophile Granulozyten nehmen körperfremdes partikuläres Material wie Bakterien, alternde körpereigene Zellen und abgestorbene Gewebebestandteile durch Phagozytose (Reis e Sousa et al., 1993; Albert et al., 1998) oder Makropinozytose (Sallusto et al., 1995) auf und eliminieren sie auf diese Weise.

DC und Makrophagen gelten als die zentralen Sensoren des Immunsystems (Übersicht bei Banchereau und Steinman, 1998). Sie verfügen über ein Repertoire an konservierten Rezeptoren, mit deren Hilfe sie universelle Pathogen-assoziierte Strukturen erkennen und auf diese Weise verschiedenste pathogene Mikroorganismen detektieren können (Murray und Young, 1992; Übersicht bei Janeway Jr. und Medzhitov, 2002). Rezeptoren, die charakteristische Pathogen-assoziierte Fremdstrukturen, die sogenannten *pathogen-associated molecular pattern* (PAMP), erkennen, werden als *pattern recognition receptors* (PRR) bezeichnet. PRR können sowohl auf der Zelloberfläche als auch in intrazellulären Kompartimenten exprimiert oder in löslicher Form in die Gewebeflüssigkeit und den Blutstrom freigesetzt werden (Übersicht bei Medzhitov und Janeway Jr., 1997; Übersicht bei Janeway Jr. und Medzhitov, 2002). Zu den Funktionen dieser Rezeptoren gehören die Opsonierung, die Aktivierung von Komplement, die Phagozytose, die Induktion proinflammatorischer Signaltransduktionswege sowie der Apoptose. Sekretierte lösliche PRR sind zum Beispiel das C-reaktive Protein (CRP), das Mannan-bindende Lektin (MBL) und das Serum-Amyloidprotein (SAP). Sie werden im frühen Stadium einer Infektion in der Leber gebildet und markieren als Opsonine Bakterien für die Phagozytose (Gewurz et al., 1982; Schwalbe et al., 1992; Fraser et al., 1998). Zudem können sie den klassischen Weg des Komplementsystems aktivieren. Zu den intrazellulären PRR gehören die Proteinkinase PKR und die Proteine NOD1 und NOD2 (*nucleotide-binding oligomerization domain*, NOD). Die PKR wird im Zytosol durch die Bindung an doppelsträngige virale RNA aktiviert, während die NOD-Proteine bakterielle Lipopolysaccharide (LPS) erkennen (Ogura et al., 2001; Inohara et al., 2001).

Die vielleicht wichtigsten PRR der Makrophagen sind jedoch Zelloberflächenproteine. Dazu gehört der Makrophagen-Mannose-Rezeptor (MMR), der mit dem auf DC exprimierten Rezeptor DEC205 verwandt ist und mit einer Vielzahl Gram-positiver wie -negativer Bakterien sowie pathogenen Pilzen interagiert (Fraser et al., 1998). Er vermittelt wahrscheinlich die Phagozytose dieser Pathogene. Weitere phagozytische PRR auf der Oberfläche von Makrophagen sind der *macrophage scavenger receptor* (MSR) und der Rezeptor MARCO (*macrophage receptor with collagenous structure*). Beide gehören der Scavenger-Rezeptor Typ A-Familie an (Übersicht bei Kraal et al., 2000; Übersicht bei Arredouani und Kobzik, 2004). Der MSR erkennt eine Vielzahl polyanionischer Verbindungen, darunter doppelsträngige RNA, bakterielles LPS und Lipoteicholsäure (LTA) (Suzuki et al., 1997; Thomas et al., 2000). MARCO bindet an bakterielle Zellwandbestandteile wie LPS und vermittelt ebenfalls die Phagozytose bakterieller Pathogene (Elomaa et al., 1995; Übersicht bei Kraal et al., 2000; Übersicht bei Arredouani und Kobzik, 2004).

Darüber hinaus ist in den vergangenen Jahren eine Familie von PRR identifiziert und beschrieben worden, die eine strukturelle und funktionelle Verwandtschaft mit dem Toll-Protein von *Drosophila melanogaster* aufweist und deshalb als Toll-like-Rezeptoren (TLR) bezeichnet werden. Bislang sind zehn Mitglieder dieser Rezeptorfamilie identifiziert (TLR1-10) (Übersicht bei Tsan und Gao, 2004). Die meisten TLR sind Zelloberflächenproteine, TLR3 und TLR9 werden jedoch wahrscheinlich in intrazellulären Vesikeln wie Endosomen und Lysosomen exprimiert (Hacker et al., 1998; Kariko et al., 2004). Die Mitglieder der TLR-Familie erkennen unterschiedliche bakterielle und virale Strukturen und initiieren, wie auch die intrazellulären PRR PKR und NOD, in Makrophagen und DC Signaltransduktionsmechanismen, die unter anderem zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B und damit zur Freisetzung von Zytokinen und chemoattraktiven Mediatoren führen, die eine Konzentrierung der Abwehrkräfte am Infektionsherd auslösen.

Zu den Zytokinen, die sehr früh infolge einer Infektion insbesondere von Makrophagen, aber auch DC, sezerniert werden, zählen die Interleukine IL-1, IL-6, IL-8 und IL-12 sowie der Tumornekrosefaktor- $\alpha$  (TNF $\alpha$ ). Weitere Effektormoleküle sind Prostaglandine, Sauerstoffradikale und Peroxide, Stickstoffmonoxid (NO), Leukotriene und der plättchenaktivierende Faktor (PAF) (Übersicht bei Janeway et al., 2002). Diese Botenstoffe induzieren eine lokale Entzündungsreaktion, in deren Verlauf es zu einer Erweiterung der Blutgefäße und einer erhöhten Permeabilität der Kapillarwände kommt,

die die Einwanderung weiterer phagozytischer Zellen erleichtert. Zu den ersten Zellen vor Ort gehören dabei die neutrophilen Granulozyten. Sie werden im weiteren Verlauf durch kontinuierlich in das Gewebe einwandernde Monozyten abgelöst, die dort zu Makrophagen differenzieren (Übersicht bei Janeway et al., 2002).

Makrophagen und DC besitzen darüber hinaus als professionelle antigenpräsentierende Zellen (APZ) eine zwischen dem angeborenen und adaptiven Immunsystem vermittelnde Funktion. Sie initiieren und steuern die Ausrichtung der adaptiven Immunantwort, die im folgenden Abschnitt näher erläutert wird.

### 1.3 Die adaptive Immunantwort

Das erworbene (adaptive) Immunsystem basiert auf den B- und T-Lymphozyten. Sie exprimieren spezifische Rezeptoren auf ihrer Zelloberfläche, die ihnen die Erkennung definierter Strukturen, der sogenannten Antigene, erlauben. Die Erkennung von Antigen führt zu einer klonalen Expansion hochspezifischer B- und T-Lymphozyten (Burnet, 1959), die eine effektive Immunantwort ermöglicht, und auch, bei erneuter Infektion mit demselben Erreger, für die spätere Gedächtnisreaktion verantwortlich ist. Innerhalb dieses Systems vermitteln die B-Zellen durch die Produktion von spezifischen Immunglobulinen (Antikörpern), die der Markierung (Opsonierung) von Pathogenen und Fremdpartikeln für phagozytische Zellen sowie dem Komplementsystem dienen, die humorale Immunität (Übersicht bei Cambier et al., 1994). T-Lymphozyten nehmen dagegen regulatorische und zellvermittelte Effektorfunktionen wahr (Gowans und Knight, 1964). Der überwiegende Teil der naiven Lymphozyten konzentriert sich in den lymphatischen Organen, wo durch komplexe Wechselwirkungen mit verschiedenen Zellen ihre Aktivierung zu Effektorzellen erfolgt (Übersicht bei Janeway et al., 2002).

#### 1.3.1 Grundlagen der B- und T-Zellaktivierung

Der Antigenrezeptor der B-Lymphozyten (*B cell receptor*, BCR) besteht aus membranständigen Immunglobulinen (IgM und IgD), die ein breites Spektrum unterschiedlicher Strukturen in ihrer nativen Form erkennen. Dazu gehören Peptidsequenzen sowie Kohlenhydratstrukturen und Epitope von Oberflächenproteinen pathogener Mikroorganismen (Übersicht bei Poljak, 1991). Reife immunkompetente B-Lymphozyten zirkulieren zwischen Knochenmark und sekundären lymphatischen Organen, bis sie auf ein passendes Antigen treffen und, mit Unterstützung

antigenspezifischer T-Helferzellen, aktiviert werden (Übersicht bei DeFranco, 1987; Übersicht bei Janeway et al., 2002).

Im Gegensatz zum BCR erkennt der Antigenrezeptor der T-Lymphozyten (*T cell receptor*, TCR) ausschließlich Peptidantigene, die der intrazellulären Prozessierung von Proteinen entstammen und den T-Zellen im Komplex mit Molekülen des Haupthistokompatibilitätskomplexes (*major histocompatibility complex*, MHC) auf der Zelloberfläche präsentiert werden (Doherty und Zinkernagel, 1974; Babbitt et al., 1985). Der TCR besteht aus einem kovalent verknüpften Heterodimer, das für die Antigenpezifität verantwortlich ist. Bei der Mehrheit der T-Zellen besteht dieses aus einer  $\alpha$ - und einer  $\beta$ -Kette, bei einer Subpopulation von T-Zellen aus einer  $\gamma$ - und einer  $\delta$ -Untereinheit. Daneben gehören akzessorische Membranmoleküle wie der CD3-Komplex, der für die intrazelluläre Signaltransduktion verantwortlich ist, und die Korezeptoren CD4 und CD8 zum TCR-Komplex (Übersicht bei Weiss und Littman, 1994). Anhand der Expression der CD4- und CD8-Korezeptoren werden die T-Lymphozyten in CD4-positive ( $CD4^+$ ) T-Helferzellen und CD8-positive ( $CD8^+$ ) zytotoxische T-Zellen (*cytotoxic T lymphocytes*, CTL) unterteilt. CD4 und CD8 binden an autologe MHC-Moleküle auf der Oberfläche der kontaktierten Zelle. Dabei interagiert der CD4-Korezeptor mit Molekülen der MHC-Klasse II (Cammarota et al., 1992), der CD8-Korezeptor mit Molekülen der MHC-Klasse I (Gao et al., 1997).

Aktivierte zytotoxische  $CD8^+$ -T-Lymphozyten (CTL) sind die wesentlichen Effektorzellen der zellvermittelten Immunität. Sie dienen der Eliminierung infizierter sowie maligne entarteter Zellen. Aktivierte CTL exprimieren den Fas-Liganden, der in Fas-positiven Zielzellen Apoptose induzieren kann, und setzen vesikuläre Granula frei, die lytische Enzyme wie Perforin und Proteasen enthalten (Übersicht bei Squier und Cohen, 1994). Darüber hinaus sezernieren CTL Zytokine wie Interferon- $\gamma$  ( $IFN\gamma$ ), das unter anderem zur Aktivierung von Makrophagen beiträgt und die Replikation von Viren inhibieren kann (Übersicht bei Harty et al., 2000). Die Aktivierung von CTL erfolgt durch Zellen, auf deren Oberfläche ihr TCR sein spezifisches Antigen im Komplex mit MHC I-Molekülen erkennt. Diese werden auf nahezu allen kernhaltigen Zellen exprimiert. Peptidantigene, die von  $CD8^+$ -T-Zellen im Komplex mit MHC I detektiert werden, besitzen eine Länge von 8 bis 10 Aminosäuren und entstammen in der Regel der proteolytischen Degradation zytosolischer Proteine durch den LMP-Proteasekomplex (*large multifunctional proteasome*, LMP) (Übersicht bei Harding und Unanue, 1990; Übersicht bei Rammensee, 1995).



CD4<sup>+</sup>-T-Lymphozyten nehmen dagegen hauptsächlich regulatorische Funktionen wahr und werden deshalb auch als T-Helferzellen (T<sub>H</sub>) bezeichnet. Ihr TCR erkennt Peptidantigene von 12 bis 24 Aminosäuren im Komplex mit Molekülen der MHC-Klasse II. Diese werden nahezu ausschließlich von professionellen antigen-präsentierenden Zellen (APZ) exprimiert, zu denen insbesondere dendritische Zellen (DC) und Monozyten/Makrophagen, aber auch B-Zellen gehören (Übersicht bei Chesnut und Grey, 1985). Die von CD4<sup>+</sup>-T-Zellen erkannten Peptidantigene entstammen hauptsächlich extrazellulärem Material, das durch Phagozytose aufgenommen und in den APZ prozessiert wurde (Übersicht bei Rammensee, 1995). Bei einer Entzündung oder einer Infektion verlassen die APZ die betroffenen Gewebe und wandern in die T-Zell-reichen Zonen der sekundären lymphatischen Organe, wo die Aktivierung der T-Zellen erfolgt. Antigene aus dem Blut werden dagegen von APZ der Milz aufgenommen und dort den T-Lymphozyten präsentiert (Übersicht bei Janeway et al., 2002).

Aktivierte CD4<sup>+</sup>-T-Effektorzellen üben ihre Funktion hauptsächlich durch die Freisetzung löslicher Mediatoren aus (Übersicht bei Paul und Seder, 1994). Anhand des von ihnen sezernierten Zytokinspektrums und ihrer damit verbundenen Funktion wurden sie zunächst in zwei Hauptgruppen unterteilt (Mosmann und Sad, 1996). Typ I-Helferzellen (T<sub>H</sub>1-Zellen) sind durch die Produktion von Interleukin-2 (IL-2), Lymphotoxin und inflammatorischen Zytokinen wie IFN $\gamma$  gekennzeichnet (Seder et al., 1993) und tragen zur Aktivierung von Makrophagen und der zellvermittelten Immunität bei, während Typ II-Helferzellen (T<sub>H</sub>2-Zellen) hauptsächlich die Zytokine IL-4, IL-5, IL-10 und IL-13 freisetzen und die Ausbildung einer humoralen Immunantwort, d. h. die Aktivierung der Antikörperproduktion in B-Zellen, fördern (Abbas et al., 1996; Übersicht bei Moser und Murphy, 2000). Inzwischen wurden weitere Untergruppen von CD4<sup>+</sup>-T-Zellen beschrieben, die immunsuppressive Funktionen ausüben und als regulatorische T-Zellen (Treg) bezeichnet werden (Sakaguchi et al., 1995; Takahashi et al., 2000; McGuirk und Mills, 2002; Sakaguchi, 2003). Typ I-Treg-Zellen (Tr1) produzieren hauptsächlich IL-10 (Groux et al., 1997; Doetze et al., 2000; McGuirk et al., 2002; MacDonald et al., 2002), während Typ 3-Helferzellen (T<sub>H</sub>3) vorwiegend TGF $\beta$  freisetzen (Chen et al., 1994; Fukaura et al., 1996), und CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>-Zellen Immunantworten durch direkten Zell-Zell-Kontakt inhibieren können (Übersicht bei Shevach, 2000).

## 1.4 Die T-Zellaktivierung erfordert kostimulatorische Signale

Die durch Antigenkontakt induzierten Signale alleine reichen für eine Aktivierung naiver T-Lymphozyten und auch B-Lymphozyten nicht aus. Die Bindung des TCR und seiner Korezeptoren CD4 oder CD8 an den MHC/Peptidkomplex auf normalen Körperzellen induziert lediglich eine partielle Aktivierung, die durch eine verstärkte Expression von CD69, CD44 und der IL-2-Rezeptoruntereinheit  $\alpha$  (CD25) gekennzeichnet ist (Sagerstrom et al., 1993; Ho et al., 1994). Sie führt schließlich zur lokalen Deletion der Lymphozyten durch Apoptose oder aber zu Anergie, einem Zustand, in dem sich die T-Zelle auch bei optimaler Stimulation durch ihr spezifisches Antigen nicht mehr aktivieren lässt (Schwartz, 1990). Auf diese Weise wird die periphere Toleranz induziert.

Das zweite Signal, das für die vollständige Aktivierung naiver T-Zellen erforderlich ist (Übersicht bei Croft und Dubey, 1997), wird von der APZ vermittelt, die gleichzeitig auch den passenden MHC/Peptid-Komplex präsentiert. Professionelle APZ wie Makrophagen und DC exprimieren auf ihrer Zelloberfläche kostimulatorische Moleküle. Die am gründlichsten untersuchten Kostimulatoren, B7.1 (CD80) und B7.2 (CD86), gehören der B7-Proteinfamilie an. Sie werden von aktivierten APZ verstärkt exprimiert (Hathcock et al., 1994) und interagieren mit dem CD28-Molekül, das auf der Oberfläche der Mehrzahl naiver T-Zellen und auch Gedächtniszellen exprimiert wird (Übersicht bei Linsley und Ledbetter., 1993; Übersicht bei Lenschow et al., 1996). Die Antigenerkennung (Signal 1) und die Interaktion von CD28 auf der Oberfläche der T-Zelle mit den B7-Molekülen auf APZ (Signal 2) führt in der T-Zelle zur Produktion des T-Zellwachstumsfaktors IL-2 sowie der Expression des funktionellen IL-2-Rezeptors, und die T-Zelle beginnt in der Folge zu proliferieren (Übersicht bei Smith, 1980 und 1984; Schorle et al., 1991). IL-2 wirkt dabei autokrin auf die IL-2-produzierende T-Zelle selbst wie auch parakrin auf andere T-Zellen und scheint für die klonale Expansion der reaktiven T-Zellen wichtig zu sein. Nach erfolgreicher Aktivierung differenzieren die T-Zellen nicht nur zu Effektorzellen aus. Ein Teil von ihnen entwickelt sich zu Gedächtniszellen, die im Organismus verweilen und bei einer erneuten Infektion mit demselben Antigen schnell aktiviert werden können. Für die Aktivierung von CD4<sup>+</sup>- und CD8<sup>+</sup>-Gedächtniszellen sind dann kostimulatorische Signale nicht mehr erforderlich (Übersicht bei Janeway et al., 2002).

Daneben wird die T-Zellaktivierung auch durch Negativregulatoren beeinflusst. So exprimieren aktivierte T-Zellen neben CD28 das CTLA-4-Molekül (*cytotoxic*

*T-lymphocyte antigen-4*, Syn.: CD152), das mit hoher Affinität ebenfalls die genannten B7-Moleküle bindet, im Gegensatz zu CD28 jedoch ein inhibitorisches Signal vermittelt. Auf diese Weise trägt CTLA-4 zur Beendigung einer T-Zellreaktion bei (Waterhouse et al., 1996). Die Balance kostimulatorischer und inhibitorischer Signale verhindert außerdem die Ausbildung einer unangemessenen oder fehlgeleiteten T-Zellantwort.

#### 1.4.1 Die Gefahrensignal-Theorie

Eine gängige Theorie von der immunologischen Toleranz ging lange davon aus, dass allein die Erkennung und Unterscheidung von „fremd“ und „selbst“ für die Ausbildung einer Immunantwort verantwortlich ist. Jedoch ruft nicht jedes Fremdmaterial, das in den Organismus eindringt, z. B. Bakterien in der Nahrung und im Darm, eine Immunreaktion hervor. Auch die Impfung von Antigenen in Abwesenheit eines Adjuvanz führt nicht zur Induktion einer Immunantwort. Deshalb schlug Charles Janeway 1992 eine Erweiterung dieses Modells vor, nach der das Immunsystem zusätzlich zwischen „fremd, aber nicht infektiös“ und „fremd und infektiös“ unterscheidet. Nach Janeways Theorie befähigt allein infektiöses Fremdmaterial die APZ zur Vermittlung des kostimulatorischen zweiten Signals, das für die Ausbildung einer spezifischen und effektiven Immunantwort notwendig ist.

Generell ist die alleinige Unterscheidung von „fremd“ und „selbst“ durch das Immunsystem mit einem sich entwickelnden Organismus und einem sich dabei stetig verändernden Repertoire von „selbst“-Antigenen jedoch nicht vereinbar. Außerdem sind einige Immunreaktionen, die sich gegen „selbst“ wenden, zum Beispiel gegen körpereigene Moleküle, die von gestressten Zellen oder Tumorzellen exprimiert werden, durchaus nützlich.

1994 postulierte Polly Matzinger die Gefahrensignal-Theorie (Matzinger, 1994; Matzinger, 2001). Sie besagt, dass das Immunsystem nicht auf „fremd“, sondern vielmehr auf „Gefahr“ reagiert. Nach ihrer Theorie wird eine Gefahrensituation, wie z. B. die Infektion mit einem pathogenen Erreger, die mechanische Zerstörung von Gewebe oder auch die Gegenwart von maligne entarteten Zellen, anhand des angerichteten Schadens durch das Immunsystem erkannt. Erkennungsmerkmal sind dabei körpereigene Moleküle, die normalerweise in intrazellulären Kompartimenten verborgen vorliegen, von infizierten und nekrotischen oder auch Tumorzellen jedoch in die Umgebung freigesetzt und als „Gefahrensignal“ durch das Immunsystem detektiert

werden können. Wie die Erkennung von PAMP steigert auch die Detektion dieser endogenen Gefahrensignale das kostimulatorische Potential von APZ und befähigt sie zur Vermittlung des für die T-Zellaktivierung notwendigen zweiten Signals. Außerdem erleichtert die Konditionierung von APZ durch PAMP oder endogene Gefahrensignale auch die Stimulation von T-Zellen, die ihr Antigen auf anderen APZ oder Gewebezellen erkennen. Dieser multiplikative Effekt führt zu einer effektiven und der Situation optimal angepaßten Immunantwort, da das von APZ erzeugte Zytokinmilieu maßgeblich die Polarisierung einer Immunantwort in Richtung einer  $T_H1$ -,  $T_H2$ - oder auch  $T_H3$ - oder  $Tr1$ -Antwort bestimmt. Eine zentrale Rolle spielt dabei das Zytokin IL-12. Es stimuliert die Produktion von IFN $\gamma$  in NK-Zellen wie auch T-Zellen und dirigiert die Immunantwort in Richtung einer  $T_H1$ - und CTL-Antwort (Macatonia et al., 1995), die insbesondere für die Bekämpfung intrazellulärer Pathogene (Frosch et al., 1996; Marovich et al., 2000) wie auch Tumorzellen wichtig ist (Brunda et al., 1993; Übersicht bei Colombo und Trinchieri, 2002). Die meisten Bakterien und Viren sowie Leishmanien, Mycobakterien, Trypanosomen etc. stimulieren die IL-12-Produktion in APZ (Frosch et al., 1996; Reis e Sousa et al., 1997; Henderson et al., 1997; Cella et al., 2000; Marovich et al., 2000) und regen die Ausbildung einer  $T_H1$ - und CTL-Antwort an, während einige Nematoden die Expression von IL-12 inhibieren. In Abwesenheit von IL-12 wird hier die Entstehung von  $T_H2$ -Antworten begünstigt (Velupillai und Harn, 1994).

Zu den bekanntesten PAMP gehören bakterielle Zellwandbestandteile wie Lipopolysaccharide (LPS) und Lipoproteine sowie bakterielle CpG-DNA. Sie werden von Rezeptoren der TLR-Familie erkannt, deren Engagement zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B führt (Medzhitov et al., 1997; Übersicht bei Kopp und Medzhitov, 1999) und in DC und Makrophagen unter anderem die Expression von kostimulatorischen B7- sowie MHC-Klasse II-Molekülen und die Freisetzung proinflammatorischer Zytokine induziert (Cella et al., 1997; Pierre et al., 1997; Hertz et al., 2001; Vieira et al., 2000; Re und Strominger, 2001; Übersicht bei Janeway und Medzhitov, 2002; Übersicht bei Barton und Medzhitov, 2002; Übersicht bei Akira, 2003).

Als endogene Gefahrensignale kommen Moleküle in Betracht, die normalerweise konstitutiv und in verhältnismäßig großen Mengen verborgen im Zellinnern vorliegen oder in Stresssituationen verstärkt exprimiert werden. Sie können durch mechanische Zellschädigung und nekrotisches Absterben von Zellen oder aber auch im Rahmen einer

Infektion in den Extrazellulärraum freigesetzt werden. Gute Kandidaten hierfür sind Moleküle, die Teil des Zellmetabolismus sind, wie zum Beispiel intrazelluläre Nucleotide wie ATP und UTP (Marriott et al., 1999; Mutini et al., 1999; Schnurr et al., 2000). Daneben werden auch die Mitglieder der konservierten Hitzeschockproteinfamilie, die insbesondere in Stresssituationen oder infolge einer Infektion in sehr großen Mengen synthetisiert werden, seit einiger Zeit als endogene Gefahrensignale diskutiert. Sie verfügen über immunologische Funktionen, die im folgenden Abschnitt näher erläutert werden.

## 1.5 Immunmodulatorische Funktionen von Hitzeschockproteinen

Hitzeschockproteine (HSP) sind evolutionär hochkonservierte und ubiquitär in allen lebenden Organismen exprimierte Proteine, die eine wichtige Rolle bei der Proteinbiogenese spielen und für das zelluläre Überleben essentiell sind (Ang et al., 1991). Eine Einteilung der HSP in Untergruppen und die Bezeichnung individueller HSP erfolgt anhand ihres Molekulargewichtes. Dabei werden die 90 kDa- (u. a. Hsp90 und gp96), 70 kDa- (u. a. Hsp70 und grp78) und 60 kDa-HSP (u. a. Hsp60) unterschieden. HSP werden konstitutiv in verschiedenen zellulären Kompartimenten exprimiert, in denen viele von ihnen als molekulare Chaperone an der Faltung von Proteinen mitwirken und den interkompartimentären Proteintransport begleiten. Hsp70 und Hsp90 sind im Zytosol für die Stabilisierung und Neufaltung assoziierter Proteine verantwortlich, Hsp60 und mtHsp70 (mitochondriales Hsp70) sind in den Mitochondrien an Import und Faltung von Proteinen beteiligt, und grp78 (*glucose-regulated protein of 78 kDa*) und gp96 (*glucose-regulated protein of 96 kDa*) sind im Endoplasmatischen Reticulum bei der Faltung und Assoziation von Proteinen aktiv (Übersicht bei Becker und Craig, 1994; Übersicht bei Hartl, 1996; Übersicht bei Bukau und Horwich, 1998). Die meisten HSP werden in Situationen von zellulärem Stress wie Hitze, Hypoxie, Nährstoffmangel oder auch bei Infektionen vorübergehend verstärkt exprimiert (Young und Elliot, 1989; Übersicht bei Morimoto et al., 1990; Übersicht bei Young, 1990). Sie werden deshalb auch als „Stressproteine“ bezeichnet, die aufgrund ihrer Funktionen unter diesen Bedingungen für das Überleben der Zelle besonders wichtig sind. Neben ihrer zentralen Rolle bei Proteinfaltung und –transport innerhalb der Zelle besitzen HSP auch wichtige immunologische Funktionen.

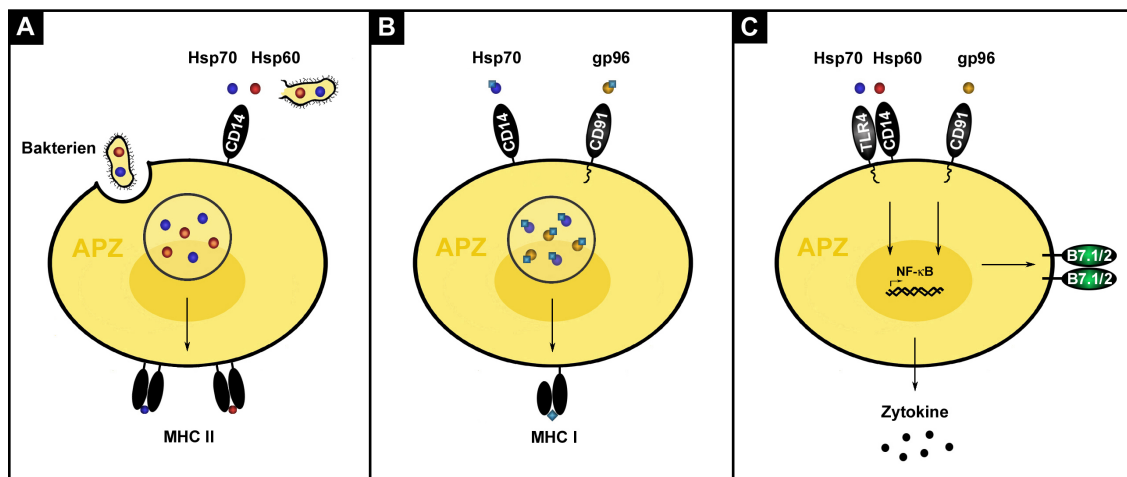
Einige mikrobielle HSP wie bakterielles Hsp60 und Hsp70, die bei Infektionen aus Bakterien freigesetzt oder durch Phagozytose mit den Bakterien aufgenommen werden können, sind selbst immunogen und können eine spezifische Immunantwort induzieren. Beispielsweise reagieren bei einer Infektion mit Mycobakterien bis zu 20% der CD4<sup>+</sup>-T-Zellen spezifisch auf das mycobakterielle Hsp60-Protein (Emmrich et al., 1986; Kaufmann et al., 1987; Munk et al., 1990). Auch im mycobakteriellen Hsp70 wurden B- und T-Zellepitope identifiziert (Adams et al., 1994; Offtung et al., 1994).

In der jüngeren Vergangenheit wurden auch Hinweise darauf gefunden, dass HSP die Immunogenität von Tumorzellen beeinflussen können und möglicherweise als therapeutisches Mittel bei der Induktion von tumorspezifischen Immunantworten einsetzbar sind. HSP wie Hsp70, Hsp90 und gp96, die mit zellulären Peptiden assoziieren, besitzen die Fähigkeit, eine spezifische zytotoxische Immunantwort gegen das von ihnen transportierte Peptid und damit gegen die Donorzellen, aus denen sie isoliert wurden, zu induzieren (Übersicht bei Srivastava et al., 1998; Übersicht bei Schild et al., 1999). Die HSP/Peptid-Komplexe können offenbar von APZ aufgenommen und die transportierten Peptide für die Präsentation in Molekülen der MHC-Klasse I prozessiert werden (Castellino et al., 2000). So konnten DC, die mit aus Tumoren isoliertem Hsp70 präinkubiert worden waren, eine tumorspezifische CTL-Antwort und Immunität gegenüber dem Tumor *in vivo* induzieren (Ueda et al., 2004). Darüber hinaus konnte die Expression von löslichem sekretiertem Hsp70 oder die Überexpression von zytosolischem Hsp70 die Immunogenität von Tumorzellen steigern und das Tumorstadium *in vivo* inhibieren (Massa et al., 2004; Wang et al., 2004). Ähnliche Funktionen wurden auch für gp96 beschrieben, dessen Expression auf der Zelloberfläche von Tumorzellen die Reifung dendritischer Zellen und ebenfalls eine tumorspezifische Gedächtnisreaktion *in vivo* induzieren konnte (Zheng et al., 2001; Dai et al., 2003).

Seit einiger Zeit werden HSP auch als endogene Gefahrensignale und Bindeglieder zwischen angeborener und adaptiver Immunantwort diskutiert (Matzinger, 1994; Pennisi, 1996; Gallucci und Matzinger, 2001). Sowohl von bakteriellen wie auch eukaryontischen HSP wurde eine immunmodulatorische Aktivität nachgewiesen. Unter anderem wurde gezeigt, dass Hsp60, Hsp70 und gp96 sowohl die Zytokin- und Chemokinproduktion als auch die Expression kostimulatorischer B7-Moleküle in DC und Makrophagen aktivieren (Übersicht bei Tsan und Gao, 2004). Hsp60 wie auch Hsp70 binden wahrscheinlich an das CD14-Molekül, das auf der Oberfläche von DC

und Makrohagen exprimiert wird. Dieses Molekül scheint sowohl für die Aktivierung humaner Monozyten durch Hsp70 (Asea et al., 2000) als auch die Aktivierung humaner Makrophagen durch Hsp60 (Kol et al., 2000) essentiell, besitzt jedoch selbst keine signaltransduzierende zytoplasmatische Domäne. Allerdings assoziiert CD14 mit signaltransduzierenden Rezeptoren der TLR-Familie. Es wurde sowohl die Interaktion von CD14 mit TLR2 (Yang et al., 1998; Kirschning et al., 1998) als auch TLR4 (Ulevitch et al., 1995) beschrieben. Diese Rezeptoren, insbesondere TLR4, sind wahrscheinlich für die durch Hsp60 (Ohashi et al., 2000; Vabulas et al., 2001) und auch Hsp70 induzierte Signaltransduktion verantwortlich. Interessanterweise fungiert der CD14/TLR4-Komplex ebenfalls als Hauptrezeptor für bakterielles LPS, das seinerseits in Assoziation mit dem LPS-bindenden Protein LBP an diesen Rezeptorkomplex bindet (Ulevitch et al., 1995; Hoshino et al., 1999). Tatsächlich wurde gezeigt, dass Hsp60, Hsp70 und LPS in DC und Makrophagen sehr ähnliche Effekte induzieren, die wahrscheinlich auf das Engagement desselben Rezeptorsystems zurückzuführen sind. Dazu gehören die Expression kostimulatorischer B7-Moleküle und die Freisetzung proinflammatorischer Zytokine wie IL-6, IL-12 und TNF $\alpha$  (Chen et al., 1999; Kol et al., 2000; Moré et al., 2001; Moré, 2001). Beide HSP besitzen außerdem wie LPS einen Einfluss auf die Aktivierung von T-Zellen. Die Stimulation von APZ durch Hsp60, Hsp70 oder LPS führt *in vitro* bei der antigenabhängigen Aktivierung von CD4<sup>+</sup>- wie auch CD8<sup>+</sup>-T-Zellen zu einer gesteigerten Freisetzung von IFN $\gamma$  (Breloer et al., 2001; Moré et al., 2001; Breloer et al., 2002), die eine Polarisierung in Richtung einer T<sub>H</sub>1- und CTL-Antwort begünstigt.

Eine Übersicht über die beschriebenen immunologischen Funktionen der HSP ist in Abbildung 1.1 schematisch dargestellt.



**Abb. 1.1 Immunmodulatorische Funktionen der Hitzeschockproteine**

A) Bakteriell Hsp60 und Hsp70 sind immunogene Proteine, die von APZ durch Phagozytose von Bakterien oder als freie Proteine über spezifische Rezeptoren, u. a. wahrscheinlich CD14, aufgenommen und im Zellinnern für die MHC II-Präsentation prozessiert werden. B) Peptid-assoziierte HSP wie Hsp70 und gp96 werden nach ihrer Bindung an die putativen Rezeptoren CD14 bzw. CD91 von APZ aufgenommen, die transportierten Peptide für die Präsentation in MHC-Molekülen der Klasse I prozessiert und eine zytotoxische T-Zellantwort induziert. C) Hsp60, Hsp70 und gp96 aktivieren in APZ die Produktion proinflammatorischer Zytokine wie IL-1, IL-6, IL-12 und TNF $\alpha$  sowie die Expression kostimulatorischer B7-Proteine auf der Zelloberfläche. Der mutmaßliche gp96-Rezeptor CD91 verfügt selbst über eine signaltransduzierende zytoplasmatische Domäne, während das Signal, das durch Hsp60 und Hsp70 vermittelt wird, wahrscheinlich über TLR, die mit dem CD14-Rezeptor assoziieren, transduziert wird. Hieran scheint TLR4 beteiligt. Die Modulation der APZ-Funktionen durch diese HSP erleichtert in der Folge ebenfalls die Aktivierung von T-Zellen.

## 1.6 Fragestellung und Ziel der Arbeit

Das eukaryontische mitochondriale Hsp60 wurde erstmals von Chen und Mitarbeitern (1999) als endogenes Gefahrensignal diskutiert. Es wird unter Stressbedingungen, wie Hitzeeinwirkung oder bei einer Infektion, verstärkt exprimiert. Außerdem wurde auch eine Translokation dieses HSP aus den Mitochondrien in andere zelluläre Kompartimente wie dem Zytosol und die Expression des Hsp60-Proteins auf der Zelloberfläche beschrieben (Belles et al., 1999). Auf diese Weise wird das Hsp60-Protein, wie auch durch die Freisetzung aus nekrotischen Zellen, in Gefahrensituationen für Zellen des Immunsystems zugänglich.



Die Arbeiten verschiedener Autoren haben gezeigt, dass sowohl mikrobielles als auch eukaryontisches Hsp60 in Makrophagen die Produktion der proinflammatorischen Zytokine IL-6, IL-12 und TNF $\alpha$  sowie von Stickstoffmonoxid (NO) stimuliert (Chen et al., 1999; Moré et al., 2001; Breloer et al., 2002; Ueki et al., 2002) und die Reifung und Aktivierung von DC induziert (Moré, 2001; Bethke et al., 2002). Die Modulation der APZ-Funktionen durch Hsp60 führt in der Folge bei der Aktivierung naiver CD4<sup>+</sup>- und CD8<sup>+</sup>-T-Zellen *in vitro* zu einer gesteigerten Produktion des T<sub>H</sub>1-Zytokins IFN $\gamma$  (Moré et al., 2001; Breloer et al., 2001; Breloer et al., 2002).

In allen bisher durchgeführten Studien wurde rekombinantes in Bakterien exprimiertes Hsp60-Protein verwendet. Diese Proteinpräparationen waren jedoch mit bakteriellen Komponenten, insbesondere LPS, kontaminiert. Da Hsp60 und bakterielles LPS mutmaßlich denselben Rezeptorkomplex aus CD14 und TLR4 auf der Oberfläche von APZ zu nutzen scheinen und deshalb sehr ähnliche Effekte vermitteln, konnte eine Beteiligung von LPS und auch anderen bakteriellen Strukturen an der Hsp60-vermittelten Aktivierung nicht ausgeschlossen werden. Neuere Arbeiten stellen generell die immunstimulatorische Aktivität dieses Hitzeschockproteins in Frage. So wurde gezeigt, dass von LPS gereinigtes Hsp60 die TNF $\alpha$ -Produktion in Makrophagen nicht mehr induzieren konnte (Gao und Tsan, 2003).

Im Rahmen dieser Arbeit sollte deshalb geklärt werden, ob Hsp60 eine intrinsische Aktivität zur Stimulation von Immunreaktionen besitzt. Hierfür sollte ein Endotoxin-freies *in vitro*-Testsystem etabliert und für diesen Zweck das Hsp60-Protein in eukaryontischen Zellen exprimiert werden. Dabei sollte das Hsp60-Protein sowohl als lösliches sezerniertes als auch als membranverankertes Protein auf der Zelloberfläche eukaryontischer Zelllinien, insbesondere muriner Tumorzellen, zur Expression gebracht werden. Mit Hilfe dieser Zelllinien sollte zunächst in *in vitro*-Testsystemen die immunmodulatorische Funktion des Hsp60-Proteins auf die Aktivierung naiver T-Zellen überprüft und die der aktivatorischen Funktion von Hsp60 zugrundeliegenden Mechanismen analysiert werden. Dabei sollte die Modulation von APZ- und T-Zellfunktionen durch Hsp60 und LPS vergleichend untersucht werden, und auch die Frage nach einer Beteiligung des TLR4 bei der Hsp60-vermittelten Immunstimulation geklärt werden.

Schließlich sollte die Relevanz der *in vitro* beobachteten immunstimulatorischen Kapazität des Hsp60-Proteins *in vivo* überprüft und dabei die Immunogenität Hsp60-exprimierender versus Hsp60-negativer Tumorzellen betrachtet werden.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Herkunft häufig verwendeter Laborgeräte und Chemikalien

##### 2.1.1.1 Laborgeräte und Hilfsmittel

Bezeichnung	Herkunft
Analysenwaage	Sartorius AG, Göttingen
Autoklav	Schlumbohm Medizintechnik, Hamburg
Bakterienbrutschrank	Heraeus, Hanau
Bakterienschüttelinkubator	Braun, Melsungen
Celluphanfolien	Novex, San Diego, CA, USA
CO <sub>2</sub> -Inkubator für die Zellkultur	Heraeus Instruments, Hanau
Deckgläschen	Kern & Söhne, Alberstadt
Digitalwaage	Kern & Söhne, Alberstadt
Elektroporationsgerät „Gene Pulser“	BioRad, München
Elektroporationsküvetten (4 mm)	Peqlab, Erlangen
ELISA 96-Loch-Platten	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
ELISA-Reader „Lambda E“	MWG Biotech, Ebersberg
ELISPOT 96-Loch-Kulturplatten	Millipore GmbH, Eschborn
ELISPOT-Reader	Biosys GmbH, Karben-Frankfurt
Eppendorfszentrifuge 5415C	Eppendorf, Hamburg
Erlenmeyer-Kolben	Schütt Labortechnik, Göttingen
FACS-Röhrchen	Becton Dickinson, Heidelberg
FACS Sorter „FACSCalibur“	Becton Dickinson Immunocytometry Systems, San Jose, CA, USA
Falcon-Zentrifugenröhrchen (15 ml, 50 ml)	Becton Dickinson, Heidelberg
Filmkassetten	Siemens, München
Fluoreszenzmikroskop „Axioskop MC-80“ mit Kameraanlage	Zeiss, Oberkochen
Gamma-Bestrahlungsanlage	STS Steuerungstechnik & Strahlenschutz, Braunschweig
Gelkammern (DNA-Gelelektrophorese)	BioRad, München
Gelkammern (SDS-PAGE)	BioRad, München
Geltrocknungsrahmen (SDS-PAGE)	Novex, San Diego, CA, USA
Gewebekulturflaschen (10 ml, 30 ml, 50 ml)	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Gewebekulturplatten (6-, 24-, 96-Loch)	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Heizblock „Thermomixer 5436“	Eppendorf, Hamburg
HiTrap Endotoxin-free Protein A-Säulen	Amersham Pharmacia, Uppsala, Schweden

Hyperfilm ECL (Röntgenfilm)	Amersham Biosciences, Freiburg
Kanülen	Braun, Melsungen
Kühlanlage „Modell K20“	Haake, Karlsruhe
Kryoröhrchen	Nunc, Roskilde, Dänemark
MACS Pre-Separation-Filter	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
MACS-Säulen (Separation Columns LS)	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
Magnetrüher	Janke & Kunkel, IKA, Labortechnik, Staufen
Mehrkanalpipetten „Research Pro“	Eppendorf, Hamburg
Mischgerät (Vortexer) „MS 1 Minishaker“	Janke & Kunkel, IKA, Labortechnik, Staufen
Mikroskop „Wilovert“	Hund, Wetzlar
Netzgeräte	Biotec-Fischer, Reiskirchen
Neubauer-Zählkammer (0.1 × 0.0025 mm <sup>2</sup> )	Brandt, Wertheim
Nitrocellulose-Membran	Amersham Pharmacia, Uppsala, Schweden
Objektträger	Engelbrecht, Edermünde
Pasteurpipetten	Brandt, Wertheim
PCR-Cycler „Hybaid OmniGene“	Hybaid Ltd., Middlesex, UK
PD10-Säulen	Amersham Pharmacia, Uppsala, Schweden
Petrischalen (unbeschichtet)	Nerbe plus, Winsen/Luhe
pH-Meter „WTW pH 537“	Labotec, Wiesbaden
Photometer „Hitachi U-2000“	Schäfer & Partner Scientific Instruments, Schwäbisch-Gmünd
Pipetten	Eppendorf, Hamburg
Pipettenspitzen	Greiner Bio-One, Frickenhausen, Sarstedt, Nürnberg
Pipettierhilfe „pipetus-akku“	Hirschmann, Eberstadt
Plastikküvetten für Photometer	Brandt, Wertheim
Quarzküvetten für Photometer	Roth, Karlsruhe
Reagenzgläser	Schütt Labortechnik, Göttingen
Reinluft-Werkbank „Lamin Air HB2448“	Heraeus Instruments, Hanau
Schottflaschen	Schütt Labortechnik, Göttingen
Spritzen (1ml, 6 ml)	Braun, Melsungen
Sterilfilter (Porengröße 0.22 µm und 0.45 µm)	Millipore, Bedford, MA, USA
Sterilfiltriergefäße „SteriCup“ (250 u. 500 ml)	Millipore, Bedford, MA, USA
SW55-Rotor und Einsätze	Beckmann, Palo Alto, USA
SW55 Ti-Röhrchen	Beckmann, Palo Alto, USA
Vivaspin PES-Konzentrierungssäulen (10 kDa)	Vivascience, Hannover
Wasserbad	GFL, Burgwedel
Wasserdeionisierungsanlage „Milli-Q-Plus“	Millipore, Molsheim, Frankreich
Whatman-Filterpapier	Schleicher & Schuell, Dassel
Zellsiebe „Cell strainer 70 µm“	Falcon/Becton Dickinson, Heidelberg

**Zentrifugen:**

Eppendorfszentrifuge 5415C	Eppendorf, Hamburg
Megafuge 1.0R, Megafuge 2.0R	Heraeus-Sepatech, Hanau
Zytospin-Zentrifuge „Cytospin 3“	Shandon Life Sciences Internationl, Frankfurt

**2.1.1.2 Chemikalien und Reagenzien**

Chemikalien wurden, sofern nicht anders vermerkt, von den Firmen Sigma (Deisenhofen), Fluka (Neu-Ulm), Merck (Darmstadt) oder Roth (Karlsruhe) bezogen.

**2.1.1.2.1 Biochemische Arbeiten**

Bezeichnung	Herkunft
Acrylamid (30%)/Bisacrylamid (0.8%)	Roth, Karlsruhe
Ammoniumpersulfat (APS)	Roth, Karlsruhe
Aqua ad iniectabilia	Braun, Melsungen
BenchMark Prestained MW-Marker	Gibco BRL, Eggenstein
Bovines Serumalbumin (BSA)	Serva Feinbiochemika, Heidelberg
Complete Proteaseinhibitor-Cocktail	Böhringer Mannheim, Mannheim
Coomassie Plus Proteinassay Reagenz	Pierce, Rockford, IL, USA
Coomassie Brillant Blau	Roth, Karlsruhe
Diaminobenzidin (DAB)	BioRad, München
Dithiothreitol (DTT)	Gibco BRL, Eggenstein
ECL-Lösungen	Amersham Pharmacia, Freiburg
Fluorescein-Ex Protein Labeling Kit (F-10240)	Molecular Probes, Leiden, Niederlande
Glycin	Sigma, Deisenhofen
Milchpulver	Nestlé, Frankfurt
Protein 10 kDa-Leiter	Gibco BRL, Eggenstein
Streptavidin-HRP	Dianova, Hamburg
Sucrose	Biochrom AG, Berlin
TEMED	BioRad, München
Tetramethylbenzidin (TMB)	Roth, Karlsruhe
Tween-20	Sigma, Deisenhofen

**Zytokinstandards:**

murines IL-6	PharMingen BD, Hamburg
murines IL-12	PharMingen BD, Hamburg
murines TNF $\alpha$	PharMingen BD, Hamburg

**ELISA-Kits:**

DuoSet IFN $\gamma$ ELISA Kit	R & D Systems, Wiesbaden
-------------------------------	--------------------------

DuoSet IL-2 ELISA Kit	R & D Systems, Wiesbaden
Hsp60 ELISA Kit	Stressgen, Victoria, BC, Canada

### 2.1.1.2.2 Molekularbiologische Arbeiten

Bezeichnung	Herkunft
Agarose	Biomol, Hamburg
Ampicillin	Boehringer Mannheim, Mannheim
Bacto Agar	Merck, Darmstadt
Bacto Trypton	Difco, Detroit, MI, USA
BigDye-Sequenziermix	Applied Biosystems, Foster City, CA, USA
5-Brom-4-chlor-3-indolyl- $\beta$ -D-galactosid (X-Gal)	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
Bromphenolblau	Sigma, Deisenhofen
Deoxyribonukleosidtriphosphate (dNTPs)	Boehringer Mannheim, Mannheim
DNA-Marker (100 bp-Leiter, 1 kb-Leiter)	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
EndoFree Plasmidmaxipräparationskit	QIAGEN, Hilden
Ethidiumbromid	Sigma, Deisenhofen
Glycerol	Merck, Darmstadt
Hefeextrakt	Difco, Detroit, MI, USA
Mineralöl	Sigma, Deisenhofen
RPM Rapid Pur Minipräparationskit	Bio 101, Carlsbad, CA, USA
TA-Cloning Kit	Invitrogen, Karlsruhe
TriReagent	Biotech Trade & Serv, St. Leon Rot
QIAGEN Gel Extraction Kit	QIAGEN, Hilden
Xylencyanol FF	Serva Feinbiochemika, Heidelberg
<b>Plasmidvektoren:</b>	
pcDNA1.1/Amp	Invitrogen, Karlsruhe
pCR2.1	Invitrogen, Karlsruhe
pCR2.1/Hsp60- $\textcircled{a}$	BNI, Hamburg
pDisplay	Invitrogen, Karlsruhe
pEF-BOS	zur Verfügung gestellt von S. Mizushima und S. Nagat; Mizushima und Nagata, 1990
pFM92	zur Verfügung gestellt von P. Gunning und L. Kedes; Gunning et al., 1987
<b>Enzyme:</b>	
Alkalische Phosphatase (1 U/ $\mu$ l)	Boehringer Mannheim, Mannheim
Alkalische Phosphatase-Reaktionspuffer	Boehringer Mannheim, Mannheim
Restriktionsendonukleasen:	
<i>Bam</i> HI (10 U/ $\mu$ l)	MBI Fermentas, St. Leon-Rot

<i>Bgl</i> II (10 U/μl)	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
<i>Eag</i> I (10 U/μl)	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
<i>Eco</i> R I (10 U/μl)	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
<i>Hind</i> III (10 U/μl)	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
<i>Not</i> I (10 U/μl)	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
<i>Sal</i> I (10 U/μl)	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
<i>Sca</i> I (10 U/μl)	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
<i>Xba</i> I (10 U/μl)	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
<i>Xho</i> I (10 U/μl)	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
Reverse Transkriptase „Superscript RT“ (200 U/μl)	Gibco BRL, Eggenstein
Reverse Transkriptase-Reaktionspuffer	Gibco BRL, Eggenstein
T4-DNA-Ligase (5 U/μl)	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
T4-DNA-Ligase-Reaktionspuffer	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
Taq-DNA-Polymerase (5 U/μl)	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
Taq-DNA-Polymerase-Reaktionspuffer	MBI Fermentas, St. Leon-Rot

**Oligonukleotid-Primer:**

<i>Bgl</i> II-sense, 33mer 5´-CGCAGATCTGCCAAAGATGTAAAATTTGGTGCG-3´	MWG Biotech AG, Ebersberg
hIgG1-Revers, 21mer 5´-TGAAGCTTAGTACTCACCCCTC-3´	MWG Biotech AG, Ebersberg
Hsp60-mas, 21mer 5´-TGCTACAACCTGAAGACCAAC-3´	MWG Biotech AG, Ebersberg
Hsp60-mas#2, 22mer 5´-CCCATTGTAAACAGCTACAGCAT-3´	MWG Biotech AG, Ebersberg
Hsp60-Sequenzierprimer I, 21mer 5´-TCCAGTGTTCAGTCCATTGTC-3´	MWG Biotech AG, Ebersberg
Hsp60-Sequenzierprimer II, 21mer 5´-CATCGTCACCAAAGATGATGC-3´	MWG Biotech AG, Ebersberg
Hsp60-Sequenzierprimer III, 21mer 5´-GAATGCAGGTGTTGAAGGATC-3´	MWG Biotech AG, Ebersberg
Hsp60-Sequenzierprimer IV, 23mer 5´-CGAAGCTGTAGTGACAGAAATTC-3´	MWG Biotech AG, Ebersberg
Hsp60-Sequenzierprimer V, 27mer 5´-TGTAGTGACAGAAATTCCTAAAGAAGA-3´	MWG Biotech AG, Ebersberg
Hsp60-Sequenzierprimer VI, 25mer 5´-AAAACATCATCTCAGAAGAGGATCTG-3´	MWG Biotech AG, Ebersberg
Hsp60-Sequenzierprimer VII, 22mer 5´-AAAGGGATCATTTGATCCAACAA-3´	MWG Biotech AG, Ebersberg
M13-Forward (-20)-Primer, 16mer 5´-CTGGCCGTCGTTTTAC-3´	MWG Biotech AG, Ebersberg

M13-Reverse-Primer, 17mer 5´-CAGGAAACAGCTATGAC-3´	MWG Biotech AG, Ebersberg
Oligo (dT) <sub>15</sub> -Primer	MWG Biotech AG, Ebersberg
p19-sense, 21mer 5´-ACAGCCAGTTCTGCTTGCAAA-3´	MWG Biotech AG, Ebersberg
p19-antisense, 21mer 5´-AGGCTTCGAAGGATCTTGGA-3´	MWG Biotech AG, Ebersberg
p35-sense, 21mer 5´-AGACCACAGATGACATGGTGA-3´	MWG Biotech AG, Ebersberg
p35-antisense, 21mer 5´-CTAGAATGATCTGCTGATGGT-3´	MWG Biotech AG, Ebersberg
p40-sense, 21mer 5´-ATCAAGAGCAGTAGCAGTTCC-3´	MWG Biotech AG, Ebersberg
p40-antisense, 21mer 5´-AGGCTTCATCTGCAAGTTCTT-3´	MWG Biotech AG, Ebersberg
pcDNA1.1-Forward, 21mer 5´-CTCTCTGGCTAACTAGAGAAC-3´	MWG Biotech AG, Ebersberg
pcDNA1.1-Reverse, 21mer 5´-AATCTCTGTAGGTAGTTTGTG-3´	MWG Biotech AG, Ebersberg
pDisplay-Forward, 22mer 5´-CTTACTGGCTTATCGAAATTAA-3´	MWG Biotech AG, Ebersberg
pDisp- <i>Bam</i> H I-antisense, 30mer 5´-GTTCCGATCCAAGAACATGCCGCCTCCCAT-3´	MWG Biotech AG, Ebersberg
pDisp- <i>Hind</i> III-sense, 25mer 5´-TGGAAGCTTCGGCTTGGGGATATCC-3´	MWG Biotech AG, Ebersberg
pDisp- <i>Xba</i> I-antisense, 22mer 5´-CTGGCATCTAGAAGGCACAGTC-3´	MWG Biotech AG, Ebersberg
pDisp- <i>Xba</i> I-sense, 27mer 5´-CTAATCTAGAGAACCCACTGCTTACTG-3´	MWG Biotech AG, Ebersberg
pEF-BOS-Forward, 22mer 5´-GAGACTGAAGTTAGCCAGCTTG-3´	MWG Biotech AG, Ebersberg
pFM92-Forward, 21mer 5´-ATTGACGTCAATGGGAGTTTG-3´	MWG Biotech AG, Ebersberg
<i>Sal</i> I-antisense, 30mer 5´-AAGGTCGACATAGAACATGCCGCCTCCCAT-3´	MWG Biotech AG, Ebersberg

### 2.1.1.2.3 Zellkulturarbeiten

Bezeichnung	Herkunft
Anti-Fade-Lösung	BiomedDia, Zweibrücken
Cohn II (humane IgG-Fraktion)	Sigma, Deisenhofen
Cytofix/Cytoperm-Lösung	PharMingen BD, Hamburg
DAPI	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim

Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma, Deisenhofen
Fötiales Kälberserum (FCS)	Sigma, Deisenhofen
Fugene6-Transfektionsreagenz	Roche, Mannheim
G418	Calbiochem, Frankfurt
Gentamycin	PAA, Linz, Österreich
HEPES	PAA, Linz, Österreich
Laufmittel für FACS	Becton Dickinson Immunocytometry Systems, San José, CA, USA
L-Glutamin	PAA, Linz, Österreich
Lipopolysaccharid (LPS; <i>E. coli</i> 055:B5)	Sigma, Deisenhofen
Mausserum	CALTAG, Burlingame, CA, USA
MHC II depletion Kit	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
Pan T cell Kit	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
Perm/Wash-Lösung	PharMingen BD, Hamburg
RPMI 1640-Kulturmedium ohne L-Glutamin	PAA, Linz, Österreich
Streptavidin-FITC	Dianova, Hamburg
Thioglycolat	Sigma, Deisenhofen
Triton X100	Sigma, Deisenhofen
Trypanblau	Serva Feinbiochemika, Heidelberg
Wachsstift	DAKO, Glostrup, Dänemark

### 2.1.2 Antikörper

Bezeichnung	Herkunft
<b>ELISA:</b>	
Biotin Ratte anti-Maus IL-6 (MP5-32C11)	PharMingen BD, Hamburg
Biotin Ratte anti-Maus IL-12p40/p70 (C17.8)	PharMingen BD, Hamburg
Biotin Ratte anti-Maus TNF $\alpha$ (MP6-XT3)	PharMingen BD, Hamburg
Kaninchen anti-Ratte/Maus-HRP	DAKO, Hamburg
Ratte anti-Maus IL-6 (MP5-20F3)	PharMingen BD, Hamburg
Ratte anti-Maus IL-12p40/p70 (C15.6)	PharMingen BD, Hamburg
Ziege anti-Maus/Ratte TNF $\alpha$ (MP6-XT22)	PharMingen BD, Hamburg
Kaninchen anti-human IgG (C <sub>H</sub> 2)	DAKO, Hamburg
Kaninchen anti-human IgG-HRP	DAKO, Hamburg
<b>ELISPOT:</b>	
Maus IFN $\gamma$ -Antikörperset	Becton Dickinson, Heidelberg
Maus IL-2-Antikörperset	Becton Dickinson, Heidelberg
<b>FACS:</b>	
anti-Maus pan NK-Zellen (DX5)-FITC	PharMingen, Hamburg



Esel anti-human IgG (H+L) F(ab) <sup>2</sup> -PE	Dianova, Hamburg
Maus anti-Maus Hsp60 (SPA806)	Stressgen, Victoria, BC, Canada
Maus-anti- <i>myc</i> (9E10)	Upstate Biotechnology, Cambridge, UK
Maus-anti-HA (12CA5)	Roche, Mannheim
Ratte anti-Maus CD4-FITC (CT-CD4)	CALTAG, Burlingame, CA, USA
Ratte anti-Maus CD8 $\alpha$ -PE (CT-CD8a)	CALTAG, Burlingame, CA, USA
Ratte anti-Maus CD11b-PE (MAC-1)	CALTAG, Burlingame, CA, USA
Ratte anti-Maus CD11c-PE (HL3)	CALTAG, Burlingame, CA, USA
Ratte anti-Maus CD80-PE (RMMP1)	CALTAG, Burlingame, CA, USA
Ratte anti-Maus CD86-FITC (RMMP2)	CALTAG, Burlingame, CA, USA
Ziege anti-Maus IgG/M-FITC	Dianova, Hamburg

**Western-Blot:**

anti-Maus IgG-HRP	DAKO, Hamburg
Maus anti-Maus Hsp60 (SPA806)	Stressgen, Victoria, BC, Canada
Maus-anti- <i>myc</i> (9E10)	Upstate Biotechnology, Cambridge, UK
Maus-anti-HA (12CA5)	Roche, Mannheim
Kaninchen anti-human IgG-HRP	DAKO, Hamburg

**T-Zellstimulation:**

anti-CD3 (1452C11)	Hybridomüberstand, BNI
--------------------	------------------------

**Neutralisation:**

Kaninchen anti-Maus IFN $\beta$ (polyklonal)	R & D Systems, Wiesbaden
Kaninchen IgG (Isotypkontrolle)	R & D Systems, Wiesbaden
Ratte anti-Maus IL-6 (MP5-20F3)	Becton Dickinson, Heidelberg
Ratte anti-Maus IL-12p40/p70 (C17.8)	Becton Dickinson, Heidelberg
Ratte anti-Maus TNF $\alpha$ (MP6-XT3)	Becton Dickinson, Heidelberg
Ratte anti-Maus IFN $\alpha$ (RMMA-1)	R & D Systems, Wiesbaden
Ratte IgG2A (Isotypkontrolle) (KLH/G2a-1-1)	Dianova, Hamburg

**2.1.3 Peptide und Proteine**

Bezeichnung	Herkunft
OVA-Peptid OVA <sub>323-339</sub> , HPLC-gereinigt (ISQAVHAAHAENEAGR)	Sigma, Deisenhofen
OVA-Peptid OVA <sub>257-264</sub> , HPLC-gereinigt (SIINFEKL)	MWG Biotech, Ebersberg
humanes Hsp60 (hHsp60) (rekombinant)	Loke Diagnostics ApS, Aarhus, Dänemark

humanes CD83-Ig (hCD83-Ig) (Fusionsmolekül aus der extrazellulären Domäne des humanen CD83-Moleküls und dem Fc-Fragment des humanen IgG1) BNI, Hamburg; Cramer, 2001

### 2.1.4 Bakterien

Bezeichnung	Herkunft
<i>E. coli</i> DH5 $\alpha$ F'	New England Biolabs, Bad Schwalbach

### 2.1.5 Zelllinien

Bezeichnung	Ursprung	Beschreibung
58 $\alpha$ $\beta$ <sup>-</sup>	C56BL/6-Maus	H-2 <sup>b</sup> ; $\alpha$ $\beta$ -TCR defiziente T-Zellen
B16	C56BL/6-Maus	H-2 <sup>b</sup> ; Melanomzellen
EL-4	C56BL/6-Maus	H-2 <sup>b</sup> ; T-Zellen
COS1	Rhesusaffe	Nierenzellen
RAW264.7	Balb/c-Maus	H-2 <sup>d</sup> ; Makrophagen
RMA	C56BL/6-Maus	H-2 <sup>b</sup> ; T-Zellen
RT23HD6	C57BL/6-Maus	H-2 <sup>b</sup> ; Fibroblasten
X63 (ATCC: P3X63Ag8.653)	Balb/c-Maus	H-2 <sup>d</sup> ; B-Lymphoblasten, die keine Immunglobuline exprimieren

### 2.1.6 Tiere

Für alle Experimente wurden weibliche Mäuse verwendet, die im hauseigenen Tierstall gehalten oder von der Bundesanstalt für Risikobewertung (Berlin) beziehungsweise der Firma Charles River (Sulzfeld) bezogen wurden. Die Tiere wurden im Alter von sechs bis acht Wochen eingesetzt. Sofern nicht anders erwähnt, wurde der Mausstamm ursprünglich von Charles River Laboratories, Wilmington, MA, USA, bezogen.

Bezeichnung	Beschreibung	Herkunft, Referenz
Balb/c	H-2 <sup>d</sup>	BNI, Hamburg; Bundesanstalt für Risikobewertung, Berlin
Balb/c-IL-12p40 <sup>-/-</sup>	H-2 <sup>d</sup> ; Mäuse, die defizient für die Produktion der p40-Untereinheit von IL-12 und IL-23 sind	BNI, Hamburg; Magram et al. 1996
C57BL/6	H-2 <sup>b</sup>	BNI, Hamburg
C3HHeJ	C3HHeN-Mäuse, die aufgrund eines Aminosäureaustausches (P712H) einen disfunktionellen TLR4 exprimieren	Charles River, Sulzfeld; Poltorak et al., 1998

C3HHeN	Wildtyp-Kontrollmäuse	Charles River, Sulzfeld; Poltorak et al., 1998
C3HHeN-MyD88 <sup>-/-</sup>	Mäuse, die für das TLR-Adaptermolekül MyD88-defizient sind.	Charles River, Sulzfeld; Kawai et al., 1999
DO11.10	H-2 <sup>d</sup> ; T-Zellrezeptor-transgene Mäuse. Der TCR erkennt einen Komplex aus I-A <sup>d</sup> und dem aus dem Hühnerovalbumin stammenden 17er-Peptid OVA <sub>323-339</sub> .	BNI, Hamburg; Bundesanstalt für Risikobewertung, Berlin; Hosken et al. 1995
OT-1	H-2 <sup>b</sup> ; T-Zellrezeptor-transgene Mäuse. Der TCR erkennt einen Komplex aus H2-K <sup>b</sup> und dem aus dem Hühnerovalbumin stammenden 8er-Peptid OVA <sub>257-264</sub> .	BNI, Hamburg; Hogquist et al. 1994

## 2.1.7 Puffer und Stammlösungen

Alle Puffer und Lösungen wurden mit deionisiertem Wasser angesetzt. Für die Verwendung in der Zellkultur wurden hitzeunempfindliche Lösungen autoklaviert (135°C, 2 bar, 20 min) und hitzeempfindliche Lösungen sterilfiltriert (Porengröße 0.22 µm). Fötale Kälberserum (FCS) wurde zur Inaktivierung von Komplementfaktoren dreißig Minuten bei 56°C erhitzt und bis zur Verwendung bei -20°C gelagert.

### 2.1.7.1 Biochemische Arbeiten

Bezeichnung	Zusammensetzung
Ammoniumpersulfat (APS)-Stammlösung	10 % APS in H <sub>2</sub> O
Coomassie-Entfärber	300 ml 95% Ethanol 100 ml Eisessig 600 ml H <sub>2</sub> O
Coomassie-Färbelösung	2 g Coomassie Brillant Blau R250 500 ml 95% Methanol 100 ml Eisessig 400 ml H <sub>2</sub> O
Diaminobenzidin (DAB)-Stammlösung	40 mg/ml DAB in H <sub>2</sub> O
ELISA-Blockpuffer	1×PBS mit 1% BSA
ELISA-und ELISPOT-Coating-Puffer	Lösung 1: 10 mM Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> Lösung 2: 20 mM NaHCO <sub>3</sub> Beide Lösungen werden bis Erreichen von pH9.6 gemischt.
ELISA-Substratpuffer	100 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ×H <sub>2</sub> O, pH5.5

ELISA-Substratlösung	200 µl ELISA-TMB-Lösung 12 ml ELISA-Substratpuffer 1.2 µl 30% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
ELISA-TMB-Lösung	60 mg Tetramethylbenzidin (TMB) 10 ml DMSO
ELISA-Stopplösung	2 M H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>
ELISA-Waschpuffer	1×PBS mit 0.05% (v/v) Tween 20
ELISPOT-Substratlösung	10 ml 100 mM Tris pH7.5 200 µl DAB (40 mg/ml) 50 µl NiCl <sub>2</sub> (80 mg/ml) Zugabe von 5 µl H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> nach Sterilfiltration
HiTrap-Bindepuffer	Lösung 1: 20 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> Lösung 2: 20 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> Beide Lösungen werden bis Erreichen von pH7.0 gemischt.
HiTrap-Elutionspuffer	0.1% Zitronensäure in H <sub>2</sub> O, pH3-6
HiTrap-Neutralisierungspuffer	1 M Tris-HCl pH9.0
Nickelchlorid-Stammlösung	80 mg/ml NiCl <sub>2</sub> in H <sub>2</sub> O
PBS (20×)	32 g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ×2H <sub>2</sub> O 5.3 g NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ×1H <sub>2</sub> O 164 g NaCl ad 1 l H <sub>2</sub> O Für 1×PBS ergibt sich hiermit pH7.2.
SDS-PAGE-Ladepuffer (5×)	50 mM Tris 2.5 M Glycin 1% SDS
SDS-PAGE-Laufpuffer (10×)	250 mM Tris 2.5 M Glycin 1% SDS
SDS-PAGE-Polyacrylamidgel (10%)	Sammelgel: 1.25 ml 4×Sammelgelpuffer 0.8 ml 30% Acrylamid/0.8% Bisacrylamid 3 ml H <sub>2</sub> O 50 µl APS 5 µl TEMED  Trenngel: 2.5 ml 4×Sammelgelpuffer 3.5 ml 30% Acrylamid/0.8% Bisacrylamid 4 ml H <sub>2</sub> O 100 µl APS 12.5 µl TEMED
SDS-PAGE-Sammelgelpuffer (4×)	0.5 M Tris pH6.8 0.4% SDS
SDS-PAGE-Trenngelpuffer (4×)	1.5 M Tris pH8.8 0.4% SDS

Silberfärbung-Entwickler	15 g Na <sub>2</sub> CO <sub>2</sub> 250 ml H <sub>2</sub> O 12.5 µl Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> 125 µl 37% Formaldehyd
Silberfärbung-Fixierer	100 ml Methanol 24 ml Eisessig 76 ml H <sub>2</sub> O
Silberfärbung-Imprägnierer	300 mg AgNO <sub>3</sub> 150 ml H <sub>2</sub> O 112 µl 37% Formaldehyd
Silberfärbung-Waschpuffer	50% Ethanol in H <sub>2</sub> O
Silberfärbung-Sensibilisierer	300 µl Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> 200 ml H <sub>2</sub> O
Western-Blot-Anodenpuffer I	300 mM Tris pH10.4 20% Methanol
Western-Blot-Anodenpuffer II	25 mM Tris pH10.4 20% Methanol
Western-Blot-Blockpuffer	1×PBS mit 4 % Magermilchpulver und 0.1% Tween 20
Western-Blot-Kathodenpuffer	25 mM Tris pH9.4 20% Methanol 40 mM ε-Aminocapronsäure
Western-Blot-Waschpuffer	1×PBS mit 0.1% Tween 20

### 2.1.7.2 Molekularbiologische Arbeiten

Bezeichnung	Zusammensetzung
Ampicillin-Stammlösung (1000×)	50 mg/ml
Calciumchlorid-Lösung	50 mM CaCl <sub>2</sub> in H <sub>2</sub> O
DNA-Ladepuffer (6×)	0.25% Bromphenolblau 0.25% Xylencyanol FF 15% Ficoll
dNTP-Mix für PCR	2 mM dATP 2 mM dCTP 2 mM dGTP 2 mM dTTP
dNTP-Mix für RT-PCR	10 mM dATP 10 mM dCTP 10 mM dGTP 10 mM dTTP
Ethidiumbromid-Lösung	10 mg/ml Ethidiumbromid in H <sub>2</sub> O
MES-Stammlösung	1 M MES, mit KOH auf pH6.2 einstellen

MOPS-Stammlösung	1 M MOPS in H <sub>2</sub> O
Natriumacetatlösung zur DNA-Fällung	3 M Natriumacetat pH4.6
TAE-Puffer (50×)	2.0 M Tris-Base pH8.3 0.6 M Natriumacetat 0.1 M Na <sub>2</sub> EDTA
TBE-Puffer (10×)	0.89 M Tris-Base pH8.0 0.89 M Borsäure 20 mM Na <sub>2</sub> EDTA
Tfb1-Puffer	5 ml MES-Stammlösung 1.103 RbCl <sub>2</sub> 0.735 g CaCl <sub>2</sub> × 2 H <sub>2</sub> O 4.94 g MnCl <sub>2</sub> × 4 H <sub>2</sub> O ad 500 ml H <sub>2</sub> O, auf pH6.5 mit Essigsäure einstellen
Tfbll-Puffer	10 mM MOPS 75 mM CaCl <sub>2</sub> 10 mM KCL 15% Glycerol
X-Gal-Stammlösung	2% X-Gal in Dimethylformamid (DMF)

**Nährmedien:**

Luria Bertani (LB)-Medium	10 g Bactotrypton 5 g Hefeextrakt 10 g NaCl ad 1 l H <sub>2</sub> O
LB-Agar	15 g Agar ad 1 l LB

Jeweils etwa 25 ml der autoklavierten LB-Agar-Lösung wurden in Petrischalen gegossen, die Platten zum Aushärten einige Stunden bei Raumtemperatur abgekühlt und bis zur Verwendung bei 4°C aufbewahrt. Zur Selektion auf Ampicillin wurden LB-Medium und LB-Agar vor dem Gießen auf eine Konzentration von 50 µg/ml Ampicillin eingestellt. Für die Blau-Weiß-Selektion wurden 50-100 µl X-Gal-Lösung auf den ausgehärteten LB-Agarplatten ausgestrichen.

**2.1.7.3 Zellkulturarbeiten**

Bezeichnung	Zusammensetzung
Chloroquinphosphatlösung (25×)	2.5 mM Chloroquinphosphat in 1×PBS
Cohn II-Stammlösung	10 mg/ml in 1×PBS
DAPI-Stammlösung	640 ng/ml in Methanol
DEAE-Dextranlösung (25×)	10 mg/ml DEAE-Dextran in 1×PBS

DEAE-Puffer	Lösung 1: 20 mM NaCl 20 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> Lösung 2: 20 mM NaCl 20 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> Beide Lösungen werden bis Erreichen von pH7.2 gemischt.
DEAE-Transfektionsmix (für eine 50 ml-Gewebekulturflasche)	19 ml RPMI-Vollmedium 800 µl 25×-Chlorophosphatlösung 800 µl 25×-DEAE-Dextranlösung 20 µg Plasmid-DNA
Erythrozyten-Lysispuffer	10 % 0.1 M Tris/HCl pH7.5 90 % 0.158 M Ammoniumchloridlösung
FACS-Puffer	1×PBS mit 2.5% FCS und 0.1% Natriumazid
FACS-Zellfixierer	1×PBS mit 1% Paraformaldehyd (PFA)
MACS-Puffer	1×PBS mit 0.5% BSA und 2 mM EDTA
PBS (20×)	32 g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ×2H <sub>2</sub> O 5.3 g NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ×1H <sub>2</sub> O 164 g NaCl ad 1 l H <sub>2</sub> O Für 1×PBS ergibt sich hiermit pH7.2.
Trypanblau-Lösung	2 mg Trypanblau in 100 ml 1×PBS
Zelllysispuffer	20 mM Tris pH7.2 150 mM NaCl 1 mM DTT 1% Triton X100 1 Tablette Complete auf 500 ml Puffer
<b>Zellkulturmedien:</b>	
Einfriermedium	50 ml FCS 40 ml RPMI/10% FCS 10 ml DMSO
G418-Selektionsmedium	RPMI/10% FCS mit 1.2 mg/ml G418
G418-Kulturmedium	RPMI/10% FCS mit 0.5 mg/ml G418
RPMI/10% FCS	500 ml RPMI 1640 50 ml FCS 10 ml 1 M HEPES 10 ml 200 mM L-Glutamin 2.5 ml 10 mg/ml Gentamycin

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Molekularbiologische Methoden

#### 2.2.1.1 Isolierung von RNA aus eukaryontischen Zelllinien

Für die Isolierung zytoplasmatischer RNA, die sich aus ribosomaler RNA, Transfer-RNA und zu einem geringen Prozentsatz aus Messenger-RNA (mRNA) zusammensetzt, werden die kultivierten Zellen lysiert, die im Zytoplasma enthaltenen Proteine degradiert und die RNA durch Phenol-Chloroform-Extraktion gewonnen. Hierfür wurde die von Chomczynsky et al. (1987) beschriebene „Acid-Guanidinium-Phenol-Chloroform“ (AGPC)-Methode angewendet, die diese Vorgänge in einem Arbeitsschritt kombiniert. Als starkes Denaturierungsmittel fungiert dabei Guanidinthiocyanat, welches zelluläre RNasen inaktiviert. Für die RNA-Isolierung wurde die gebrauchsfertige AGPC-Lösung TRI-Reagent (Biotech Trade & Serv) eingesetzt, deren Anwendung nach Angaben des Herstellers erfolgte. Für die RNA-Isolierung aus murinen Zellen wurden  $1-6 \times 10^6$  Zellen eingesetzt.

#### 2.2.1.2 Reverse Transkription zur Herstellung von cDNA (RT-PCR)

Fast alle eukaryontischen mRNA-Species besitzen eine lange Adenin-reiche Region an ihrem 3'-Ende. Dieser poly(A)-Schwanz dient als Angriffspunkt von Oligo-(dT)-Primern, die aus einer Nukleotidabfolge von 12-18 dTs bestehen. Diese Primer hybridisieren spezifisch an den poly (A)-Schwanz eukaryontischer mRNAs, so dass von ihnen ausgehend die enzymatische Synthese der entsprechenden cDNA in 5'→ 3'-Richtung mit Hilfe einer Reversen Transkriptase erfolgen kann. Für die cDNA-Gewinnung durch RT-PCR von mRNA wurde ein Oligo-(dT)<sub>15</sub>-Primer verwendet. Die Reaktion erfolgte in einem Volumen von 20 µl und setzte sich wie folgt zusammen:

2 µl RNA (1 µg/µl in H<sub>2</sub>O)  
4 µl 5xReaktionspuffer  
2 µl DTT (1 M)  
2 µl dNTPs (10 mM)  
4 µl Oligo-(dT)<sub>15</sub>-Primer (8 µM)  
5 µl Aqua ad iniectabilia

Der Ansatz wurde fünf Minuten bei 65°C inkubiert, bevor 0.2 µl der Reversen Transkriptase (Superscript RT (200 U/µl), Gibco) zugesetzt wurde. Die Reaktion



erfolgte darauf über eine Stunde bei 37°C. Im Anschluss wurde das Enzym fünf Minuten bei 95°C inaktiviert und das Amplifikat bei -20°C aufbewahrt.

### 2.2.1.3 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion (*polymerase chain reaction*, PCR) ist ein *in vitro*-Verfahren zur enzymatischen Amplifikation definierter DNA-Fragmente mit Hilfe thermostabiler DNA-Polymerasen (Saiki et al., 1988). DNA-Polymerasen synthetisieren in einem zyklischen Prozess ausgehend von Oligonukleotiden, den sogenannten Primern, die sequenzspezifisch an die Einzelstränge hitzedenaturierter DNA hybridisieren (Annealing), komplementäre DNA-Stränge in 5'→3'-Richtung (Primer-Extension). Für die PCR wurde die *Taq*-DNA-Polymerase aus *Thermophilus aquaticus* verwendet und die PCR-Reaktionen in 0.5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäßen unter folgenden Bedingungen durchgeführt:

1 µl cDNA (unverdünnt oder 1:10 verdünnt)  
 bzw. Vektor-DNA (1-3 µg/µl)  
 2,5 µl sense-Primer (10 µM)  
 2,5 µl antisense-Primer (10 µM)  
 2,5 µl 10x*Taq*-Reaktionspuffer  
 2,5 µl dNTPs (2 mM)  
 12,7 µl H<sub>2</sub>O  
0,3 µl *Taq*-DNA-Polymerase (1,5 U)  
 25 µl

Die Reaktion erfolgte nach folgendem Programm:

95°C 1 Min }  
 55°C 2 Min } 30x  
 72°C 2 Min }

Die Reaktionsansätze wurden vor Beginn der Reaktion mit einem Tropfen Mineralöl überschichtet. Als Negativkontrolle diente stets ein Ansatz mit Wasser anstelle der präparierten cDNA.

### 2.2.1.4 Analytische und präparative Gelelektrophorese von DNA

Die Gelelektrophorese ist die wichtigste Methode zur Analyse und Trennung von Nukleinsäuren unterschiedlicher Größe. Im elektrischen Feld wandern Nukleinsäuren aufgrund ihrer negativen Nettoladung in Richtung der Anode. Dabei besteht über einen

weiten Größenbereich der DNA eine (empirisch beobachtete) lineare Abhängigkeit zwischen dem Logarithmus der Länge des Fragmentes (Anzahl der Basenpaare, bp) und der Wanderungsgeschwindigkeit beziehungsweise der relativen Wanderungsstrecke im Gel. Die Wanderungsgeschwindigkeit wird daneben von der Agarosekonzentration, der angelegten Spannung und der Art des Laufpuffers beeinflusst. Lineare DNA-Fragmente von 0.5-7 kb-Länge werden in einem 1-1.5%iges Agarose-Gel aufgetrennt. Für analytische Agarose-Gele wurde ein Tris-Borat/EDTA (TBE)-Laufpuffer verwendet und die Elektrophorese bei 90 V durchgeführt. Für präparative gelelektrophoretische Auftrennungen wurde ein TAE-Puffer verwendet. Dieser hat den Vorteil, dass die Fragmente aus dem Gel leichter und effektiver eluiert werden können. Zudem laufen die DNA-Banden schärfer. Dieser Puffer zersetzt sich jedoch schneller als TBE, so dass mildere Elektrophoresebedingungen gewählt werden müssen (50 V). Die DNA-Proben wurden in DNA-Ladepuffer aufgetragen und als Größenstandards ein 100 bp- und ein 1 kb-Molekulargewichtsmarker eingesetzt (100 bp- und 1 kb-Ladder, Gibco). Die Detektion der DNA-Fragmente im Gel erfolgte mit Hilfe des in die Doppelhelix der DNA interkalierenden Farbstoffs Ethidiumbromid (3,8-Diamino-5-ethyl-6-phenylphenanthridiniumbromid), der dem Gel beim Gießen zugesetzt wurde (0.2 µg/ml). Unter UV-Licht emittiert dieser Farbstoff Licht im orangeroten Bereich. Die Bindung an DNA bewirkt eine Verstärkung der Fluoreszenz, so dass die Färbung der Nukleinsäuren auch in Gegenwart von freiem Ethidiumbromid im Gel sichtbar wird.

#### **2.2.1.5 Extraktion von DNA aus Agarose-Gelen**

Die Gelelektrophorese bietet sich neben der Größenbestimmung auch für die Aufreinigung definierter Fragmente aus DNA-Gemischen, zum Beispiel aus Restriktionsverdau, an. Die Auftrennung erfolgt hierfür in einem präparativen TAE-Agarose-Gel. Die gewünschte Bande kann im Anschluss an die Elektrophorese unter UV-Licht mit einem Skalpell aus dem Gel geschnitten und eluiert werden. Hierfür wurde das „QIAEX II Gel Extraction Kit“ (Qiagen) verwendet und entsprechend den Anweisungen des Herstellers verfahren. Die DNA läßt sich abschließend mit Wasser eluieren und kann bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C Grad aufbewahrt werden.

#### **2.2.1.6 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren**

Nukleinsäuren besitzen ein Absorptionsmaximum bei einer Wellenlänge von 260 nm, wofür die aromatischen Ringe der Basen verantwortlich sind. Die Konzentration von

RNA und DNA in wässriger Lösung kann deshalb photometrisch bestimmt werden. Die Messung erfolgt dabei in Quarzküvetten, da diese das UV-Licht nicht absorbieren. Die gebräuchlichen Quarzküvetten besitzen eine Schichtdicke von 1 cm. Unter diesen Bedingungen besitzt eine DNA-Lösung, die 50 µg/ml doppelsträngige (ds) DNA enthält, beziehungsweise eine RNA-Lösung, die 33 µg/ml einzelsträngige RNA enthält, bei 260 nm eine Optische Dichte (OD) von 1. Diese OD-Werte dienen zur Bestimmung der Konzentration der unbekanntes DNA- oder RNA-Lösung, die sich damit wie folgt berechnet:

$$\begin{aligned} c[\text{RNA}] &= \text{OD}_{260} \times 33 \text{ µg/ml} \times \text{Verdünnungsfaktor} \\ c[\text{dsDNA}] &= \text{OD}_{260} \times 50 \text{ µg/ml} \times \text{Verdünnungsfaktor} \end{aligned}$$

### 2.2.1.7 Restriktionsverdau von DNA

Restriktionsendonukleasen bakteriellen Ursprungs binden doppelsträngige DNA an spezifischen Erkennungssequenzen und spalten die DNA hydrolytisch. Die Spaltstelle der am häufigsten verwendeten Restriktionsenzyme liegt meist innerhalb der Erkennungssequenz, so dass die entstehenden DNA-Fragmente nicht nur durch eine definierte Länge, sondern auch durch definierte Enden charakterisiert sind, was für ihre Klonierung von Bedeutung ist. Alle Restriktionsverdau wurden nach den Angaben der Hersteller durchgeführt. Mehrfachrestriktionen wurden entweder in einem Reaktionspuffer, in dem beide Enzyme eine höchstmögliche Aktivität besitzen, oder nacheinander durchgeführt. Dabei wurde nach dem Erstverdau die DNA im Gel aufgetrennt und mit Hilfe des QIAEX II Gel Extraction Kits (QIAGEN) für die Folgerestriktion eluiert. Für analytische Reaktionen wurden 0.5-1 µg DNA, für präparative Verdau bis zu 4 µg DNA eingesetzt. Die Restriktionsansätze wurden mindestens eine Stunde oder über Nacht bei 37° inkubiert und durch DNA-Gelelektrophorese überprüft.

### 2.2.1.8 Ligation von DNA-Fragmenten in Plasmid-Vektoren

Für die Ligation von DNA-Fragmenten in Plasmid-Vektoren wurde die T4-DNA-Ligase verwendet. Die Ligationsansätze setzten sich wie folgt zusammen:

$$\begin{aligned} &0,5-2,0 \text{ µg DNA-Fragment} \\ &0,25-0,5 \text{ µg Vektor-DNA)} \\ &1 \text{ µl } 10\times\text{T4-Ligase-Puffer} \\ &1 \text{ µl T4-Ligase (4 U)} \end{aligned}$$

Die Ligationen wurden auf Eis pipettiert, über Nacht bei 14°C im Wasserbad oder ein bis zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend für die Transformation von *E. coli* DH5 $\alpha$ F' eingesetzt.

Bei der Zwischenklonierung von PCR-Fragmenten in den von pBluescript abgeleiteten Vektor pCR<sup>®</sup>2.1 erfolgt die Integration des DNA-Fragmentes zwischen *lac*-Promotor und *lacZ*-Fragment des Vektors. Dies erlaubt die Blau-Weiß-Selektion positiver Bakterienkolonien auf X-Gal-haltigem Agar. Die Klonierungsstrategie (TA-Klonierung) beruht bei diesem Vektor auf der matrizenunabhängigen Terminale-Transferase-Aktivität der *Taq*-DNA-Polymerase, die an das 3'-Ende des amplifizierten DNA-Fragmentes Adenylat anhängt. Im Gegenzug besitzt der linearisierte vorliegende pCR<sup>®</sup>2.1-Vektor 5'-Thymidin-Überhänge, so dass die direkte Klonierung *Taq*-amplifizierter DNA aufgrund der komplementären überstehenden 3'-Enden möglich ist. Bei älteren PCR-Amplifikaten, bei denen die A-Überhänge möglicherweise degradiert sind, wurden neue A-Enden mit Hilfe der *Taq*-Polymerase generiert. Hierfür wurden jeweils 7.5  $\mu$ l der aus Agarose-Gelen isolierten PCR-Produkte mit 1  $\mu$ l 10x*Taq*-Reaktionspuffer, 1  $\mu$ l dNTPs (2 mM) und 0.5  $\mu$ l (1,7 U) *Taq*-Polymerase über zwanzig Minuten bei 72°C inkubiert und 6-7  $\mu$ l dieser Reaktion für die anschließende Ligation eingesetzt.

Für die Klonierung in andere Vektoren wurden DNA-Fragmente durch Einfach- oder Doppelverdau aus vorhandenen Vektoren isoliert oder PCR-Amplifikate mit entsprechenden Restriktionsenzymen verdaut. Die Restriktionsfragmente wurden anschließend im präparativen TAE-Agarose-Gel aufgetrennt und die gewünschte DNA aus dem Gel eluiert. Die Vektoren wurden für die Klonierung entsprechend linearisiert und die Enzyme im Anschluss über zehn Minuten bei 68°C deaktiviert. Bei Verwendung verschiedener Restriktionsenzyme ist die Gefahr der Religation des Vektors relativ gering, so dass der linearisierte Vektor in diesen Fällen direkt für die Ligation eingesetzt werden konnte. Bei Linearisierungen durch Einfachverdau wurde dagegen die 5'-Phosphatgruppe des Vektors mit Hilfe der Alkalischen Phosphatase (AP) dephosphoryliert, um eine Religation des Vektors zu vermeiden. Hierfür wurde der Restriktionsansatz im Anschluss an den Verdau mit 3  $\mu$ l AP (3 U) und 10  $\mu$ l 10xAP-Puffer versetzt, das Reaktionsvolumen auf 100  $\mu$ l mit Wasser ergänzt und der Ansatz dreißig Minuten bei 37°C inkubiert. Die AP wurde anschließend zehn Minuten bei 65°C inaktiviert, die DNA mit Hilfe des QIAEX II Gel Extraction Kits entsalzt und für die Ligation eingesetzt. Grundsätzlich wurde bei allen Ligationen auch die

Religationsrate der Vektor-DNA durch Transformation von Bakterien mit dem linearisierten Vektor überprüft.

### **2.2.1.9 Transformation von kompetenten *Escherichia coli* DH5 $\alpha$ F'**

#### **2.2.1.9.1 Herstellung kompetenter *E. coli* DH5 $\alpha$ F'-Bakterien**

Kompetente Bakterien (*E. coli* DH5 $\alpha$ F') wurden mit Hilfe der Calciumchlorid-Methode hergestellt (Hanahan, 1985). Hierfür wurde aus einer 5 ml-Übernachtskultur eine 200 ml-Bakterienkultur in LB-Medium angeimpft, diese bei 37°C und 200 rpm bis zum Erreichen des exponentiellen Wachstums ( $OD_{550} = 0,4 - 0,6$ ) geschüttelt und anschließend pelletiert (2000 rpm, 15 Min, 4°C; Megafuge 1.0R). Alle weiteren Arbeiten erfolgten mit vorgekühlten Lösungen und auf Eis. Das Bakterienpellet wurde in 25 ml Tfb1-Lösung resuspendiert und zwanzig Minuten auf Eis inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation (siehe oben) wurden die Bakterien in 2 ml Tfbll-Puffer aufgenommen, à 100  $\mu$ l in vorgekühlte 1.5 ml-Eppendorfgefäße aliquotiert und bei -70°C aufbewahrt. Auch die Handhabung von Bakterien erfolgte grundsätzlich unter sterilen Bedingungen und mit autoklavierten Medien.

#### **2.2.1.9.2 Transformation kompetenter Bakterien mit Plasmid-DNA**

Für die Transformation kompetenter Bakterien (*E. coli* DH5 $\alpha$ F') wurden vollständige Ligationsansätze beziehungsweise 50-100 ng Vektor-DNA aus Plasmid-Minipräparationen eingesetzt. Die Plasmid-DNA wurde direkt in die auf Eis aufgetaute Bakteriensuspension gegeben, die Transformationsansätze dreißig Minuten auf Eis inkubiert und die Bakterien dann vierzig Sekunden einem Hitzeschock bei 42°C im Wasserbad ausgesetzt. Nach erneuter Inkubation auf Eis (zwei Minuten) wurden die Bakterien in 1 ml LB-Medium eine Stunde bei 37°C und 200 rpm geschüttelt und schließlich auf LB-Amp-Agarplatten ausplattiert. Die Kulturplatten wurden darauf über Nacht im Brutschrank bei 37°C inkubiert und anschließend im Kühlschrank bei 4°C aufbewahrt.

#### **2.2.1.10 PCR-Nachweis transformierter Bakterienkolonien**

Neben der Blau-Weiß-Selektion, die hier außerdem nur bei Verwendung des pCR<sup>®</sup>2.1-Vektors möglich war, dient die PCR-Amplifikation der in die Vektoren integrierten DNA dem Nachweis positiver Bakterienkolonien und der Überprüfung der Ligations-

und Transformationseffizienz. Für die PCR-Analyse wurden Bakterienkolonien mit kurzen Pipettenspitzen auf nummerierte LB-Agarplatten, sogenannte „Masterplates“, überimpft, die weiter über Nacht bei 37°C inkubiert wurden. Die Pipettenspitzen mit ihren anhaftenden Restbakterien wurden in 1.5 ml-Reaktionsgefäße in 100 µl H<sub>2</sub>O gegeben und die Bakterien fünf Minuten bei 95° lysiert. 2 µl dieser Lösung wurden als Template für die PCR eingesetzt, die wie unter 2.2.1.3 beschrieben durchgeführt und durch Gelelektrophorese überprüft wurde. Als Negativkontrolle wurde stets ein Ansatz mit Wasser anstelle des Bakterienlysats mitgeführt.

#### **2.2.1.11 Einfrieren von Bakterien**

Zur Konservierung transformierter Bakterien wurden Glycerol-Stocks angelegt. Hierfür wurden 880 µl einer Übernachtskultur mit 120 µl Glycerin versetzt und bei -70°C eingefroren. Unter diesen Bedingungen bleiben die Bakterien über lange Zeit vital und können erneut in LB-Medium angeimpft werden.

#### **2.2.1.12 Plasmid-Mini- und -Maxipräparation aus Bakterien**

Für Plasmid-Mini- und -Maxipräparationen wurden transformierte Bakterien in 5 ml beziehungsweise 250 ml mit entsprechendem Antibiotikum (50 µg/ml) substituierten LB-Medium zur Selektion bei 37°C und 170 rpm beziehungsweise 200 rpm über Nacht kultiviert. Plasmid-Minipräparationen erfolgten darauf mit Hilfe des RPM-KIT Rapid-Pure Minipreps (Bio 101)-Kits (Macherey & Nagel) beziehungsweise des EndoFree Plasmid-Maxipräparations-Kits (QIAGEN) gemäß den Herstellerangaben. Die Aufreinigungsmethode der Kits beruht auf der alkalischen Lyse der Bakterien und der anschließenden Adsorption der Plasmid-DNA an eine Anionenaustauscher-Matrix unter Niedrig-Salz- und -pH-Bedingungen und führt. Diese Methode ermöglicht die vollständige Eliminierung von RNA, Proteinen und verunreinigenden niedermolekularen Verbindungen und liefert sehr reine Plasmid-DNA, die für den Einsatz in der DNA-Sequenzierung sowie zur Transfektion eukaryontischer Zellen geeignet ist.

#### **2.2.1.13 DNA-Sequenzierung**

Die DNA-Sequenzierung wurde nach der von Sanger und Mitarbeitern 1977 entwickelten Kettenabbruchmethode durchgeführt. Die Sequenzierreaktion kann unter

gleichzeitiger Amplifikation in einem Reaktionsgefäß durchgeführt werden (Cycle Sequencing). Das Reaktionsgemisch enthält dabei neben der zu sequenzierenden Matrizen-DNA, einem Sequenzierprimer und einer DNA-Polymerase die vier Desoxyribonukleosidtriphosphate dATP, dCTP, dGTP und dTTP sowie geringe Mengen der als Terminatoren bezeichneten 2',3'-Dideoxyribonukleosid-Analoga der dNTPs (ddATP, ddCTP, ddGTP und ddTTP). Diese sind mit fluoreszierenden Reportergruppen markiert, werden von der DNA-Polymerase ebenfalls als Substrat akzeptiert und statistisch in die wachsende DNA-Kette integriert. Aufgrund der fehlenden 3'-Hydroxylgruppe führt der Einbau eines solchen ddNTPs jedoch zur Termination der DNA-Synthese und es entsteht ein Gemisch von DNA-Populationen, die ein Fluoreszenzspektrum aufweisen, welches für das endständige Dideoxynukleotid charakteristisch ist. Bei der anschließenden Auftrennung des Gemisches im Sequenziergel kann die Detektion „Online“ erfolgen. Dabei wird das Sequenziergel während des Laufs mit Hilfe eines Lasers abgetastet, und die im klassischen Verfahren örtlich aufgelösten Fragmentmuster werden als zeitlich aufgelöstes Bandenmuster erkennbar, das vom Computer interpretiert und in die entsprechende Basensequenz übersetzt wird. Die Sequenzierungsreaktionen wurden mit einem gebrauchsfertigen Terminator-Kit (*BigDye*-Sequenziermix „PRISM Ready Reaction Dyedexy Terminator Cycle Sequencing Kit“; Applied Biosystems) durchgeführt, der neben den vier dNTPs, der „FF“-*Taq*-Polymerase und dem entsprechenden Reaktionspuffer die mit den in Klammern angegebenen Reportergruppen markierten ddNTPs enthielt: ddATP (5-Carboxyrhodamin), ddGTP (5-Carboxyrhodamin 110), ddTTP (6-Carboxytetramethylrhodamin) und ddCTP (6-Carboxyrhodamin X). Die Reaktionsansätze setzten sich wie folgt zusammen:

0,5 - 1,0 µg Vektor-Template-DNA  
 1,5 µl Primer (10 µM)  
 4 µl *BigDye*-Sequenziermix  
 ad 20 µl ddH<sub>2</sub>O

Die Reaktion erfolgte nach folgendem Programm:

96°C 10 Sek	}	25x
50°C 5 Sek		
60°C 4 Min		

Im Anschluss wurden die Reaktionsprodukte präzipitiert. Hierfür wurden die Ansätze möglichst ohne Verschleppung von Mineralöl in Eppendorf tubes überführt und nacheinander mit 80 µl ddH<sub>2</sub>O, 10 µl 3 M Natriumacetat (pH4,6) und 250 µl Ethanol

(100%) versetzt. Unmittelbar nach Durchmischen wurde die DNA über fünfzehn Minuten bei 13000 rpm und Raumtemperatur pelletiert, das DNA-Pellet mit 250 µl Ethanol (75%) gewaschen, anschließend getrocknet und in 3,5 µl EDTA/Formamid auf das Sequenziergel aufgetragen. Einige Sequenzierungen wurden außerdem durch die Firma MWG (Ebersberg) durchgeführt.

## **2.2.2 Biochemische Methoden**

### **2.2.2.1 Aufreinigung von Ig-Fusionsproteinen über HiTrap/Protein A-Säulen**

Hsp60-Ig-Fusionsproteine wurden mit Hilfe der HiTrap/Protein A-Säulen (Amersham) aufgereinigt. Die Säulen wurden hierfür mit einer 50 ml-Spritze mit 10 ml HiTrap-Bindepuffer äquilibriert. Kulturüberstand von pcDNA1.1-hCD83-Ig- und pcDNA1.1-Hsp60-Ig-transfizierten COS1-Zellen (DEAE-Dextran-Methode, siehe 2.2.3.5.2) wurde im Verhältnis 1:1 mit HiTrap-Bindepuffer verdünnt, durch einen 0.22 µm-Filter sterilfiltriert und mit Hilfe einer 50 ml-Spritze bei einer Durchflussgeschwindigkeit von etwa 1 ml/min unter Druck auf die Säule geladen. Die Säule wurde anschließend mit 10 ml HiTrap-Bindepuffer gewaschen. Für die Elution des gebundenen Proteins wurden 100 µl 1 M Tris (pH9.0) zur Neutralisation in Sammelgefäße vorgelegt und das Protein mit 5 ml HiTrap-Elutionspuffer eluiert. Dabei wurden 1 ml-Fractionen aufgefangen, die anschließend mit Hilfe der SDS-Gelelektrophorese (siehe 2.2.2.5.1) und Western-Blot (siehe 2.2.2.5.5) analysiert wurden.

### **2.2.2.2 Herstellung von Zellysaten für die gelelektrophoretische Analyse**

$5 \times 10^6$ - $1 \times 10^7$  Zellen wurden pelletiert (1200 rpm, 5 Min; Megafuge 2.0R) und dreißig Minuten auf Eis in 50 µl Triton X100-Lysispuffer lysiert. Zellkerne und Debris wurden anschließend durch Zentrifugation bei 13000 rpm (Eppendorffzentrifuge) für zehn Minuten pelletiert und 25 µl des Überstandes im Western-Blot (siehe 2.2.2.5.5) analysiert.

### **2.2.2.3 Fluoreszenzmarkierung von Proteinen**

Für die Markierung von rekombinantem humanen Hsp60-Protein (Loke Diagnostics ApS) wurde das Fluorescein-Ex Protein Labeling Kit (Molecular Probes) verwendet. Dabei wird das Fluorochrom über eine Succinimidylesterbindung unter basischen Bedingungen an primäre Amine des Proteins gekoppelt. 0.5 ml Proteinlösung (1mg/ml)



wurden hierfür mit 50 µl einer 1 M Bicarbonatlösung auf pH7.5-8.5 eingestellt, eine Stunde bei Raumtemperatur mit dem FITC-Reagenz gerührt und mittels Gelfiltrationschromatographie (Bestandteil des Kits) aufgereinigt. Der Lauf des markierten Proteins kann dabei als fluoreszierende Bande an der Front beobachtet werden. Sie setzt sich von einer weiteren Bande, die ungebundenes FITC-Reagenz repräsentiert, ab.

#### **2.2.2.4 Proteinanalyse**

##### **2.2.2.4.1 Diskontinuierliche SDS-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)**

Bei der eindimensionalen diskontinuierlichen SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese werden die Proteine unter denaturierenden Bedingungen aufgrund ihres Molekulargewichtes während ihrer Wanderung durch die Gelmatrix in Richtung der Anode aufgetrennt (Laemmli, 1970). Die Vorbehandlung der Proteine mit SDS (Natriumdodecylsulfat), einem anionischen Detergenz, das die Eigenladung der Proteine effektiv überdeckt, sorgt dafür, dass für die Wanderungsgeschwindigkeit der Proteine allein ihre Masse ausschlaggebend ist. Über bestimmte Bereiche besteht eine lineare Beziehung zwischen dem Logarithmus der jeweiligen Molekulargewichte und den relativen Wanderungstrecken der SDS-Polypeptid-Mizellen, so dass mit Hilfe von Markerproteinen über eine Eichkurve die Molekulargewichte der Proteine ermittelt werden können. Eine besonders gute Auflösung läßt sich dabei im diskontinuierlichen System erzielen. Dabei passiert die Probe zunächst ein Sammelgel mit großer Polyacrylamid-Porenweite (5% Polyacrylamid). Der Sammelgelpuffer besitzt einen pH-Wert von 6.8 und enthält Chlorid-Ionen, deren elektrophoretische Wanderungsgeschwindigkeit größer ist als die der Proteine in der Probe. Der Laufpuffer, in dem die Proben sich befinden, enthält dagegen Glycin, dessen Wanderungsgeschwindigkeit bei diesem pH-Wert geringer ist als die der Proteine in der Probe. Das Resultat ist, dass im Sammelgel ein höherer Spannungsgradient besteht, der die Wanderung der Proteine in dieser Zone beschleunigt. So kommt es zu einer Fokussierung der Proteine in einer scharfen Bande vor Eintritt in das Trenngel, das eine geringere Porenweite, eine höhere Salzkonzentration und einen höheren pH-Wert im Vergleich mit dem Sammelgel aufweist. Im Trenngel wandern die Glycin-Ionen an der Front und die Proteine werden aufgrund ihrer molekularen Größe getrennt. Die SDS-PAGE wurde hier in einem 10%igen Polyacrylamidgel durchgeführt. Sammel- und Trenngel setzten sich dabei wie unter 2.1.7.1 beschrieben zusammen. Die Proben wurden vor dem Auftrag in SDS-

Beladungspuffer fünf Minuten bei 95°C denaturiert. Die Elektrophorese erfolgte bei 120 V über etwa eine Stunde.

#### **2.2.2.4.2 Coomassie-Blau-Färbung**

Coomassie-Brillant-Blau ist ein Triphenylmethanfarbstoff, der relativ unspezifisch an kationische und hydrophobe Seitenketten der Proteine bindet. Am wichtigsten sind die Wechselwirkungen mit Arginin, aber auch mit Lysin, Histidin, Tryptophan, Tyrosin und Phenylalanin. Mit Hilfe dieses Farbstoffes können Proteine direkt im Gel angefärbt werden. Hierfür wird das Gel in Coomassie-Färbelösung eingelegt und etwa eine Stunde geschüttelt. Die Proteine werden dabei gleichzeitig durch Essigsäure im Gel fixiert. Die Entfärbung kann einfach in Wasser oder Coomassie-Entfärber bei Raumtemperatur erfolgen und das Gel nach Spülen in Wasser getrocknet werden.

#### **2.2.2.4.3 Silberfärbung**

Eine für den Nachweis von Proteinen im Polyacrylamidgel deutlich empfindlichere, aber auch komplexere und zeitlich aufwendigere Methode als die Coomassie-Färbung ist die Silberfärbung. Diese Methode beruht auf der Komplexbildung von Silberionen mit Aminosäureseitenketten, insbesondere mit Sulfhydryl- und Carboxylgruppen. Dabei werden sie durch Reduktion in Silberkeime umgewandelt. In einem Mechanismus ähnlich der Fotografie werden nun durch starke Reduktionsmittel alle Silberionen im Gel zu metallischem Silber reduziert. Diese Reaktion erfolgt in der Nähe der Silberkeime viel schneller als im übrigen Gel, so dass sich die Proteinbanden schnell dunkelbraun bis schwarz anfärben. Damit nicht alle Silberionen im gesamten Gel zu metallischem Silber reduziert werden, muss die Reaktion rechtzeitig gestoppt werden. Der Reaktionsabbruch kann durch eine starke pH-Änderung herbeigeführt werden.

Für die Silberfärbung wurden die Polyacrylamidgele zunächst eine Stunde bei Raumtemperatur in 20 ml Fixierer eingelegt, anschließend zweimal zwanzig Minuten in 20 ml Waschpuffer gewaschen und zwei Minuten in 20 ml Sensibilisierungspuffer eingelegt. Nach kurzem Spülen in Wasser wurden die Gele zwanzig Minuten in 20 ml Silbernitratlösung imprägniert, darauf in Wasser gespült und in 20 ml Entwicklerlösung gegeben. Die Entwicklung erfolgte über 1-10 Minuten. Nach Erreichen der gewünschten Bandenintensität wurde die Reaktion durch kurzes Spülen in Wasser und anschließendes Einlegen in Fixierer gestoppt. Nach erneutem Spülen in Wasser konnten die Gele getrocknet werden.

#### **2.2.2.4.4 Trocknen von Polyacrylamidgelen**

Für die Trocknung wurden die Polyacrylamidgele zwischen zwei in Wasser angefeuchtete Cellophanfolien (Novex) eingelegt und in einem Rahmen (Novex) eingespannt. Die Trocknung erfolgte bei Raumtemperatur über mindestens vierundzwanzig Stunden.

#### **2.2.2.4.5 Semi-Dry Western-Blotting**

Das Western-Blotting ist ein Verfahren, mit dem elektrophoretisch aufgetrennte Proteine unter dem Einfluss eines elektrischen Feldes aus der Polyacrylamidmatrix auf eine Membran aus Nitrocellulose transferiert und immobilisiert werden können. Dabei bleibt die lokale Auflösung der elektrophoretischen Auftrennung erhalten. Der Transfer erfolgt aufgrund der negativen Ladung der SDS-beladenen Proteine in Richtung der Anode. Im Anschluss an einen solchen Transfer können die auf der Membran gebundenen Proteine direkt mit Hilfe spezifischer Enzym-gekoppelter Antikörper nachgewiesen werden. Die Semi-Dry-Blot-Apparatur besteht aus Plattenelektroden, zwischen denen der Blotsandwich aus Filterpapieren, Gel und Membran horizontal eingelegt wird. Da die Elution der Proteine aus dem Polyacrylamidgel und die Adsorption an die Membranoberfläche unterschiedliche Bedingungen benötigen, werden die Filterpapiere in entsprechende Puffer eingelegt. Der Blotsandwich setzte sich hier aus drei in Kathodenpuffer äquilibrierten Filterpapieren, dem Gel, der Nitrocellulosemembran und je zwei in Anodenpuffer I beziehungsweise Anodenpuffer II getränkten Filterpapieren zusammen. Der Transfer erfolgte bei konstantem Strom (1 mA pro cm<sup>2</sup> Blotfläche) über eine Stunde.

#### **2.2.2.4.6 Immunodetektion der Proteine mit Chemilumineszenzreaktion**

Die Detektion von Proteinen auf der Nitrocellulosemembran erfolgte durch die spezifische Bindung Peroxidase-gekoppelter Antikörper. Das Enzym Meerrettichperoxidase (*horse radish peroxidase*, HRP) katalysiert unter alkalischen Bedingungen die Nachweisreaktion, bei der Luminol, ein cyclisches Diazylhydrazid, durch Wasserstoffperoxid oxidiert wird. Unmittelbar im Anschluss an die Reaktion wird Energie frei, die in Form von Licht der Wellenlänge  $\lambda=428$  nm emittiert wird und mit Hilfe von Röntgenfilmen detektiert werden kann. Für die Immunodetektion ist es notwendig, eine unspezifische Bindung des primären Antikörpers an die Blotmembran

zu unterbinden, um eine zu hohe Hintergrundfärbung zu vermeiden. Hierfür wurde die Nitrocellulosemembran nach dem Blotten zunächst in 4% Magermilchpulver in PBS/0.1% Tween20 mit Protein abgesättigt. Dies kann entweder über Nacht bei 4°C oder über eine Stunde bei Raumtemperatur erfolgen. Der Blot wurde anschließend in PBS/0.1% Tween20 gründlich gewaschen. Die Detektion des Hsp60-Proteins erfolgte durch Bindung des spezifischen Maus anti-Maus Hsp60-Antikörpers SPA806 (Stressgen), der in einer 1:1000-Verdünnung in PBS/1%BSA/0.01% Natriumazid eingesetzt wurde, über eine Stunde bei Raumtemperatur. Der Blot wurde nach Bindung dieses Primärantikörpers vier mal zehn Minuten in 20 ml Waschpuffer gewaschen und eine Stunde bei Raumtemperatur mit anti-Maus-IgG-HRP (DAKO), 1:2000 in Blockpuffer verdünnt, inkubiert.

Hsp60-Ig- und hCD83-Ig-Fusionproteine wurden im Western-Blot daneben auch durch Bindung des direkt markierten Kaninchen anti-human IgG-HRP-Antikörpers (DAKO), 1:2000 in Blockpuffer verdünnt, detektiert. Nach viermaligem zehnmütigen Waschen der Membran wurden die Proteine mit Hilfe des ECL-Reagenz (Amersham) detektiert. Die beiden Detektionslösungen des Kits wurden hierfür im Verhältnis 1:1 gemischt, der Blot eine Minute in 10 ml der Reaktionslösung inkubiert, vorsichtig abgetupft und ein Röntgenfilm aufgelegt, der nach einer Expositionsdauer zwischen zehn Sekunden und einigen Minuten entwickelt wurde.

#### **2.2.2.4.7 Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford**

Proteine in Lösung wurden mit Coomassie-Brillantblau (Bradford-Reagenz „Coomassie Plus Proteinassay Reagenz“; Pierce) nachgewiesen. In Gegenwart von Proteinen und in saurem Milieu verschiebt sich das Absorptionsmaximum des Coomassie-Brillantblaus G250 von 465 nm zu 595 nm. Grund hierfür ist vermutlich die Stabilisierung des Farbstoffs in seiner unprotonierten anionischen Sulfonat-Form durch Komplexbildung zwischen Farbstoff und Protein. Letztlich können mit Hilfe dieses Farbstoffes Proteine in Lösung photometrisch quantifiziert werden. Anhand der Extinktion kann im Vergleich mit einer Eichkurve die Proteinkonzentration der Probe direkt abgelesen werden. Für die Messung wurden unterschiedliche Verdünnungen der jeweiligen Probe in PBS in einem Volumen von 50 µl eingesetzt. Diese wurden in einer ELISA-Platte mit 96 Vertiefungen (Greiner) mit 150 µl Bradford-Reagenz versetzt und unmittelbar nach Durchmischen im ELISA-Reader bei 595 nm vermessen. Die Proteinkonzentration wurde anhand einer BSA-Verdünnungsreihe ( $c_{\max} = 500 \mu\text{g/ml}$ ) in PBS errechnet.

#### **2.2.2.4.8 ELISA zum Nachweis von Ig-Fusionsproteinen**

Für den Nachweis von Ig-Fusionsproteinen wurde ein hIgG1-spezifischer ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*) etabliert. Hierfür wurde Kaninchen anti-human IgG-Antikörper (DAKO) 1:1000 in Coating-Puffer verdünnt und 50 µl je Vertiefung einer ELISA-Platte pipettiert. Die Platte wurde anschließend zwei Stunden bei 37°C mit 100 µl PBS/1%BSA geblockt und nach dem Waschen in ELISA-Waschpuffer mit 50 µl Kulturüberstand über Nacht inkubiert. Die ELISA-Platten wurden im Anschluss gewaschen und mit 50 µl je Vertiefung Kaninchen anti-human IgG-HRP (DAKO) 1:10000 in PBS/1%BSA eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert, darauf gründlich gewaschen und 100 µl der 3,5,3',5'-Tetramethylbenzidin (TMB)-Substratlösung pipettiert. Die Peroxidase setzt nun das farblose TMB-Substrat in einen blauen Farbstoff um. Sobald eine ausreichende Färbung erreicht war (ca. 10-15 Minuten), wurde die Reaktion durch Zugabe von 25 µl 2 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> gestoppt. Dabei schlägt die Blaufärbung in Gelb um. Die Detektion erfolgte im Anschluss photometrisch bei einer Wellenlänge von 450 nm.

Die Quantifizierung von Hsp60-Ig-Fusionsprotein erfolgte daneben mit Hilfe eines Hsp60-spezifischen ELISA-Kits (Stressgen) nach den Angaben des Herstellers. 5×10<sup>4</sup> transfizierte Hsp60-Ig-exprimierende COS1-Zellen wurden hierfür vierundzwanzig Stunden in 200 µl Kulturmedium inkubiert, und das Kulturmedium unverdünnt oder in einer Verdünnung von 1:10 in mitgeliefertem Verdünnungspuffer für den ELISA eingesetzt. Parallel wurde eine Standardreihe mit rekombinantem Hsp60 (ebenfalls Bestandteil des Kits) mitgeführt. Der ELISA wurde mit TMB entwickelt und die optische Dichte photometrisch bei einer Wellenlänge von 450 nm bestimmt. Die Proteinkonzentration wurde anhand des Standards errechnet.

#### **2.2.2.5 Zytokin-ELISA**

Für die hier durchgeführten Zytokin-ELISA wurden 96-Loch-Flachboden-ELISA-Platten verwendet, die mit einem Antikörper gewünschter Spezifität beschichtet wurden. Hierfür wurden je 50 µl anti-IL-2- (1:180, DuoSet IL-2-ELISA-Kit; R&D Systems), anti-IL-6 (2 µg/ml), anti-IL-12p40/p70- (2 µg/ml), anti-TNF-α- (8 µg/ml) (PharMingen) beziehungsweise anti-IFN-γ-(1:180; DuoSet IFNγ-ELISA-Kit; R&D Systems) Antikörper in Coating-Puffer pipettiert und über Nacht bei 4°C inkubiert. Ungebundene freie Antikörper wurden im Anschluss durch dreimaliges Waschen in

Waschpuffer entfernt und freie Oberflächenbindungsstellen mit 100 µl PBS/1%BSA-Blockpuffer über zwei Stunden bei Raumtemperatur blockiert. Nach erneutem Waschen wurden je 50 µl der verdünnten oder unverdünnten Kulturüberstände (Dreifachwerte) sowie Doppelwerte der jeweiligen Konzentration eines Zytokin-Standards pipettiert. Die Bindung des Antigens an den immobilisierten Antikörper erfolgte über Nacht bei 4°C. Für den Nachweis des gebundenen Antigens wurden biotinylierte sekundäre Antikörper verwendet. Für diesen zweiten Bindungsschritt wurden die Platten nach dem Waschen mit 50 µl des jeweiligen Biotin-Antikörpers in PBS/0,1% BSA über eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert (anti-IL-2-Biotin (1:180, DuoSet IL-2-ELISA-Kit); 1 µg/ml anti-IL-6-Biotin, 1 µg/ml; anti-IL-12-Biotin, 0,5 µg/ml; anti-TNF- $\alpha$ -Biotin, 1 µg/ml (PharMingen); anti-IFN- $\gamma$ -Biotin (1:180, DuoSet IFN $\gamma$ -ELISA-Kit)). Nach dem Waschen der Platten in Waschpuffer erfolgte die Bindung eines Streptavidin-HRP-Konjugats (*horse radish peroxidase*, HRP), welches in einer Verdünnung von 1:10000 beziehungsweise 1:200 (DuoSet IFN $\gamma$ -ELISA-Kit) in PBS/0.1%BSA und einem Volumen von 50 µl eingesetzt wurde. Die Bindung erfolgte über eine Stunde bei Raumtemperatur. Nach gründlichem Waschen wurden je 100 µl TMB-Substratlösung pipettiert und die Reaktion, sobald eine ausreichende Färbung erreicht war, durch Zugabe von 25 µl 2 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> gestoppt. Die Detektion erfolgte unmittelbar im Anschluss photometrisch bei einer Wellenlänge von 450 nm.

### **2.2.3 Methoden der Zellkultur**

#### **2.2.3.1 Allgemeine Bedingungen der Zellkultur und Sterilisation**

Alle Zellkulturarbeiten erfolgten unter sterilen Bedingungen an der Reinluft-Werkbank. Dabei wurden sterilisierte Glaswaren und Lösungen sowie sterile Einmal-Plastikwaren verwendet, um Kontaminationen mit Mikroorganismen zu vermeiden. Plastikwaren und Lösungen wurden hierfür in feuchter Hitze bei 135°C und 2.0-2.2 bar Druck über zwanzig Minuten autoklaviert. Glasgeräte wurden über drei Stunden bei 180°C sterilisiert. Als Basalmedium für die Kultivierung humaner und muriner Zellen und Zelllinien wurde RPMI1640-Medium verwendet, das hierfür mit 10% FCS sowie 2 mM L-Glutamin und 20 mM HEPES (4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonat) angereichert wurde und weiter als RPMI/10%FCS bezeichnet wird. Die Kultur der Zellen erfolgte bei 37°C im Brutschrank mit einem CO<sub>2</sub>-Gehalt von 5%.

### **2.2.3.2 Auftauen und Einfrieren eukaryontischer Zellen**

Zur langfristigen Lagerung können von den Zellen Dauerkulturen angelegt werden, die in flüssigem Stickstoff bei  $-196^{\circ}\text{C}$  tiefgefroren und bei Bedarf wieder aufgetaut und kultiviert werden können. Hierfür wurden mindestens  $5 \times 10^6$  Zellen auf Eis in 1 ml DMSO-haltigem Einfriermedium resuspendiert, in Kryotubes überführt und zunächst für vierundzwanzig Stunden bei  $-70^{\circ}\text{C}$  vorgefroren. Hiernach wurden die Zellen zur Dauerlagerung in flüssigen Stickstoff überführt. Das stark hygroskopische DMSO (Dimethylsulfoxid) dient dabei dem langsamen Wasserentzug der Zellen. Auf diese Weise kann die Bildung von Eiskristallen in den Zellen und damit das Aufbrechen der Zellmembran verhindert werden. Da DMSO aber auch toxisch wirkt, muss es vor Inkulturnahme kryokonservierter Zellen wieder entfernt werden. Hierfür müssen die aufgetauten Zellen mehrfach mit Kulturmedium gewaschen werden.

### **2.2.3.3 Zellzählung durch den Trypanblau-Ausschlusstest**

Zur Zellzählung wurde ein Aliquot der entsprechenden Zellsuspension in einem Verhältnis von 1:1 mit Trypanblau versetzt und die Zellkonzentration in einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Der Farbstoff Trypanblau dringt in vitale Zellen nicht ein. Sie erscheinen deshalb unter dem Mikroskop hell und lassen sich von den tiefblau gefärbten toten Zellen beziehungsweise Zelltrümmern unterscheiden.

### **2.2.3.4 Kultur und Expansion eukaryontischer Zelllinien**

Die Kultur von Suspensionszellen (RMA, X63, EL-4,  $58\alpha\beta$ ) erfolgte unter oben genannten Bedingungen in Kulturflaschen (10 ml). Zur Expansion der Zellen wurden 30 ml-Kulturflaschen verwendet. Die Zellen wurden nach Erreichen einer Zelldichte von  $1 \times 10^6/\text{ml}$  im Verhältnis 1:3 in neuen Kulturflaschen verdünnt. Als „zelluläre Stocklösungen“ wurden daneben Verdünnungsreihen in 24 Loch-Flachbodenplatten kultiviert, aus denen größere Kulturen angeimpft wurden. Adhärent wachsende Zellen (RT23HD6, B16, COS1) wurden in 6-Loch-Kulturplatten in 5 ml Medium pro Vertiefung kultiviert, gegebenenfalls mit einer Glaspipette abgespült und in 30 ml- bzw. 50 ml-Kulturflaschen expandiert.

### **2.2.3.5 Transfektion eukaryontischer Zellen und Zelllinien**

Bei allen Transfektionsexperimenten wurden ausschließlich vitale Zellen verwendet, die sich zum Zeitpunkt der Transfektion in der logarithmischen Wachstumsphase befanden. Für die Transfektion wurden dabei in der Regel Plasmid-Maxipräparationen eingesetzt, die einen sehr geringen Gehalt an Lipopolysacchariden (LPS) aufweisen, da LPS für viele Säugerzellen nicht nur toxisch wirkt, sondern auch zu einer geringeren Expression der transfizierten Gene führen kann. Für die stabile Transfektion wurde die Plasmid-DNA zuvor mit einem geeigneten Restriktionsenzym (pFM92 und pDisplay: *Sca* I) linearisiert, um eine Integration der DNA in das Wirtsgenom zu erleichtern und zu verhindern, dass innerhalb der Zelle eine Linearisierung der DNA im kodierenden Bereich erfolgt. Für transiente Transfektionen wurden die Vektoren nicht linearisiert.

#### **2.2.3.5.1 Elektroporation muriner Zelllinien**

Bei der Elektroporation werden die Zellen in Suspension transfiziert. Sie werden dabei in DNA-haltiger Lösung einem kurzen Stromstoß ausgesetzt, der in der Zytoplasmamembran temporäre Poren erzeugt (Neumann, 1982; Potter, 1988). Durch diese Poren kann Plasmid-DNA sowohl passiv durch Diffusion als auch elektrophoretisch in die Zelle gelangen (Sukharev, 1994). Für die Transfektion der Linien RMA, EL-4,  $58\alpha\beta^-$  und X63 wurden  $5 \times 10^6$  beziehungsweise, bei Transfektionen, bei denen später eine Selektion stabil transfizierter Zellen erfolgen sollte,  $1 \times 10^7$  Zellen eingesetzt. Die Zellen wurden zweimal in 5 ml RPMI ohne FCS gewaschen, in 350  $\mu$ l FCS-freiem RPMI mit 10  $\mu$ g Plasmid-DNA resuspendiert und in eine Elektroporationskuvette überführt. Die Zellen wurden zehn Minuten in diesem DNA-haltigen Medium präinkubiert und darauf elektroporiert (250 V, 960  $\mu$ F; Gene Pulser, BioRad). Unmittelbar nach der Elektroporation wurden 450  $\mu$ l RPMI/10%FCS zugesetzt, die Zellen zehn Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und darauf in zwei beziehungsweise für die Selektion stabil transfizierter Zellen in vier 24-Loch-Zellkulturplatten ausplattiert.

#### **2.2.3.5.2 DEAE-Dextran-Transfektion**

Die DEAE-Dextran-Transfektion ist eine Methode zur Transfektion adhärent wachsender Zellen. Dabei wird die DNA durch DEAE-Dextran präzipitiert, das Präzipitat sinkt auf die Zelloberfläche der Zellen ab und wird durch Phagozytose in die



Zelle aufgenommen. Dabei kann die Aufnahme des DNA-Präzipitats durch Behandlung der Zellen mit DMSO erhöht werden (Lopata, 1984; Takai und Ohmori, 1990). COS1-Zellen wurden für diese Transfektion in mittleren Kulturflaschen bis zu einer Konfluenz von etwa 80% herangezogen, einmal mit PBS gewaschen und vier Stunden in 5 ml RPMI/10%FCS mit 200 µl Chloroquinphosphat (25×), 200 µl DEAE-Dextran (25×) und 5 µg Plasmid-DNA (pcDNA1.1-Hsp60-Ig bzw. pcDNA1.1-hCD83-Ig) inkubiert. Anschließend wurde das DNA-haltige Medium entnommen und die Zellen zwei Minuten mit 5 ml PBS/10% DMSO behandelt. Die DMSO-Lösung wurde darauf abgesaugt und die Zellen über Nacht in 10 ml RPMI/10%FCS inkubiert. Am folgenden Tag wurden die Zellen einmal in PBS gewaschen, 20 ml frisches Medium zugesetzt und sieben Tage weiterinkubiert.

#### **2.2.3.5.3 Transfektion mit komplexen Transfektionsreagenzien**

Komplexe Transfektionsreagenzien bestehen aus einer Mischung verschiedener transfektionsfördernder Stoffe und Verbindungen wie z. B. Histone oder histonähnliche Proteine, cyclische amphiphile Polyamine, kationische, anionische oder neutrale Lipide sowie pH-sensitive Liposomen. Sie zeichnen sich gegenüber der einfachen Lipofektion durch eine meist höhere Transfektionseffizienz bei niedrigerer Toxizität aus. Für die Transfektion adhärenter Zelllinien (RT23HD6, B16, COS1) wurde das Fugene 6-Reagenz (Roche Diagnostics) verwendet. Die Zellen wurden hierfür in 6-Loch-Kulturplatten bis zu einer Konfluenz von 60-80% herangezogen. Für den Transfektionsmix wurden 5 µg Plasmid-DNA in 100 µl RPMI ohne FCS mit 6 µl Fugene 6-Reagenz gemischt und dreißig Minuten bei Raumtemperatur komplexiert. Das Kulturmedium der Zellen wurde durch 2 ml frisches RPMI/10% FCS ersetzt, der Transfektionsmix zugetropft und die Zellen 24-48 h weiterinkubiert.

#### **2.2.3.5.4 Selektion stabil transfizierter Zellen**

Die hier verwendeten Expressionsvektoren pDisplay und pFM92 vermitteln eine Neomycin-Resistenz, so dass die Selektion stabil transfizierter Zellklone durch Zugabe von Neomycin beziehungsweise G418 erfolgen kann. G418 wurde achtundvierzig Stunden nach der Transfektion dem Kulturmedium in einer Konzentration von 1 mg/ml zugesetzt. Nach erfolgreicher Selektion wurden stabile Transfektanden kontinuierlich in Kulturmedium mit 0.5 mg/ml G418 weiterkultiviert.

### **2.2.3.5.5 Subklonierung stabil transfizierter Zellen**

Bei der Selektion transfizierter Zellen werden häufig keine monoklonalen Zellpopulationen erhalten, sondern ein Gemisch von Zellen, unter denen sich auch solche befinden, die das gewünschte Gen nicht exprimieren. Um zu verhindern, dass diese Hsp60-negativen G418-resistenten Zellen die Hsp60-positiven Zellen überwachsen, wurden durch limitierende Verdünnung monoklonale Zellpopulationen generiert. Hierfür wurden die Zellen in Medium mit 0.5 mg/ml G418 in drei 96-Loch-Kulturplatten ausgesät. Dabei wurde die Zellzahl so eingestellt, dass theoretisch 3, 1 beziehungsweise 0.1 Zellen pro Vertiefung ausplattiert wurden. Um das Anwachsen zu erleichtern, wurden pro Vertiefung zudem  $5 \times 10^4$  bestrahlte Milzzellen als „feeder“-Zellen zugegeben.

### **2.2.3.6 Präparation muriner Milzzellen**

Die Milz von sechs bis acht Wochen alten Mäusen wurde steril präpariert, in einer Petrischale mit 10 ml Vollmedium mit dem Stempel einer 6 ml-Spritze zerrieben und die Zellsuspension abzentrifugiert (1200 rpm, 5 Min, 4°C; Megafuge 1.0R). Erythrozyten wurden anschließend durch Inkubation in 5 ml Erythrozytenlysepuffer über fünf Minuten bei Raumtemperatur eliminiert, die Zellen anschließend zweimal in RPMI/10%FCS gewaschen, über ein Zellsieb (Cell strainer; Falcon/Becton Dickinson) gegeben und in RPMI/10%FCS aufgenommen. Auf diese Weise wurde eine Einzelzellsuspension erhalten.

### **2.2.3.7 Anreicherung von T-Zellen aus Milzzellpräparationen**

Die Isolation von T-Zellen erfolgte mit Hilfe des Pan T cell isolation-Kits (Miltenyi) beziehungsweise durch Eliminierung MHC II-positiver Zellen mit Hilfe magnetischer Beads (MHC II depletion kit; Miltenyi). Bei dieser Methode werden alle nicht-T-Zellen (Pan T cell kit), d. h.  $CD11b^+$ -Makrophagen,  $CD11c^+$ -DC,  $B220^+$ -B-Zellen und  $DX5^+$ -NK-Zellen, beziehungsweise MHC II-exprimierenden Zellen (MHC II-Depletion) durch spezifische Biotin-gekoppelte Antikörper markiert und durch die Bindung an magnetische Beads, die mit gegen Biotin gerichteten Antikörpern gekoppelt sind, eliminiert. Hierfür wurden Milzzellsuspensionen nach Erythrozytenlyse durch ein Zellsieb (Cell strainer; Falcon/Becton Dickinson) gegeben und die Zellen pelletiert (1200 rpm, 5 Min, 4°C; Megafuge 1.0R). Alle folgenden Arbeitsschritte wurden mit

vorgekühlten Reagenzien auf Eis ausgeführt. Das Zellpellet einer Milz (ca.  $1 \times 10^8$  Zellen) wurde in 400  $\mu$ l MACS-Puffer mit 100  $\mu$ l Biotin-Antikörper Cocktail resuspendiert und fünfzehn Minuten inkubiert. Anschließend wurden weitere 300  $\mu$ l MACS-Puffer sowie 200  $\mu$ l Anti-Biotin Micro Beads zugesetzt und weitere fünfzehn Minuten inkubiert. Die Zellen wurden darauf in 15 ml MACS-Puffer gewaschen, schließlich in 1 ml MACS-Puffer auf eine kalte, in 3 ml MACS-Puffer äquilibrierte, an einen Magneten gekoppelte LS-Säule geladen und der Durchlauf, der die T-Zellen enthält, aufgefangen. Die Säule wurde noch viermal mit 3 ml MACS-Puffer gespült und auch diese Zellen aufgefangen. Abschließend wurden die gewonnenen Zellen pelletiert, in RPMI/10%FCS gewaschen und aufgenommen. Auf diese Weise werden aus  $1 \times 10^8$  Gesamtmilzzellen etwa  $2.5 \times 10^7$  T-Zellen erhalten. Die Reinheit der T-Zellen wurde durch spezifische FACS-Färbungen bestimmt und betrug bei beiden Depletionsverfahren zwischen 65 und 85%.

#### **2.2.3.8 Isolierung muriner peritonealer Exudatzellen (PEC)**

Für die Präparation peritonealer Exudatzellen (PEC) wurden sechs bis acht Wochen alte Mäuse verwendet. Sieben bis zehn Tage vor Entnahme der Zellen wurde den Tieren 500  $\mu$ l Thioglycolat in das Peritoneum injiziert. Dies führt zu einer gesteigerten Invasion von Makrophagen in den Bauchraum insbesondere in die Nähe des Gastrointestinaltraktes und damit zu einer etwa zehnfach erhöhten Zellausbeute. Etwa 90% der PEC sind CD11b<sup>+</sup>-Makrophagen. Für die Zellpräparation wurden zunächst 3 ml eiskaltes RPMI/10%FCS in das Peritoneum des getöteten Tieres injiziert und der Bauch zwei bis drei Minuten geknetet, um die Makrophagen zu mobilisieren. Anschließend wurde das Peritoneum wiederholt mit 6 ml RPMI/10%FCS gespült, die dabei gewonnenen Zellen pelletiert (1200 rpm, 5 Min; Megafuge 2.0R) und in RPMI/10%FCS aufgenommen. Gegebenenfalls wurde zuvor eine Erythrozytenlyse (siehe 2.2.3.6) durchgeführt.

#### **2.2.3.9 Färbung von Zelloberflächenmolekülen für durchflusszytometrische Analysen**

Durchflusszytometer sind optoelektronische Messsysteme, die optische Signale unterschiedlicher Qualität (Lichtstreuung und Fluoreszenzsignale) detektieren. Im Durchflusszytometer wird die zu analysierende Zellsuspension in Einzelsuspension gebracht und die vereinzelt Zellen in Tröpfchenform an einem Laserstrahl

vorbeigeleitet. Photomultiplikatoren messen dabei die Streuung des Laserlichts. Die Vorwärts-Lichtstreuung korreliert mit der Größe der Zellen, die seitliche Lichtstreuung mit der Granularität beziehungsweise dem Plasma/Kern-Verhältnis der Zellen. So lassen sich große Zellen mit großer Plasma/Kern-Relation und granuliertem Zytoplasma von kleinen (toten) Zellen mit hohem Kernanteil abgrenzen. Mit Hilfe der Durchflusszytometrie können zudem unterschiedliche Zellpopulationen anhand ihres Repertoires an Oberflächenmarkern voneinander abgegrenzt und mit einem Fluoreszenz-aktivierten Zell-Sortierer (FACS) auch isoliert werden. Voraussetzung für eine derartige Analyse ist die spezifische Kopplung der Zellen mit Fluoreszenzfarbstoffen, die mit der im Durchflusszytometer vorhandenen Lichtquelle anregbar sind, und deren Fluoreszenzemission im Gerät detektiert werden kann. Bei der Immunophänotypisierung geschieht dies durch den Einsatz spezifischer Antikörper, die gegen verschiedene Oberflächenproteine der unterschiedlichen Zellpopulationen gerichtet und mit einem Fluoreszenzfarbstoff konjugiert sind. Die für diese Anwendung gebräuchlichsten Fluorochrome sind Phycoerythrin (PE) und Fluorescein-5-isothiocyanat (FITC). Für die Färbung erfolgen alle Arbeitsschritte bei 4°C (Zentrifugation) beziehungsweise auf Eis, um die Internalisierung von Oberflächenmolekülen zu inhibieren. Pro Färbung wurden  $1 \times 10^5$ - $10^6$  Zellen pelletiert (1200 rpm, 5 Min, 4°C; Megafuge 1.0R) und die Fc-Rezeptoren der Zellen mit 25 µl Cohn II (humane IgG-Fraktion) fünfzehn Minuten blockiert. Für den Nachweis des auf der Zelloberfläche exprimierten rekombinanten Hsp60-Proteins wurden die monoklonalen Antikörper Maus anti-Maus Hsp60 (SPA806; Stressgen), Maus anti-HA (12CA5; Roche) und Maus anti-*myc* (9E10; Upstate Biotechnology) verwendet. Die Zellen wurden in 50 µl Medium mit 0.5 µg dieser Antikörper zwanzig Minuten auf Eis inkubiert. Nach zweimaligem Waschen in FACS-Puffer wurden die Zellen zwanzig Minuten mit einer 1:50-Verdünnung Ziege anti-Maus IgG/IgM-FITC (Dianova) in Medium inkubiert, abschließend dreimal in FACS-Puffer gewaschen, in 300 µl PBS/1%PFA fixiert und im Durchflusszytometer gemessen. Für den Nachweis von Markerproteinen und kostimulatorischen B7-Molekülen auf der Zelloberfläche von Immunzellen wurden diese nach Blockade der Fc-Rezeptoren mit Cohn II in 100 µl Medium mit direkt markierten Antikörpern (anti-Maus pan NK-Zellen (DX5)-FITC (PharMingen), Ratte anti-Maus CD4-PE, Ratte anti-Maus CD8-FITC, Ratte anti-Maus CD80-PE, Ratte anti-Maus CD86-FITC (CALTAG)) inkubiert. Alle Antikörper wurden dabei in einer 1:200-Verdünnung eingesetzt. Nach dem Waschen in FACS-Puffer

wurden die Zellen ebenfalls in 300  $\mu$ l PBS/1%PFA aufgenommen und im Durchflusszytometer gemessen. Die Auswertung der Messdaten erfolgte mit Hilfe des Programms Cell Quest.

#### **2.2.3.10 Färbung intrazellulärer Moleküle für die durchflusszytometrische Analyse**

Für die Färbung intrazellulärer Moleküle müssen die Zellen zunächst permeabilisiert und fixiert werden. Dabei erfolgen ebenfalls alle Arbeitsschritte auf Eis. Die Zellen wurden zunächst zehn Minuten in 100  $\mu$ l Cytotfix/Cytoperm-Lösung inkubiert, zweimal in 1 ml Perm/Wash-Lösung gewaschen und weitere fünfzehn Minuten in 100  $\mu$ l Perm/Wash-Lösung permeabilisiert. Fc-Rezeptoren wurden anschließend mit 30  $\mu$ l Mausserum in 70  $\mu$ l Perm/Wash-Lösung blockiert und Hsp60-Ig- und hCD83-Ig-Fusionsproteine darauf mit direkt markiertem Esel anti-human IgG-PE-Antikörper (Dianova) intrazellulär detektiert. Endogenes und rekombinantes Hsp60 wurde außerdem mit Maus anti-Maus Hsp60 (SPA806; Stressgen) und Ziege anti-Maus IgG/IgM-FITC (Dianova) nachgewiesen. Die Färbungen wurden wie unter 2.2.3.10 beschrieben durchgeführt, die Antikörper hierbei jedoch 1:50 in Perm/Wash-Lösung verdünnt eingesetzt. Die Auswertung der Messdaten erfolgte mit Hilfe des Programms Cell Quest.

#### **2.2.3.11 Durchflusszytometrischer Nachweis der Bindung von rekombinantem humanen Hsp60 und Hsp60-Ig-Fusionsprotein an PEC**

Um die Bindung von Hsp60 an PEC zu untersuchen, wurden  $1 \times 10^6$  Zellen eingesetzt und zunächst die Fc-Rezeptoren der Zellen durch fünfzehnminütige Inkubation in 50  $\mu$ l Mausserum auf Eis blockiert. Alle weiteren Arbeitsschritte erfolgen ebenfalls auf Eis. Die Zellen wurden anschließend mit FITC-markiertem humanen Hsp60-Protein (5  $\mu$ g/ml) inkubiert. Für die Blockade der Bindung wurden die Zellen zuvor dreißig Minuten mit unmarkiertem humanen Hsp60-Protein (150  $\mu$ g/ml; Loke Diagnostics ApS) inkubiert. Die Zellen wurden abschließend gewaschen, in 300  $\mu$ l PBS/1% PFA aufgenommen und im Durchflusszytometer gemessen.

Für die Bindung von Ig-Fusionsproteinen wurden die Fc-Rezeptoren der PEC ebenfalls in Mausserum geblockt, und die Zellen anschließend dreißig Minuten auf Eis mit gereinigtem Hsp60-Ig- (12  $\mu$ g/ml) oder hCD83-Ig-Fusionsprotein (12  $\mu$ g/ml) inkubiert. Die Bindung der Ig-Fusionsproteine wurde darauf durch Färbung der Zellen mit Esel

anti-human IgG-PE-Antikörper (Dianova), 1:50 in Medium verdünnt, im Durchflusszytometer nachgewiesen. Die Auswertung der Messdaten erfolgte mit Hilfe des Programms Cell Quest.

### **2.2.3.12 Zytospin-Färbungen**

Für den Zytospin wurden transfizierte COS1- oder X63-Zellen zunächst analog der Färbung für die durchflusszytometrische Analyse spezifisch mit Antikörpern gegen das Hsp60-Protein (Maus anti-Hsp60, SPA806; Stressgen) oder gegen die eingeführten Epitope HA (Maus anti-HA, 12CA5) und *myc* (Maus anti-*myc*, 9E10) gefärbt (siehe 2.2.3.9).  $1 \times 10^4$ - $1 \times 10^5$  Zellen in 50-100  $\mu$ l wurden anschließend auf Objektträger zentrifugiert (600 rpm, 10 Min; Zytospin-Zentrifuge) und diese über Nacht getrocknet. Die Zellen wurden darauf fünf Minuten in Aceton fixiert, das Aceton eine Stunde bei Raumtemperatur abgedampft, die Zellen mit einem Wachsstift umkreist und mit dem DNA-Farbstoff DAPI (1:800 in PBS) gegengefärbt. Die Objektträger wurden abschließend dreimal in PBS gewaschen, die Zellen mit Anti-Fade-Lösung betropft und mit Deckgläschen abgedeckt.

## **2.2.4 *In vitro*-Stimulationsexperimente**

### **2.2.4.1 *in vitro*-Testsysteme zur Stimulation von Makrophagen und naiven T-Zellen**

Für die Analyse der Wirkung von Hsp60 auf Makrophagen wurden Zellen der Makrophagenlinie RAW264.7 sowie peritoneale Exudatzellen (PEC) aus Balb/c-Mäusen eingesetzt.  $1 \times 10^5$  RAW264.7-Makrophagen oder PEC wurden zusammen  $2 \times 10^4$  Hsp60-exprimierenden oder Hsp60-negativen Zelllinien vierundzwanzig Stunden koinkubiert und hierauf die Zytokinexpression im Kulturmedium mit Hilfe des ELISA quantifiziert oder durch spezifischen Nachweis der mRNA-Expression mit Hilfe der PCR analysiert. Hierfür wurde nach Koinkubation von PEC mit Hsp60-positiven oder -negativen Zellen RNA präpariert, die mRNA revers transkribiert und die cDNAs spezifisch amplifiziert (siehe 2.2.1.1 -2.2.1.3).

Bei der Stimulation naiver T-Zellen wurden Balb/c-PEC als APZ verwendet. Sie präsentieren korrespondierenden TCR-transgenen T-Zellen aus DO11.10-Mäusen das OVA-Peptid OVA<sub>323-339</sub> im Komplex mit MHC II-Molekülen des Haplotyps I-A<sup>d</sup> und stimulieren so eine antigenabhängige T-Zellantwort. Sofern nicht anders angegeben,

wurden  $1 \times 10^5$  MACS-gereinigte T-Zellen aus DO11.10-Mäusen in Gegenwart von  $5 \times 10^4$  Balb/c-PEC und titrierten Mengen ( $5 \times 10^4 \rightarrow 0$ ) verschiedener Hsp60-exprimierender oder Hsp60-negativer Zelllinien mit OVA-Peptid (1  $\mu\text{g/ml}$  bzw. 0.1  $\mu\text{g/ml}$ ) antigenabhängig stimuliert. Alternativ wurden die T-Zellen auch durch Einsatz von anti-CD3-Antikörper (1452C11; BNI) in einer Konzentration von 0.3  $\mu\text{g/ml}$  bzw. 0.1  $\mu\text{g/ml}$  aktiviert.

Für die Untersuchung der Funktion verschiedener Zytokine wurden daneben PEC aus Balb/c-IL-12p40-Knockout-Mäusen (Magrath et al., 1996) verwendet, oder die Zytokinfunktionen durch neutralisierende Antikörper im Testsystem inhibiert (anti-IL-12p40/p70, 2  $\mu\text{g/ml}$ , anti-IL-6, 2  $\mu\text{g/ml}$ , anti-TNF $\alpha$ , 2  $\mu\text{g/ml}$  (Becton Dickinson); anti-IFN $\alpha$ , 10  $\mu\text{g/ml}$ , anti-IFN $\beta$ , 3.38 U/ml (R&D Systems)).

Um die Funktion des TLR4-Rezeptors und des MyD88-Signalweges bei der Hsp60-vermittelten Kostimulation zu untersuchen, wurden PEC- und T-Zellen aus C3HHeN-Wildtyp- und C3HHeJ-Mäusen, die keinen funktionellen TLR4-Rezeptor exprimieren, oder Milzzellen aus diesen Tieren sowie C3HHeN-MyD88-Knockout-Mäusen (MyD88<sup>-/-</sup>) verwendet. Sie wurden wie oben beschrieben in Gegenwart von Hsp60-exprimierenden und Hsp60-negativen Zelllinien mit anti-CD3-Antikörper stimuliert. Die stets mitgeführten Kontrollstimulationen enthielten statt Hsp60-positiver oder -negativer Zelllinien 1  $\mu\text{g/ml}$  LPS.

Alle *in vitro*-Stimulationsexperimente wurden in Zellkulturplatten mit 96 Vertiefungen in einem Volumen von insgesamt 200  $\mu\text{l}$  RPMI/10%FCS durchgeführt. Nach vierundzwanzig und achtundvierzig Stunden Kultur bei 37°C wurden die Kulturüberstände entnommen und die sezernierten Zytokine mit Hilfe spezifischer ELISA quantifiziert.

#### 2.2.4.2 ELISPOT-Test

Beim ELISPOT-Test werden Zellen in speziellen Antikörper-beschichteten Kulturplatten kultiviert und stimuliert. Von den Zellen produzierte Zytokine werden durch den in der Platte fixierten Antikörper gebunden. Freie Zytokine und Zellen werden anschließend durch Waschen der Platte eliminiert und gebundene Zytokine mit einem spezifischen Enzym-konjugierten Sekundärantikörper oder als „Sandwich“-ELISPOT mit Biotin-konjugiertem Sekundärantikörper und Enzym-konjugiertem Streptavidin analog dem ELISA detektiert. Da die Konzentration des gebundenen

Zytokins in unmittelbarer Nähe ihrer zellulären Produzenten am höchsten ist, werden auf diese Weise einzelne aktivierte Zytokin-exprimierende Zellen bzw. Zellklone als runde Flecken, sogenannte „spots“, sichtbar und können ausgezählt werden.

Für den IFN $\gamma$ -spezifischen ELISPOT-Test wurden die ELISPOT-Kulturplatten zunächst mit 200  $\mu$ l PBS gespült und anschließend mit 100  $\mu$ l anti-IFN $\gamma$  (Becton Dickinson) in ELISA-Coating-Puffer (5  $\mu$ g/ml) über Nacht bei 4°C beschichtet. Die Platten wurden anschließend mit 200  $\mu$ l PBS / 1% BSA zwei Stunden bei Raumtemperatur geblockt und zweimal mit 200  $\mu$ l PBS gewaschen. Darauf wurden  $1 \times 10^6$  Milzzellen immunisierter Mäuse (siehe 2.2.5.1) mit  $2 \times 10^4$  bestrahlten X63-Zellen vierundzwanzig Stunden erschütterungsfrei bei 37°C in den beschichteten ELISPOT-Platten inkubiert. Alle weiteren Schritte können unsteril erfolgen. Die Platten wurden dreimal mit 200  $\mu$ l PBS gewaschen und darauf 100  $\mu$ l Biotin-gekoppelter anti-IFN $\gamma$ -Antikörper (Becton Dickinson) 1  $\mu$ g/ml in PBS/0.1% BSA für zwei Stunden bei 37°C zugesetzt. Die Platten wurden erneut dreimal mit 200  $\mu$ l PBS gewaschen und 100  $\mu$ l Streptavidin-HRP (Becton Dickinson) 1:200 in PBS/0.1% BSA für eine Stunde bei 37°C zugegeben. Die Platten wurden abschließend dreimal mit 200  $\mu$ l PBS gewaschen und 100  $\mu$ l ELISPOT-Substratlösung zugesetzt. Diese enthält neben H $_2$ O $_2$  und NiCl das Substrat Diaminobenzidin (DAB). Das rötlich-braune Produkt dieses Substrates geht nach der enzymatischen Umsetzung nicht in Lösung, sondern bleibt im reaktiven Zentrum der Peroxidase gebunden. Nach Erreichen einer sichtbaren Färbung wurden die Platten gründlich in H $_2$ O gespült. Hierdurch wird auch die enzymatische Reaktion gestoppt. Die Platten wurden abschließend getrocknet und die Spots im ELISPOT-Reader (Lambda E, Biosys GmbH) ausgezählt.

## 2.2.5 Tierversuche

Die in dieser Arbeit durchgeführten Tierversuche wurden nach §8 des Tierschutzgesetzes genehmigt (Tierversuchsnummer 77/04).

### 2.2.5.1 Immunisierung von Mäusen mit bestrahlten Tumorzellen

Zur Immunisierung von Balb/c-Mäusen mit Hsp60-positiven und Hsp60-negativen X63-Tumorzellen wurden  $2 \times 10^7$  Zellen in 400  $\mu$ l PBS in das Peritoneum der Tiere injiziert. Die Zellen wurden zuvor bestrahlt (4500 Rad), zweimal in 15 ml FCS-freiem RPMI-Medium und dreimal in 15 ml PBS gewaschen, um eine FCS-freie



Zellsuspension zu erhalten. Kontrolltiere wurden entsprechend intraperitoneal mit PBS allein immunisiert. Die Immunisierung wurde nach sieben Tagen wiederholt. Eine Woche nach der zweiten Immunisierung wurden die Milzzellen der Tiere präpariert und *in vitro* in Gegenwart bestrahlter (4500 Rad) parentaler X63-Tumorzellen oder Balb/c-Milzzellen inkubiert. Die Anzahl IFN $\gamma$ -produzierender Zellen wurde im ELISPOT-Test (siehe 2.2.4.2) ermittelt. Hierfür wurden  $1 \times 10^6$  Milzzellen der immunisierten Tiere mit  $2 \times 10^4$  bestrahlten X63-Zellen beziehungsweise  $1 \times 10^5$  bestrahlten Balb/c-Milzzellen vierundzwanzig Stunden inkubiert. Außerdem wurden die Zytokine IFN $\gamma$  und IL-2 im Kulturüberstand mit Hilfe des ELISA (siehe 2.2.2.5) quantifiziert. Für diese Untersuchungen wurden  $2 \times 10^5$  Milzzellen immunisierter Tiere mit  $2 \times 10^4$  bestrahlten X63-Zellen beziehungsweise  $1 \times 10^5$  bestrahlten Balb/c-Milzzellen achtundvierzig Stunden kokultiviert.

#### **2.2.5.2 Wachstum Hsp60-positiver und -negativer X63-Tumoren *in vivo***

Für die Beobachtung des Wachstums Hsp60-positiver und -negativer X63-Tumorzellen *in vivo* wurden  $1 \times 10^4$  beziehungsweise  $1 \times 10^5$  Tumorzellen in 100  $\mu$ l PBS in die Schwanzvene von Balb/c-Mäusen injiziert. Die Zellen wurden dafür wie unter 2.2.5.1 beschrieben zuvor gründlich in FCS-freiem Medium und PBS gewaschen. Für die Beurteilung des Gesundheitszustandes der Tiere, der täglich begutachtet wurde, wurden die drei folgenden Kriterien definiert: 1. abnorm dicker Bauch, 2. struppiges glanzloses Fell, 3. erhebliche Einschränkungen der Bewegungsfähigkeit/Lähmungserscheinungen. Sobald die Tiere diese drei Kriterien erfüllten, wurden sie getötet und geöffnet. Tumorgewebe wurde aus den Mäusen präpariert und die Tumorzellen für die spätere durchflusszytometrische Analyse hinsichtlich der Hsp60-Expression *in vitro* in G418-haltigem Medium rekultiviert.

## **3 Ergebnisse**

### **3.1 Überblick**

Mit den im Ergebnisteil beschriebenen Experimenten wurde das immunstimulatorische Potential des 60 kDa-Hitzeschockproteins Hsp60 untersucht. Dabei wurde die potentielle Funktion dieses Proteins als endogenes Gefahrensignal sowie dieser Aktivität zugrundeliegende Mechanismen in *in vitro*-Testsystemen analysiert. Schließlich wurde ebenfalls überprüft, ob Hsp60 auch *in vivo* eine Immunantwort induzieren kann und eine adjuvante Wirkung bei der Tumorummunität besitzt.

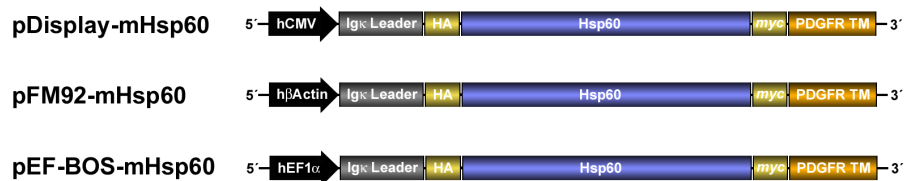
Der Ergebnisteil dieser Arbeit ist in vier Abschnitte gegliedert. Teil I beschreibt die Konstruktion verschiedener eukaryontischer Expressionsvektoren sowie die Expression des Hsp60-Proteins als sezerniertes Immunglobulin-Fusionsmolekül und als membranverankertes Protein auf der Oberfläche verschiedener Zelllinien. Abschnitt zwei und drei befassen sich mit der Analyse der immunstimulatorischen Kapazität des eukaryontisch exprimierten Hsp60-Proteins und der dieser Aktivität zugrundeliegenden Mechanismen in *in vitro*-Testsystemen. Im vierten Abschnitt schließlich wird die adjuvante Wirkung von auf der Oberfläche muriner Tumorzellen exprimiertem Hsp60 *in vivo* beschrieben.

### **3.2 Teil I: Vektorkonstruktion und Expression von murinem Hsp60 in eukaryontischen Zellen**

#### **3.2.1 Konstruktion eukaryontischer Hsp60-Expressionsvektoren**

Um das Hsp60-Protein in eukaryontischen Zelllinien zu exprimieren, wurden verschiedene Expressionsvektoren hergestellt, die die Expression als membrangebundenes Molekül (mHsp60) oder als sekretiertes Ig-Fusionsmolekül (Hsp60-Ig) erlauben. Abbildung 3.1 gibt einen Überblick über die verschiedenen Expressionsvektoren, deren Konstruktion in den folgenden Abschnitten näher beschrieben wird.

**A) membranverankertes Hsp60**



**B) sezerniertes Hsp60-Ig-Fusionsprotein**



**Abb. 3.1 Übersicht über die hergestellten Expressionsvektoren**

**A)** Für die Expression des membranverankerten Hsp60-Proteins wurden drei verschiedene eukaryontische Expressionsvektoren verwendet, die sich hinsichtlich ihres Promotors unterscheiden. Der pDisplay-Vektor verfügt über den humanen CMV-Promotor (hCMV), der Vektor pFM92 über den humanen  $\beta$ -Actin- und der pEF-BOS-Vektor über den humanen Elongationsfaktor 1  $\alpha$ -Promotor (hEF1 $\alpha$ ). Alle drei Vektoren enthalten die murine cDNA, die für das reife Hsp60-Protein kodiert. Sie wird von zwei Modellepitopen, dem Hämagglutinin-Epitop (HA) und dem *myc*-Epitop, flankiert. Zudem erhält das kodierte Protein C-terminal die Transmembrandomäne des PDGF-Rezeptors (PDGFR TM) und eine N-terminale Signalsequenz (Ig $\kappa$  Leader), die das Protein in den sekretorischen Proteinsynthese- und -transportweg einschleust.

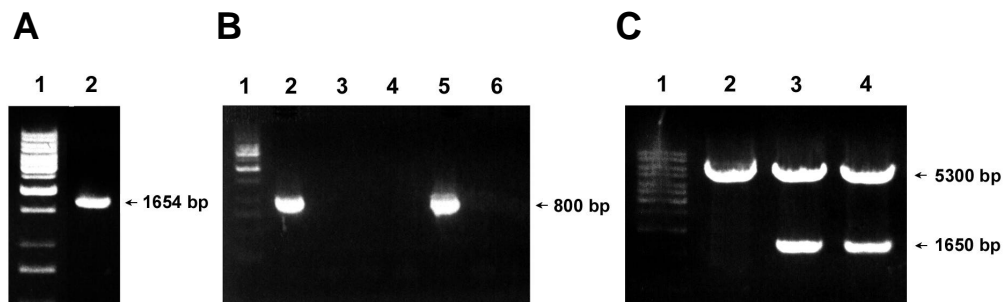
**B)** Für die Expression eines löslichen Hsp60-Ig-Fusionsmoleküls wurde der Vektor pcDNA1.1/Amp verwendet. In diesem Vektor wurde die Hsp60-cDNA mit der für die konstante Region des humanen IgG1 kodierenden genomischen DNA fusioniert (hIgG1 Fc Fragment). Das Fusionsmolekül enthält zudem ebenfalls ein N-terminales HA-Epitop sowie die Ig $\kappa$ -Signalsequenz. In diesem Vektor wird die Expression des Proteins durch den humanen CMV-Promotor (hCMV) kontrolliert.

**3.2.1.1 Konstruktion von Vektoren zur Expression von membranständigem Hsp60: pDisplay-mHsp60, pFM92-mHsp60 und pEF-BOS-mHsp60**

Als Basis für die Klonierung der murinen Hsp60-cDNA in eukaryontische Expressionsvektoren diente der Vektor pCR2.1/Hsp60-<sup>10</sup>, der im Rahmen meiner Diplomarbeit (Osterloh A., 2001) am Bernhard-Nocht-Institut für Tropenmedizin hergestellt wurde.

Die Hsp60-cDNA wurde zunächst in den Vektor pDisplay kloniert und hierfür mit den Primern *Bgl* II-sense und *Sal* I-antisense, die 5' der kodierenden Sequenz eine *Bgl* II-

Schnittstelle und 3' eine *Sal* I-Schnittstelle einführen, von dem Vektor pCR2.1/Hsp60-⑩ amplifiziert. Außerdem wurde hierbei das ATG-Start- und TAA-Stop-Codon der Hsp60-cDNA eliminiert. Das PCR-Amplifikat (1654 bp, Abb. 3.2-A) wurde mit *Bgl* II und *Sal* I verdaut, in den entsprechend geschnittenen Vektor pDisplay ligiert und in *E. coli* transformiert. Positive Kolonien weisen in der PCR-Analyse ein Fragment von etwa 800 bp auf (Abb. 3.2-B). Plasmidpräparationen positiver Bakterien wurden Kontrollverdau mit *Bgl* II und *Sal* I unterzogen, wobei das Hsp60-cDNA-Fragment von erwartungsgemäßer Größe (1650 bp) herausgeschnitten werden konnte (Abb. 3.2-C). Die erhaltenen Plasmide wurden anschließend sequenziert und schließlich der Vektor pDisplay-mHsp60-⑤ erhalten, der die korrekte Hsp60-cDNA-Sequenz enthielt.



**Abb. 3.2 Klonierung der Hsp60-cDNA in den Vektor pDisplay**

**A)** Die Hsp60-cDNA wurde mit den Primern *Bgl* II-sense und *Sal* I-antisense von dem Vektor pCR2.1/Hsp60-⑩ amplifiziert und dabei eine 5'-*Bgl* II und 3'-*Sal* I-Schnittstelle eingeführt sowie das ATG-Start- und TAA-Stop-Codon eliminiert. Das 1%ige TAE-Gel zeigt das PCR-Amplifikat (Spur 2), das eine Größe von 1654 bp besitzt. Spur 1: 1kb-DNA-Marker.

**B)** Positiv transformierte Bakterien wurden mit Hilfe der Primer pDisplay-Forward und Hsp60-mas durch PCR ermittelt. Das 1%ige TBE-Gel zeigt zwei positive Kolonien (Spuren 2 und 5), die durch ein PCR-Amplifikat von etwa 800 bp gekennzeichnet sind. Die Spuren 3, 4 und 6 repräsentieren negative Kolonien, die nicht über den pDisplay-mHsp60-Vektor verfügen. Spur 1: 1 kb-DNA-Marker

**C)** Plasmidpräparationen positiv getesteter Bakterienkolonien wurden einem Kontrollverdau mit den Enzymen *Bgl* II und *Sal* I unterzogen. Das 1%ige TBE-Gel zeigt die Auftrennung der Restriktionsprodukte von pDisplay-Vektor ohne Hsp60-Insert (Spur 2) und zwei pDisplay-mHsp60-Vektoren (Spuren 3 und 4). Der linearisierte Vektor besitzt eine Größe von 5300 bp. Aus den pDisplay-mHsp60-Präparationen kann das Hsp60-Fragment mit einer erwartungsgemäßen Größe von 1650 bp herausgeschnitten werden. Spur 1: 1 kb-DNA-Marker.

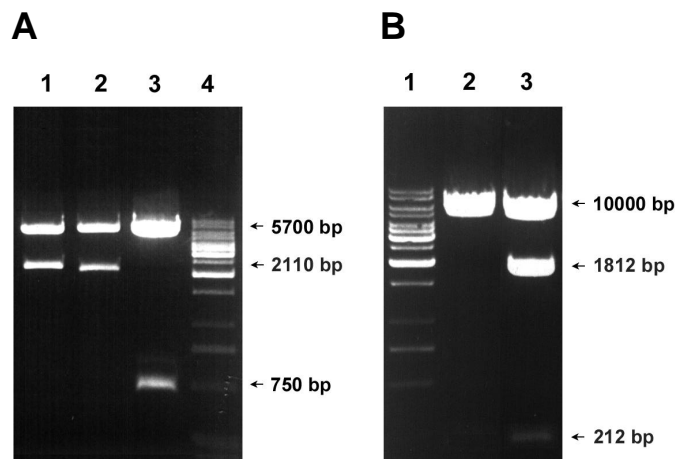
Um das Hsp60-Protein auch unter der Kontrolle anderer, möglicherweise besser geeigneter, Promotoren exprimieren zu können, wurden ausgehend von pDisplay-mHsp60-⑤ weitere Klonierungsschritte unternommen und so die Vektoren pFM92-mHsp60 ( $\beta$ -Actin-Promotor) und pEF-BOS-mHsp60 (EF1 $\alpha$ -Promotor) konstruiert.

Für die Klonierung in den pEF-BOS-Vektor wurde die Hsp60-cDNA inklusive der Ig $\kappa$ -Signalsequenz und der PDGFR-Transmembranregion sowie der beiden flankierenden Epitope HA und *myc* von dem Vektor pDisplay-mHsp60-⑤ mit den Primern pDisp-*Xba* I-sense und pDisp-*Xba* I-antisense amplifiziert, die sowohl 5' als auch 3' eine *Xba* I-Schnittstelle einführen. Das *Xba* I-verdaute PCR-Produkt wurde anschließend in den mit *Xba* I linearisierten pEF-BOS-Vektor ligiert.

Für die Konstruktion des pFM92-mHsp60-Vektors wurde das entsprechende Konstrukt mit den Primern pDisp-*Hind* III-sense und pDisp-*Xba* I-antisense von dem Vektor pDisplay-mHsp60-⑤ amplifiziert. Diese Primer führen 5' eine *Hind* III- und 3' eine *Xba* I-Schnittstelle ein. Das *Hind* III / *Xba* I-verdaute PCR-Produkt wurde anschließend in den ebenfalls mit diesen Enzymen geschnittenen Vektor ligiert.

Plasmidminipräparationen transformierter Bakterien, die in der PCR-Analyse positiv waren, wurden einem Kontrollverdau mit *Xba* I (pEF-BOS-mHsp60) beziehungsweise *Hind* III und *Xho* I (pFM92-mHsp60) unterzogen (Abb. 3.3). Der *Xba* I-Verdau der pEF-BOS-mHsp60-Vektoren weist ein Fragment von 2110 bp auf, welches die Hsp60-cDNA mit der Ig $\kappa$ -Signalsequenz und der PDGFR-Transmembranregion repräsentiert, sowie das Vektorrückgrat von 5700 bp. Der Verdau des leeren Vektors zeigt neben dem Vektorgerüst ein Fragment von etwa 750 bp, welches der Stufferregion entspricht (Abb. 3.3-A).

In dem Vektor pFM92-mHsp60 schneidet das Enzym *Hind* III 5' der Ig $\kappa$ -Signalsequenz und *Xho* I einmal im 5'-Bereich der Hsp60-cDNA und ein zweites Mal 3' der Transmembranregion innerhalb der Vektorsequenz. Der Verdau mit diesen Enzymen weist deshalb neben dem Vektorgerüst mit 10000 bp Fragmente von 1812 bp, entsprechend der Hsp60-cDNA mit dem PDGFR-Transmembranteil, und 212 bp auf, welches den Abschnitt repräsentiert, der die Ig $\kappa$ -Signalsequenz beinhaltet (Abb. 3.3-B). Die erhaltenen pEF-BOS- und pFM92-mHsp60-Vektoren wurden anschließend sequenziert und die Vektoren pEF-BOS-mHsp60-① und pFM92-mHsp60-③ erhalten.



**Abb. 3.3 Kontrollverdau der Vektoren pEF-BOS-mHsp60 und pFM92-mHsp60**

**A)** Das 1%ige TBE-Gel zeigt den Verdau von zwei pEF-BOS-mHsp60-Plasmidpräparationen (Spuren 1 und 2) sowie dem pEF-BOS-Vektor ohne Hsp60-Insert (Spur 3) mit dem Enzym *Xba* I. Das Vektorrückgrat besitzt eine Größe von 5700 bp. Der Verdau des pEF-BOS-Vektors mit *Xba* I weist zudem die etwa 750 bp-Stufferregion auf, während aus den pEF-BOS-mHsp60-Vektoren die Hsp60-cDNA mit der angrenzenden *Igk*-Signalsequenz und PDGFR-Transmembranregion herausgeschnitten wird. Sie besitzt eine Größe von 2110 bp. Spur 4: 1 kb-DNA-Marker

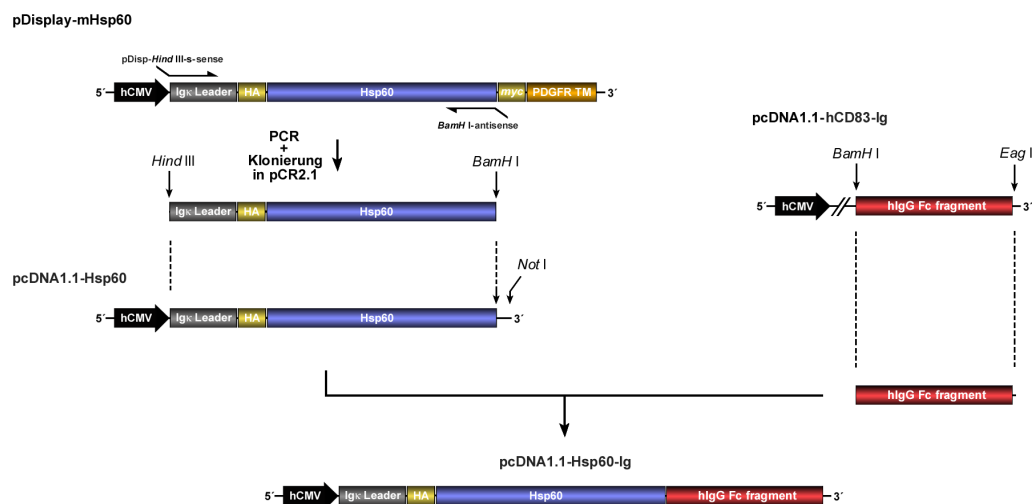
**B)** pFM92- und pFM92-mHsp60-Plasmidpräparationen wurden zur Kontrolle mit *Hind* III und *Xho* I verdaut. Das mit *Hind* III und *Xho* I linearisierte Vektorgerüst des pFM92-Vektors besitzt eine Größe von etwa 10000 bp (Spur 2). Der Verdau des pFM92-mHsp60-Vektors (Spur 3) mit diesen Enzymen weist darüber hinaus Fragmente von 1812 bp und 212 bp auf. Diese entsprechen der Hsp60-cDNA mit dem angrenzenden PDGFR-Transmembranbereich (1812 bp) und einem Fragment, das die *Igk*-Signalsequenz beinhaltet (212 bp). Spur 1: 1 kb-DNA-Marker

### 3.2.1.2 Konstruktion eines Expressionsvektors zur Produktion von Hsp60-Ig-Fusionsprotein: pcDNA1.1-Hsp60-Ig

Neben dem membranständig exprimierten Hsp60-Protein wurde auch ein Expressionsvektor zur Produktion eines sezernierten löslichen Hsp60-Proteins hergestellt. Um die Stabilität des exprimierten Proteins zu erhöhen, wurde das Hsp60-Molekül hierbei mit der konstanten Region (Fc) des humanen IgG1-Immunglobulins fusioniert.

Für die Klonierung des Fusionsmoleküls wurde die Hsp60-cDNA inklusive der *Igk*-Leadersequenz von dem Vektor pDisplay-mHsp60-<sup>5</sup> mit den Primern pDisp-*Hind* III-sense und pDisp-*BamH* I-antisense, die 5' eine *Hind* III- und 3' eine *BamH* I-

Schnittstelle einführen, amplifiziert. Das PCR-Produkt wurde in den Vektor pCR2.1 zwischenligiert, aus diesem mit *Hind* III und *Bam*H I isoliert und in den entsprechend geschnittenen Vektor pcDNA1.1/Amp kloniert. So wurde der Vektor pcDNA1.1-Hsp60 erhalten. Die für das Fc-Fragment des humanen IgG1 kodierende genomische DNA, bestehend aus Exons und Introns, wurde aus dem Vektor pcDNA1.1-hCD83-Ig (Cramer, 2001) mit den Enzymen *Bam*H I und *Eag* I herausgeschnitten und in den mit den Restriktionsenzymen *Bam*H I und *Not* I verdauten Vektor pcDNA1.1-Hsp60 ligiert. Das Flussdiagramm in Abbildung 3.4 gibt einen Überblick über die beschriebenen Klonierungsvorgänge.

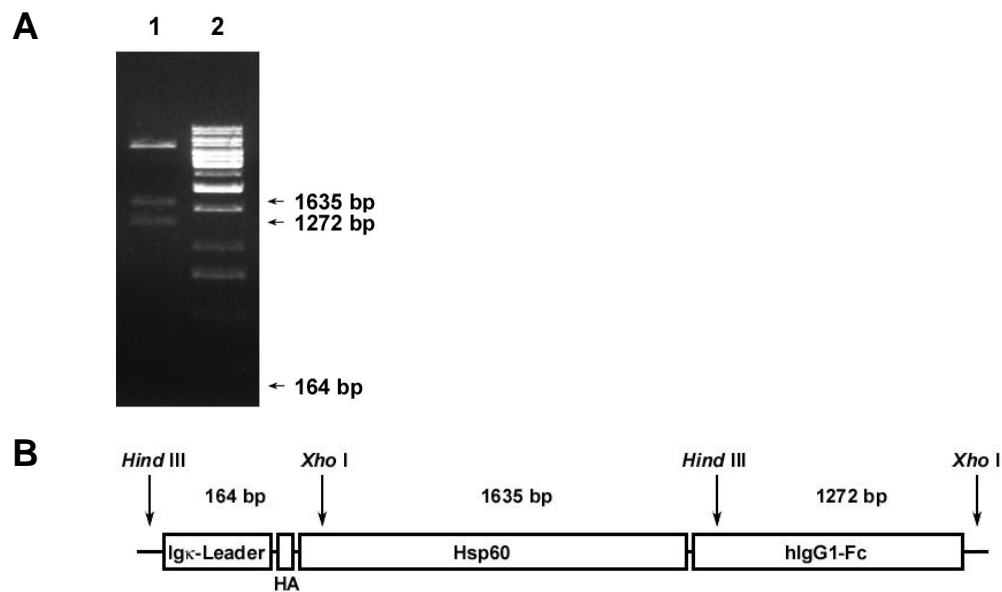


**Abb. 3.4 Klonierungsstrategie zur Konstruktion des Vektors pcDNA1.1-Hsp60-Ig**

Die Hsp60-cDNA wurde inklusive der 5'-Igκ-Signalsequenz mit den Primern pDisp-*Hind* III-sense und pDisp-*Bam*H I-antisense von dem Vektor pDisplay-mHsp60-⑤ amplifiziert. Das PCR-Amplifikat wurde in den Vektor pCR2.1 zwischenligiert, mit *Hind* III und *Bam*H I aus diesem ausgeschnitten und in den entsprechend geschnittenen Vektor pcDNA1.1/Amp ligiert. Auf diese Weise wurde der Vektor pcDNA1.1-Hsp60 erhalten. Das Fc-Fragment des humanen IgG1 wurde aus dem Vektor pcDNA1.1-hCD83-Ig mit den Enzymen *Bam*H I und *Eag* I ausgeschnitten, in den *Bam*H I / *Not* I-verdauten Vektor pcDNA1.1-Hsp60 ligiert und so schließlich der Vektor pcDNA1.1-Hsp60-Ig erhalten.

Abbildung 3.5 zeigt einen Kontrollverdau des Vektors pcDNA1.1-Hsp60-Ig mit den Enzymen *Hind* III und *Xho* I (Abb. 3.5-A). Das Enzym *Hind* III schneidet einmal 5' der Igκ-Signalsequenz und ein zweites Mal im 5'-Bereich innerhalb des Ig-Teils. *Xho* I besitzt eine Schnittstelle im 5'-Bereich der Hsp60-cDNA und eine zweite Schnittstelle

3' des Ig-Abschnittes innerhalb der Vektorsequenz, wie in Abbildung 3.5-B schematisch dargestellt ist. Dabei ergeben sich neben dem Vektorgerüst von etwa 4000 bp drei Fragmente der Größen 1635 bp, 1272 bp und 164 bp, die sich auch im Kontrollverdau des pcDNA1.1-Hsp60-Ig-Vektors wiederfinden (Abb. 3.5-A). Der Vektor pcDNA1.1-Hsp60-Ig wurde anschließend ebenfalls durch Sequenzierung überprüft.



**Abb. 3.5 Kontrollverdau des Vektors pcDNA1.1-Hsp60-Ig**

A) In einem 1%igen TBE-Gel ist der Kontrollverdau des pcDNA1.1-Hsp60-Ig-Vektors mit den Enzymen *Hind* III und *Xho* I, der in B) schematisch gezeigt ist, dargestellt (Spur 1). Er weist die erwarteten Fragmentgrößen von 1635, 1272 und 164 bp auf. Spur 2: 1 kb-DNA-Marker.

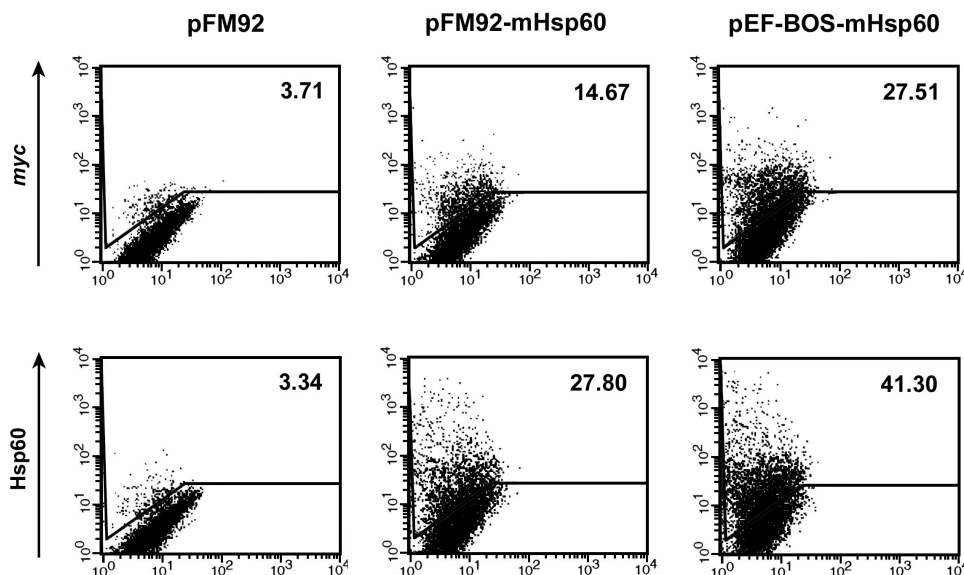
### 3.2.2 Expression des Hsp60-Proteins in eukaryontischen Zelllinien

#### 3.2.2.1 Transiente Expression von membranständigem Hsp60 auf der Oberfläche von COS1-Zellen

Das membranständige Hsp60-Protein (mHsp60) wurde zunächst transient in COS1-Zellen exprimiert. Die Zellen wurden hierfür mit den Vektoren pDisplay-mHsp60, pFM92-mHsp60 oder pEF-BOS-mHsp60 sowie zur Kontrolle mit den Vektoren pFM92 oder pEF-BOS ohne Hsp60-Insert transfiziert. Die Oberflächenexpression des Hsp60-



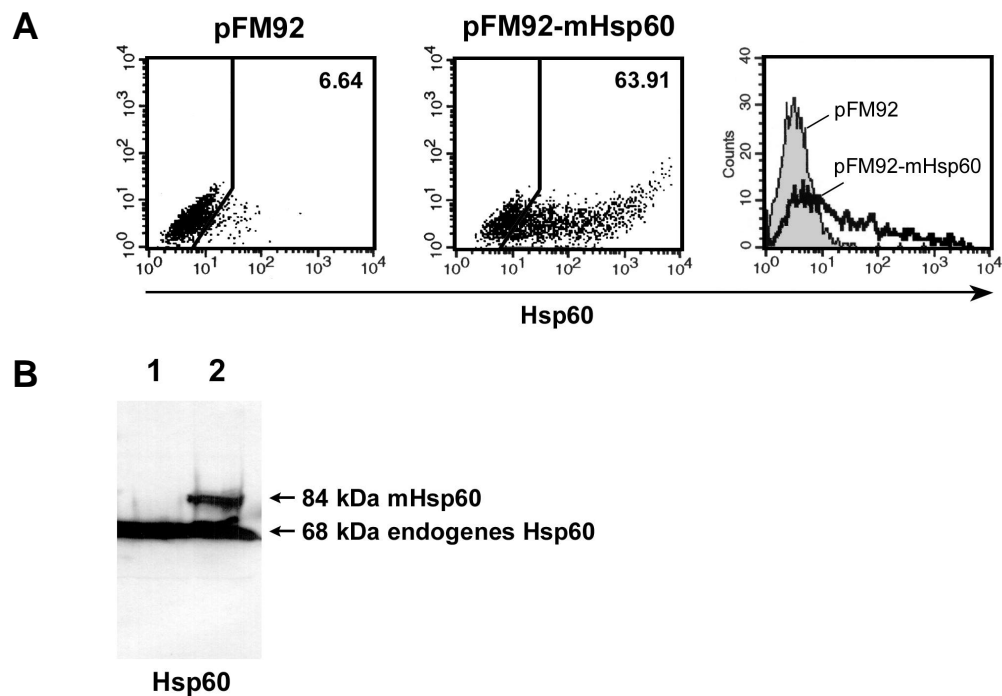
Proteins wurde am darauf folgenden Tag durch Färbung mit spezifischen Antikörpern gegen das Hsp60-Protein oder eines der beiden flankierenden Epitope (HA, *myc*) im Durchflusszytometer (FACS) analysiert. Abbildung 3.6 zeigt, dass das Hsp60-Protein auf der Zelloberfläche sowohl durch den anti-Hsp60- als auch durch den anti-*myc*-Antikörper vierundzwanzig Stunden nach der Transfektion in mHsp60-transfizierten Zellen detektierbar war. Dabei waren zwischen 15% und 40% Hsp60-positive Zellen nachweisbar. Ähnliche Resultate wurden auch mit dem Vektor pDisplay-mHsp60 erhalten (Daten nicht gezeigt), der allerdings eine geringere Transfektionseffizienz aufwies.



**Abb. 3.6 Durchflusszytometrische Analyse einer COS1-Transfektion mit den Vektoren pFM92, pFM92-mHsp60 und pEF-BOS-mHsp60**

COS1-Zellen wurden mit den Vektoren pFM92, pFM92-mHsp60 und pEF-BOS-mHsp60 mit Fugene6-Reagenz transfiziert und nach 24h mit anti-*myc* (9E10)- (oben) beziehungsweise anti-Hsp60-Antikörper (SPA806) (unten) extrazellulär gefärbt (y-Achse). Die x-Achse zeigt die Eigenfluoreszenz der Zellen. Die Zahlen geben den Anteil positiver Zellen in Prozent an.

Die Expression des rekombinanten membrangebundenen Hsp60-Proteins wurde darüber hinaus auch durch Western-Blot von Lysaten transfizierter Zellen kontrolliert. Abbildung 3.7 zeigt eine COS1-Transfektion mit den Vektoren pFM92 und pFM92-mHsp60 in einer Hsp60-spezifischen FACS-Färbung sowie im Hsp60-spezifischen Western-Blot.



**Abb. 3.7 FACS-Färbung und Western-Blot mHsp60-transfizierter COS1-Zellen**

**A)** Die Abbildung zeigt die durchflusszytometrische Analyse Hsp60-spezifisch gefärbter COS1-Zellen 48h nach der Transfektion mit den Vektoren pFM92 (links) und pFM92-mHsp60 (Mitte). Die Zahlen geben den Anteil positiver Zellen in Prozent an. Rechts ist eine Histogrammdarstellung dieser Färbung gezeigt, in der die Verschiebung der Fluoreszenzintensität (X-Achse) pFM92-mHsp60-transfizierter Zellen (schwarze Linie) gegenüber pFM92-transfizierten Hsp60-negativen Zellen (grau gefüllter Bereich) dargestellt ist.

**B)** Lysate der pFM92- (Spur 1) und pFM92-mHsp60-transfizierten COS1-Zellen (Spur 2) wurden in einem 10%igen SDS-Gel aufgetrennt und im Semi-Dry-Blotverfahren auf eine Nitrocellulosemembran transferiert. Hsp60 wurde mit dem spezifischen monoklonalen anti-Hsp60-Antikörper (SPA806) detektiert.

Im Western-Blot von Zelllysaten mHsp60-positiver wie auch -negativer COS1-Zellen detektierte der anti-Hsp60-Antikörper ein Protein von 68 kDa. Hierbei handelt es sich wahrscheinlich um das endogene mitochondriale Hsp60-Protein. Es besitzt als unreifes Protein inklusive seiner mitochondrialen Importsignalsequenz eine Länge von 575 Aminosäuren, nach Abspaltung des Signalpeptids eine Länge von 544 Aminosäuren, und läuft im Gel mit einem etwas höheren Molekulargewicht als aus seiner Länge geschätzt werden kann (58 beziehungsweise 55 kDa). Ausschließlich in Lysaten mHsp60-exprimierender Zellen detektierte der Hsp60-spezifische Antikörper darüber hinaus eine zusätzliche Proteinbande von etwa 84 kDa. Diese repräsentiert

wahrscheinlich das monomere rekombinante mHsp60-Molekül. Es besitzt als unreifes Protein mit seiner sekretorischen Signalsequenz eine Länge von 630 Aminosäuren, als reifes Protein nach Abspaltung des Signalpeptids eine Länge von 609 Aminosäuren, und läuft damit im Gel, wie auch das endogene Hsp60, mit etwas höherem Molekulargewicht, als aus seiner Länge abgeschätzt werden kann (etwa 63 kDa beziehungsweise 60 kDa).

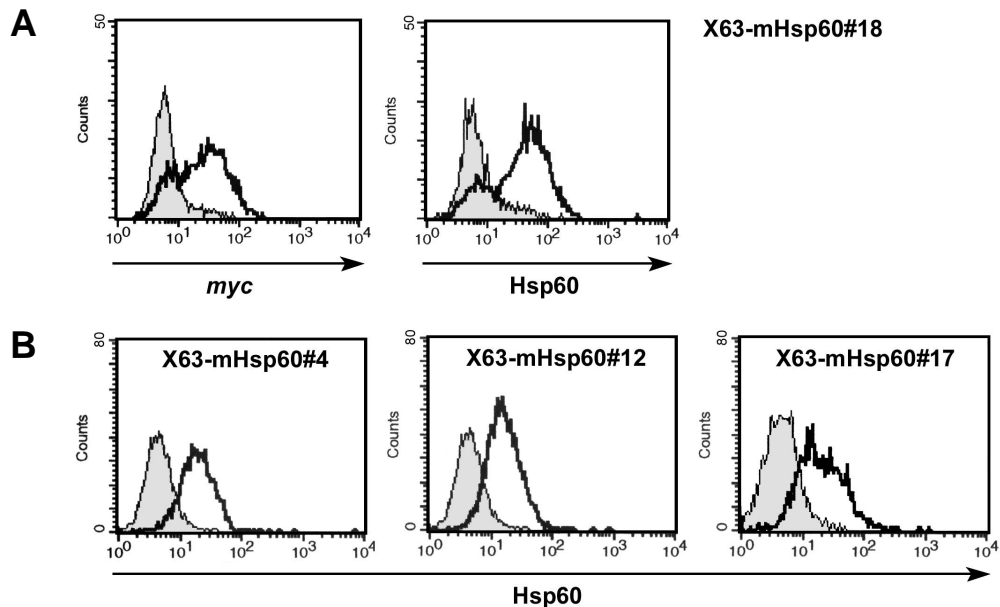
### **3.2.2.2 Stabile Expression von membranständigem Hsp60 auf der Oberfläche von murinen X63-Tumorzellen**

Da es sich bei COS1-Zellen nicht um murine Zellen handelt, sind mit ihnen keine *in vivo*-Experimente im Mausmodell möglich. Deshalb sollte versucht werden, eine murine Zelllinie zu etablieren, die das membrangebundene Hsp60-Protein stabil auf ihrer Zelloberfläche exprimiert. Die stabile Transfektion verschiedener muriner Zelllinien, darunter T-Zelllinien (RMA, EL-4, 58 $\alpha\beta$ ), Melanom- (B16) und Fibroblastenzelllinien (RT23HD6), erwies sich als sehr schwierig. Häufig wurden zunächst positive Zellklone gefunden, die aber schließlich die Expression des Proteins wieder herunterregulierten.

Positive Zelllinien, die das membrangebundene Hsp60-Protein stabil auf der Oberfläche exprimierten, konnten ausschließlich durch Transfektion der B-Zelllymphomlinie X63 erzeugt werden. Hierfür wurde der Vektor pFM92-mHsp60 verwendet. Außerdem wurden Hsp60-negative X63-Kontrollzelllinien durch Transfektion mit dem pFM92-Vektor ohne Hsp60-Insert hergestellt.

Transfizierte Zelllinien wurden mit Hilfe der Bindung von Hsp60- beziehungsweise *myc*-spezifischen Antikörpern durchflusszytometrisch untersucht. Abbildung 3.8-A zeigt eine exemplarische Färbung der Linie X63-mHsp60#18 mit diesen Antikörpern im Vergleich mit einer X63-Linie, die mit dem Vektor pFM92 ohne Hsp60-Insert transfiziert wurde. Auf der Oberfläche von X63-mHsp60#18-Zellen konnte mit beiden Antikörpern das rekombinante mHsp60-Molekül auf der Oberfläche von etwa 70% der Zellen detektiert werden. 30% der Zellen waren jedoch Hsp60-negativ. Um zu verhindern, dass mHsp60-exprimierende von Hsp60-negativen Zellen überwachsen und verdrängt werden, wurde deshalb eine Subklonierung durchgeführt. Auf diese Weise wurden drei Zellklone erhalten (X63-mHsp60#4, X63-mHsp60#12, X63-mHsp60#17), deren Färbung mit anti-Hsp60-Antikörper in Abbildung 3.8-B gezeigt ist. Im Gegensatz

zu der in Abbildung 3.8-A gezeigten Mischpopulation exprimierten alle Zellen dieser Subklone das membrangebundene Hsp60-Protein auf der Zelloberfläche.



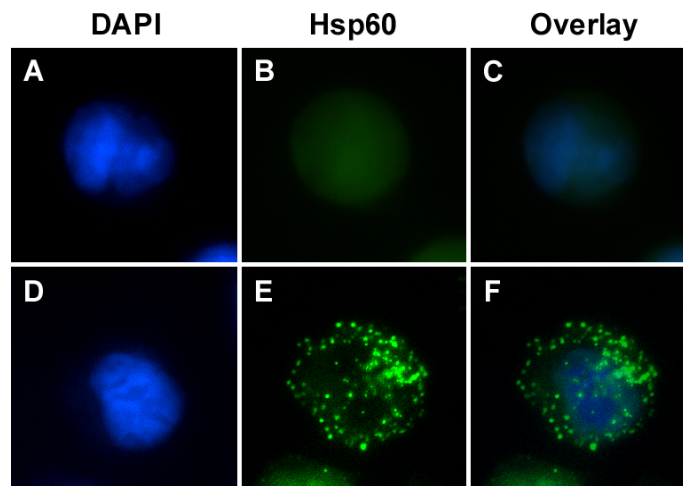
**Abb. 3.8 Expression von membranständigem Hsp60 auf der Zelloberfläche stabil transfizierter X63-Tumorzellen**

**A)** Die Abbildung zeigt eine Histogrammdarstellung der Färbung einer mit dem Vektor pFM92-mHsp60 transfizierten X63-Zelllinie (schwarze Linie, X63-mHsp60#18) im Vergleich zu einem X63-Zellklon, der mit dem Vektor pFM92 ohne Hsp60-Insert transfiziert wurde (grau gefüllter Bereich), mit anti-*myc* (9E10)- (links) und anti-Hsp60-Antikörper (SPA806) (rechts).

**B)** Abgebildet ist die Histogrammdarstellung der durchflusszytometrischen Analyse von drei pFM92-mHsp60-transfizierten Zellklonen (X63-mHsp60#4, X63-mHsp60#12, X63-mHsp60#17) nach der Subklonierung der oben gezeigten Linie X63-mHsp60#18. Die mHsp60-exprimierenden Zellklone (schwarze Linie) und pFM92-transfizierten Kontrollzellen (grau gefüllter Bereich) wurden mit anti-Hsp60-Antikörper (SPA806) gefärbt. x-Achse: Fluoreszenzintensität, y-Achse: Zellzahl

Als weitere Kontrolle wurde das Hsp60-Protein auf der Oberfläche transfizierter X63-Zellen auch im Zytopin detektiert. Abbildung 3.9 zeigt Zytopinfärbungen von Hsp60-negativen X63-Kontrollzellen, die mit dem Vektor pFM92 ohne Hsp60-Insert transfiziert wurden, und exemplarisch von dem Klon X63-mHsp60#12. Die Zellen wurden mit Hsp60-spezifischem Antikörper und dem DNA-Farbstoff DAPI gefärbt. Auf der Zelloberfläche pFM92-transfizierter X63-Zellen war erwartungsgemäß kein Hsp60 nachweisbar. Das rekombinante mHsp60-Protein war jedoch auf der Oberfläche

des pFM92-mHsp60-transfizierten Zellklons X63-mHsp60#12 im Zytospin detektierbar und lag in der Membran dieser Zellen in großen Aggregaten vor.



**Abb. 3.9 Zytospin Hsp60-spezifisch gefärbter transfizierter X63-Zellen**

Die Zellen wurden zunächst wie für die durchflusszytometrische Analyse extrazellulär Hsp60-spezifisch gefärbt (SPA806) (grün), anschließend auf einen Objektträger zentrifugiert und der Zellkern mit DAPI (blau) gegengefärbt.

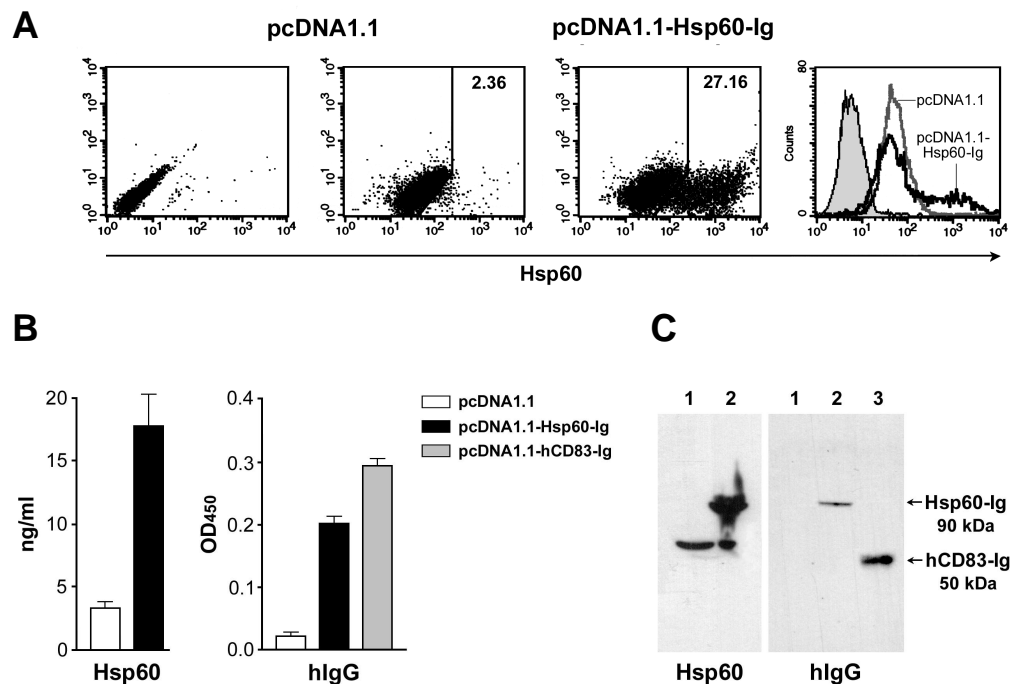
**A-C)** pFM92-transfizierte Hsp60-negative X63-Zellen, **D-F)** X63-mHsp60#12.

Dargestellt ist jeweils die Zellkernfärbung (links), die Hsp60-Färbung (Mitte) und eine Überlagerung beider Färbungen (rechts).

### 3.2.2.3 Transiente Expression von Hsp60-Ig-Fusionsprotein in COS1-Zellen

Neben der Expression des membranständigen Hsp60-Proteins sollte auch ein lösliches Hsp60-Protein hergestellt werden, das in den Kulturüberstand freigesetzt wird und aus diesem angereichert werden kann. Hierfür wurde der Vektor pcDNA1.1-Hsp60-Ig hergestellt, der in COS1-Zellen zur Expression gebracht wurde. Abbildung 3.10-A zeigt die durchflusszytometrische Analyse einer intrazellulären Hsp60-Färbung von COS1-Zellen nach Transfektion mit den Vektoren pcDNA1.1 ohne Hsp60-Insert und pcDNA1.1-Hsp60-Ig. Das Protein wurde im Kulturüberstand Hsp60-Ig-transfizierter Zellen mit einem hIgG-spezifischen ELISA (Abb. 3.10-B rechts) nachgewiesen und durch einen Hsp60-spezifischen ELISA (Abb. 3.10-B-links) quantifiziert.  $5 \times 10^4$  Hsp60-Ig-transfizierte COS1-Zellen produzierten 15-20 ng/ml Hsp60-Ig innerhalb von vierundzwanzig Stunden. Diese geringen Mengen des Fusionsproteins waren im

Western-Blot von Kulturüberstand Hsp60-Ig-transfizierter Zellen erwartungsgemäß nicht detektierbar. Das rekombinante Protein konnte jedoch in Lysaten Hsp60-Ig-transfizierter Zellen nachgewiesen werden. Abbildung 3.10-C zeigt einen Hsp60- und hIgG-spezifischen Western-Blot von Zelllysaten von COS1-Zellen, die entweder mit dem Kontrollvektor pcDNA1.1 oder pcDNA1.1-Hsp60-Ig transfiziert waren.



**Abb. 3.10 Expression von Hsp60-Ig-Fusionsprotein in COS1-Zellen**

**A)** Die Abbildung zeigt eine Hsp60-spezifische intrazelluläre FACS-Färbung von pcDNA1.1- und pcDNA1.1-Hsp60-Ig-transfizierten COS1-Zellen. Dargestellt ist eine negative Kontrollfärbung pcDNA1.1-transfizierter COS1 mit Sekundärantikörper allein (1. Abb. von links) und anti-Hsp60 (2. Abb. von links) sowie pcDNA1.1-Hsp60-Ig-transfizierter Zellen mit anti-Hsp60 (3. Abb. von links). Die Zahlen geben den Anteil positiver Zellen in Prozent an. Die Abbildung rechts zeigt eine Histogrammdarstellung der Färbung. Grau gefüllter Bereich: Hintergrundfärbung mit Sekundärantikörper allein (pcDNA1.1), dunkelgraue Linie: Hsp60-Färbung pcDNA1.1-transfizierter Zellen, schwarze Linie: Hsp60-Färbung pcDNA1.1-Hsp60-Ig-transfizierter Zellen.

**B)** Dargestellt ist der Nachweis des Hsp60-Ig-Fusionsmoleküls im Kulturüberstand pcDNA1.1-Hsp60-Ig-transfizierter Zellen mit Hilfe eines Hsp60-spezifischen ELISA (links) und hIgG-spezifischen ELISA (rechts). Zum Vergleich wurde Kulturüberstand von pcDNA1.1- und pcDNA1.1-hCD83-Ig-transfizierten Zellen untersucht. Aufgetragen ist der Mittelwert von Triplikaten.

**C)** Gezeigt ist ein Hsp60- und hIgG-spezifischer Western-Blot von Zelllysaten pcDNA1.1-transfizierter COS1-Kontrollzellen (Spur 1), pcDNA1.1-Hsp60-Ig- (Spur 2) und pcDNA1.1-hCD83-Ig-transfizierter COS1-Zellen (Spur 3).

Im Hsp60- wie hIgG-spezifischen Western-Blot war das rekombinante Hsp60-Ig-Protein mit einer Größe von etwa 90 kDa detektierbar. Es läuft damit, wie auch das endogene mitochondriale Hsp60 und rekombinante membrangebundene Hsp60 (siehe Abb. 3.7), im Gel mit etwas höherem Molekulargewicht als bei seiner Länge von 805 Aminosäuren erwartet (80 kDa).

Für Untersuchungen des immunmodulatorischen Potentials des murinen Hsp60-Proteins und der dieser Funktion zugrundeliegenden Mechanismen, die im zweiten und dritten Teil dieser Arbeit beschrieben werden, standen nun Zelllinien zur Verfügung, die Hsp60 transient oder stabil als membrangebundenes Protein auf der Zelloberfläche exprimierten, oder, wenn auch in geringen Mengen, als Hsp60-Ig-Fusionsmolekül in den Kulturüberstand freisetzen.

### **3.3 Teil II: Untersuchung des immunstimulatorischen Potentials des Hsp60-Proteins in *in vitro*-Testsystemen**

#### **3.3.1 Etablierung eines *in vitro*-Testsystems zur Stimulation naiver T-Zellen**

Frühere Experimente haben gezeigt, dass das Hitzeschockprotein Hsp60, mutmaßlich über seine Wirkung auf APZ, ähnlich wie LPS einen Einfluss auf die Aktivierung naiver T-Zellen besitzt und die antigenabhängige IFN $\gamma$ -Produktion in der *in vitro*-Zellkultur steigert (Breloer et al., 2001; Moré et al., 2001; Breloer et al., 2002). Diese Versuche wurden mit rekombinantem, in Bakterien produziertem, Hsp60-Protein durchgeführt. Deshalb konnte letztlich nicht geklärt werden, ob die beobachteten Effekte auf bakterielle Kontaminationen, insbesondere LPS, zurückzuführen waren, oder das Hsp60-Protein selbst eine intrinsische immunstimulatorische Aktivität besitzt.

Zur Beantwortung dieser Frage wurden die in Teil I dieser Arbeit beschriebenen COS1- und X63-Zellen, die Hsp60 als membranverankertes Protein auf der Zelloberfläche exprimieren oder als lösliches Hsp60-Ig-Fusionsmolekül in den Kulturüberstand abgeben, eingesetzt. Mit ihrer Hilfe sollte nun die immunstimulatorische Kapazität des Hsp60-Proteins im *in vitro*-Testsystem überprüft und die zugrundeliegenden Mechanismen untersucht werden.

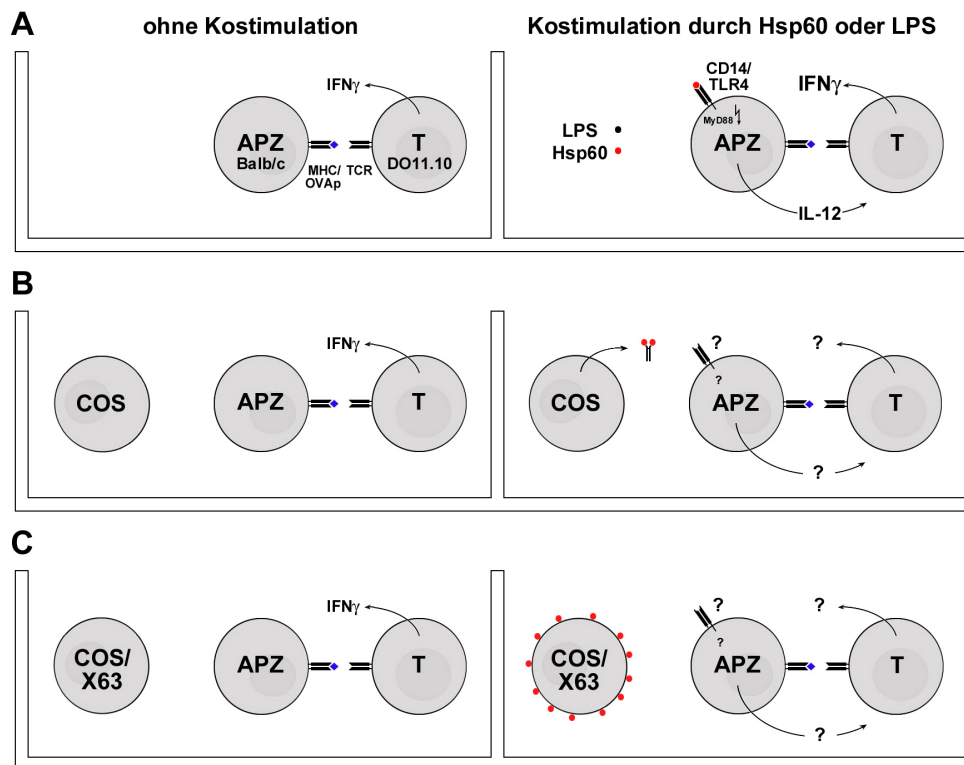
Das verwendete *in vitro*-Testsystem nutzt die Spezifität TCR-transgener T-Zellen, die aus DO11.10-Mäusen isoliert wurden. Der transgene T-Zellrezeptor (TCR) der CD4<sup>+</sup>-T-Zellen dieser Tiere erkennt das Peptid OVA<sub>323-339</sub> des Hühnerovalbumins im Komplex mit MHC II-Molekülen des Haplotyps I-A<sup>d</sup> auf der Oberfläche von APZ aus Balb/c-Mäusen (Hosken et al., 1995). Als APZ wurden peritoneale Exudatzellen (*peritoneal exudate cells*, PEC) aus Balb/c-Mäusen verwendet. Sie bestehen zu etwa 90% aus CD11b-positiven Makrophagen.

Für den Test wurden aus der Milz von DO11.10-Mäusen isolierte T-Zellen *in vitro* in Gegenwart von transfizierten mHsp60-exprimierenden beziehungsweise Hsp60-Ig-sezernierenden COS1- oder X63-Zellen und PEC mit Peptidantigen aktiviert. Zum Vergleich wurden COS1- oder X63-Zellen eingesetzt, die mit dem entsprechenden Vektor ohne Hsp60-Insert transfiziert waren. Nach vierundzwanzig oder achtundvierzig Stunden wurde darauf das Zytokin IFN $\gamma$  im Kulturüberstand mit Hilfe des ELISA quantifiziert. Abbildung 3.11 zeigt eine schematische Darstellung des Versuchsaufbaus.

Für Untersuchungen zum Mechanismus der immunstimulatorischen Funktion des Hsp60-Proteins wurden ebenfalls PEC aus Balb/c-IL-12p40<sup>-/-</sup>-Mäusen verwendet und zur Stimulation von DO11.10-T-Zellen mit Peptidantigen eingesetzt. Bei Kombinationen von PEC und T-Zellen aus Balb/c-IL-12p40<sup>-/-</sup>-Mäusen wurden die T-Zellen mit anti-CD3-Antikörper stimuliert, da Balb/c-T-Zellen nicht über einen transgenen T-Zellrezeptor verfügen.

Darüber hinaus wurden analog dem hier vorgestellten System außerdem Milzzellen oder T-Zellen sowie korrespondierende PEC aus C3HHeN, C3HHeJ und C3HHeN-MyD88<sup>-/-</sup>-Mäusen isoliert und im Test eingesetzt. Auch die T-Zellen dieser Tiere besitzen keinen transgenen TCR, so dass hier ebenfalls eine T-Zellaktivierung über das Engagement des TCR durch anti-CD3-Antikörper initiiert wurde.





**Abb. 3.11 *in vitro*-Testsystem zur Stimulation naiver T-Zellen**

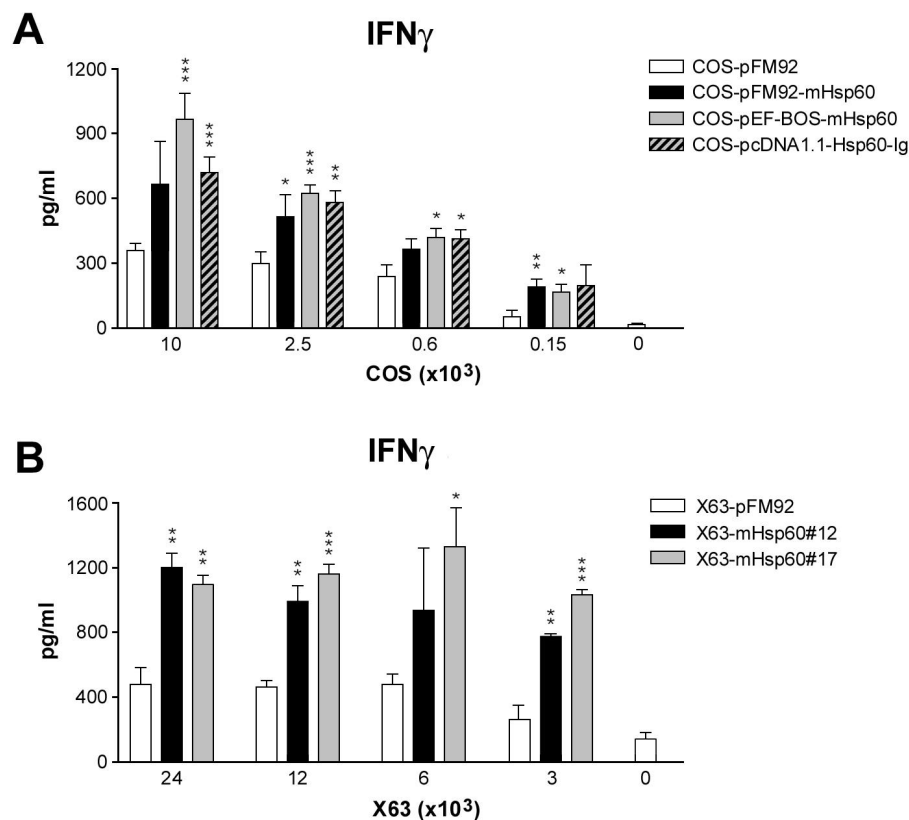
**A)** DO11.10-T-Zellen produzieren in Gegenwart von Balb/c-APZ und OVA-Peptidantigen (OVAp), das den T-Zellen im Komplex mit MHC II-Molekülen auf der Oberfläche der APZ präsentiert wird, geringe Mengen  $\text{IFN}\gamma$  (links). Die Zugabe von LPS oder rekombinatem löslichen Hsp60-Protein führt zu einer Aktivierung der APZ, die durch eine verstärkte Expression kostimulatorischer Moleküle auf der Zelloberfläche und die Freisetzung inflammatorischer Zytokine, insbesondere IL-12, gekennzeichnet ist. Die Aktivierung der APZ führt ihrerseits zu einer Steigerung der  $\text{IFN}\gamma$ -Produktion in T-Zellen (rechts).

Abbildungen **B)** und **C)** zeigen den Versuchsaufbau unter Verwendung verschiedener Zelllinien, die zur Kontrolle mit dem entsprechenden Vektor ohne Hsp60-Insert transfiziert wurden (B, C, links), Hsp60-Ig-Fusionsmolekül in den Kulturüberstand freisetzen (B, rechts) oder membranverankertes Hsp60 auf ihrer Oberfläche exprimierten (C, rechts).

### 3.3.2 Hsp60 steigert die $\text{IFN}\gamma$ -Produktion in $\text{CD4}^+$ -T-Zellen

Zunächst wurde die Aktivierung naiver DO11.10-T-Zellen in Gegenwart von Balb/c-PEC und Peptidantigen untersucht. Dabei wurden titrierte Mengen verschiedener stabil transfizierter X63-Zellklone und transient transfizierter COS1-Zellen, die das membrangebundene Hsp60 auf der Oberfläche exprimierten, wie auch COS1-Zellen,

die Hsp60-Ig-Fusionsprotein in den Kulturüberstand freisetzen, neben Hsp60-negativen pFM92-transfizierten COS1-Zellen beziehungsweise X63-Zellklonen eingesetzt.



**Abb. 3.12 Hsp60 stimuliert die IFN $\gamma$ -Produktion in CD4<sup>+</sup>-T-Zellen**

**A)**  $5 \times 10^4$  DO11.10-T-Zellen, die durch Depletion von MHC II<sup>+</sup>-Zellen aus der Milz aufgereinigt wurden, wurden 24h in Gegenwart von  $5 \times 10^4$  Balb/c-PEC und den angegebenen Mengen transfizierter COS1-Zellen (x-Achse) mit 1  $\mu$ g/ml OVA-Peptid stimuliert und IFN $\gamma$  im Kulturüberstand mit Hilfe eines spezifischen ELISA quantifiziert (y-Achse). weiß: pFM92-transfizierte Hsp60-negative COS1, schwarz: pFM92-mHsp60-transfizierte COS1, grau: pEF-BOS-mHsp60-transfizierte COS1, gestreift: pcDNA1.1-Hsp60-Ig-transfizierte COS1. Die Abbildung ist repräsentativ für eines von drei unabhängigen Experimenten und zeigt die aus Triplikaten gebildeten Mittelwerte sowie die Standardabweichung der Mittelwerte (*standard error of the mean*, SEM).

**B)**  $5 \times 10^4$  DO11.10-T-Zellen (siehe oben) wurden 24h in Gegenwart von  $1 \times 10^5$  PEC und titrierten Mengen (x-Achse) Hsp60-negativer X63-Zellen (X63-pFM92, weiß) oder mHsp60-positiver X63-Zellklone (schwarz: X63-mHsp60#12; grau: X63-mHsp60#17) mit 1  $\mu$ g/ml OVA-Peptid stimuliert und IFN $\gamma$  im Kulturüberstand quantifiziert (y-Achse). Gezeigt sind die Mittelwerte und SEM von Triplikaten. Dieses Experiment wurde zehnmal reproduziert.

Die Signifikanz der beobachteten Steigerung der IFN $\gamma$ -Produktion in Gegenwart von Hsp60-exprimierenden Zellen im Vergleich mit Hsp60-negativen Zellen ist durch Sternchen symbolisiert (\*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.005$ , \*\*\*  $p < 0.0005$ ) und wurde mit Hilfe des Students-t-Test (unpaired, two-tailed) ermittelt.

Die Addition Hsp60-negativer transfizierter COS1- und auch X63-Zellen in der Testkultur führte zwar konzentrationsabhängig bereits zu einer verstärkten Sekretion von IFN $\gamma$  (Abb. 3.12-A, -B; weiße Balken), die jedoch in Gegenwart des von COS1-Zellen sezernierten Hsp60-Ig-Proteins sowie von Hsp60 auf der Zelloberfläche von COS1-Zellen oder verschiedenen X63-Zellklonen gegenüber den entsprechenden Vergleichskulturen, die dieselbe Anzahl Hsp60-negativer Kontrollzellen enthielten, signifikant gesteigert wurde. Die Titration der Hsp60-positiven und -negativen COS1- und X63-Zellen in der Testkultur zeigte darüber hinaus eine deutliche Konzentrationsabhängigkeit des beobachteten Effekts. Die Steigerung der IFN $\gamma$ -Produktion war abhängig von der eingesetzten Anzahl Hsp60-exprimierender transfizierter Zellen und somit auch von der im Testsystem enthaltenen Konzentration an membrangebundenem Hsp60 oder Hsp60-Ig-Fusionsprotein.

Um auszuschließen, dass klonale Variationen der transfizierten COS1- und X63-Zellen – unabhängig von der Hsp60-Expression – die unterschiedliche Aktivierung der T-Zellen verursachten, wurden folgende Kontrollen durchgeführt:

- i) COS1-Zellen wurden transient mit entsprechenden Hsp60-Expressionsvektoren transfiziert. Hsp60-negative und Hsp60-exprimierende COS1-Zellen entstammten dabei derselben Zellkultur und wurden nur achtundvierzig Stunden nach der Transfektion voneinander getrennt kultiviert. Es ist daher unwahrscheinlich, dass innerhalb dieser kurzen Zeit Variationen der Linien auftraten.
- ii) Hsp60 wurde als sezerniertes Hsp60-Ig-Fusionsprotein in COS1-Zellen exprimiert. Auch die Addition dieser Hsp60-Ig-exprimierenden Zellen führte zu einer Steigerung der IFN $\gamma$ -Freisetzung.
- iii) Es wurden drei verschiedene mHsp60-exprimierende X63-Zellklone etabliert. Die Addition aller mHsp60-positiven X63-Klone führte zu einer Steigerung der IFN $\gamma$ -Produktion, wie sie in Abbildung 3.12 für zwei der Klone gezeigt ist.
- iiii) Weder Hsp60-negative noch mHsp60-positive X63-Zellklone exprimierten selbst die für die Präsentation des OVA-Peptidantigens notwendigen MHC II-Moleküle des I-A<sup>d</sup>-Haplotyps. Die Steigerung der IFN $\gamma$ -Freisetzung kann deshalb nicht auf eine verstärkte MHC-Expression und Antigenpräsentation einzelner Klone zurückgeführt werden.

Vergleichbare Ergebnisse wurden darüberhinaus auch in einem weiteren Testsystem unter Verwendung TCR-transgener CD8<sup>+</sup>-T-Zellen aus OT-1-Mäusen, die das Peptid

OVA<sub>257-264</sub> aus Hühnerovalbumin im Komplex mit MHC I-Molekülen des Haplotyps H2-k<sup>b</sup> erkennen, beobachtet (Daten nicht gezeigt).

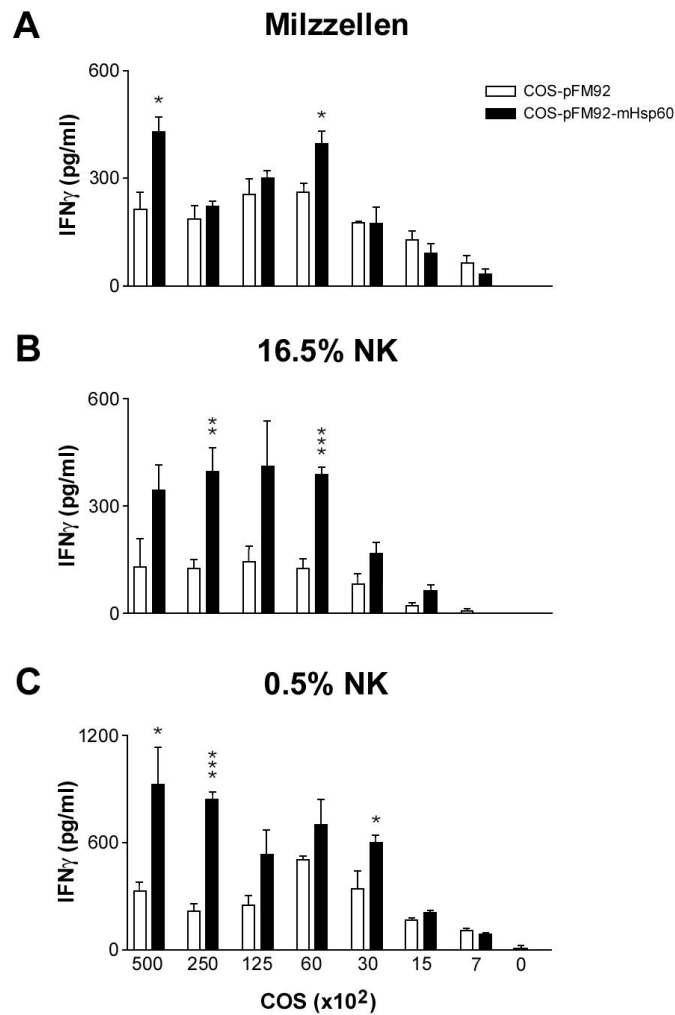
Diese Ergebnisse zeigen, dass eukaryontisches Endotoxin-freies Hsp60 eine intrinsische immunstimulatorische Aktivität besitzt, die bei der antigenabhängigen T-Zellaktivierung zu einer verstärkten Freisetzung des Zytokins IFN $\gamma$  führt. Dabei besaß sowohl das auf Zelloberfläche exprimierte Hsp60 als auch das in den Kulturüberstand freigesetzte Hsp60-Ig-Fusionsprotein diese biologische Aktivität.

### 3.3.3 Rolle von NK-Zellen

Es wurde gezeigt, dass Hsp60 in APZ die Expression und Sekretion des Zytokins IL-12 induziert (Chen et al., 1999). Dieses Zytokin ist als IFN $\gamma$ -induzierender Faktor sowohl für T-Zellen als auch NK-Zellen bekannt (Billiau, 1996; Übersicht bei Biron und Brossay, 2001; Das et al., 2001; Übersicht bei Langrish et al., 2004). Um die Beteiligung von NK-Zellen an der durch Hsp60 induzierten IFN $\gamma$ -Produktion zu überprüfen, wurden für den Einsatz im *in vitro*-Testsystem verschiedene Methoden der T-Zellpräparation angewendet. Zum einen handelte es sich dabei um die Depletion MHC II-positiver Zellen aus der Milz, wobei die NK-Zellen in der T-Zellpräparation verbleiben (MHC II depletion kit, Miltenyi), zum anderen um die Aufreinigung von T-Zellen durch Depletion aller nicht-T-Zellen (Pan T cell kit, Miltenyi). Bei dieser Methode werden auch NK-Zellen aus der Zellpräparation eliminiert.

Milzzellen, MHC II-depletierte T-Zellen und Pan T cell kit-gereinigte T-Zellen wurden zunächst hinsichtlich der prozentualen Verteilung von T- und NK-Zellen mit Hilfe der FACS-Analyse untersucht (Daten nicht gezeigt). Zur Identifikation von NK-Zellen diente dabei das Oberflächenmolekül DX5, das überwiegend von NK- und NKT-Zellen exprimiert wird. In der Milz von DO11.10-Mäusen wurden 25.4% CD4<sup>+</sup>-T-Zellen und 6.4% DX5<sup>+</sup>-NK-Zellen detektiert. Durch Depletion MHC II-positiver Zellen wie auch durch Präparation der T-Zellen mit dem Pan T cell kit konnte der Anteil CD4<sup>+</sup>-T-Zellen in der Präparation auf vergleichbare 64.5% beziehungsweise 66.4% angereichert werden. In MHC II-depletierten Zellpräparationen wurde jedoch ebenfalls der Anteil DX5-positiver NK-Zellen auf 16.5% erhöht. Diese Zellpräparation wird im folgenden Experiment als „16.5% NK“ bezeichnet. Im Gegensatz dazu konnten DX5<sup>+</sup>-NK-Zellen durch Präparation der T-Zellen mit dem Pan T cell kit nahezu vollständig eliminiert werden (0.5%). Diese T-Zellen werden im folgenden Experiment als „0.5% NK“

bezeichnet. Milzzellen, 16.5%- und 0.5%-NK-Zellen wurden im *in vitro*-Testsystem eingesetzt, um zu überprüfen, ob NK-Zellen an der Produktion von IFN $\gamma$  bei Stimulation mit Hsp60 beteiligt sind. Abbildung 3.13 zeigt das Ergebnis eines solchen Stimulationsexperimentes, bei dem titrierte Mengen Hsp60-negativer und mHsp60-exprimierender COS1-Zellen eingesetzt wurden.



**Abb. 3.13 Hsp60 stimuliert die Produktion von IFN $\gamma$  in Abwesenheit von DX5<sup>+</sup>-NK-Zellen**

1 $\times$ 10<sup>5</sup> DO11.10-Milzzellen (A), 16.5% NK-Zellen (B) oder 0.5 % NK-Zellen (C) wurden mit 1 $\times$ 10<sup>5</sup> bestrahlten Balb/c-Milzzellen als APZ und titrierten Mengen (x-Achse) Hsp60-negativer COS1-Zellen (weiße Balken) oder mHsp60-positiver COS1-Zellen (schwarze Balken) mit 1  $\mu$ g/ml OVA-Peptid aktiviert. IFN $\gamma$  wurde nach 48h im Kulturüberstand mit Hilfe des ELISA quantifiziert (y-Achse). Gezeigt sind die Mittelwerte von Triplikaten und SEM. Sternchen symbolisieren die Signifikanz der durch Hsp60-gesteigerten Zytokinproduktion. Sie wurde mit dem Students-t-Test (unpaired, one-tailed) ermittelt. \* p<0.05, \*\* p<0.005, \*\*\* p<0.0005

Bei Stimulation von Gesamtmilzzellen mit OVA-Peptidantigen wurde die Freisetzung von IFN $\gamma$  in Gegenwart mHsp60-präsentierender COS1-Zellen im Vergleich mit Hsp60-negativen COS1-Zellen nur schwach gesteigert (Abb. 3.13-A). Bei der antigenabhängigen Stimulation von gereinigten T-Zellpräparationen, die 16.5% DX5<sup>+</sup>-NK-Zellen enthielten (Abb. 3.13-B) oder aus denen die DX5<sup>+</sup>-NK-Zellen nahezu vollständig eliminiert worden waren (0.5% NK; Abb. 3.13-C), führte die Gegenwart von Hsp60 auf der Zelloberfläche von COS1-Zellen dagegen zu einem signifikanten Anstieg der IFN $\gamma$ -Konzentration im Kulturüberstand. Auch wenn in diesem Experiment die absolute Menge IFN $\gamma$ , die durch 16.5% NK-Zellen und 0.5% NK-Zellen produziert wurde, variierte, war die prozentuale Steigerung der IFN $\gamma$ -Produktion durch das auf der Zelloberfläche präsentierte Hsp60-Protein in beiden T-Zellpräparationen vergleichbar. Die Gegenwart von membrangebundenem Hsp60 auf COS1-Zellen führte in beiden Fällen etwa zu einer Verdopplung der detektierten IFN $\gamma$ -Konzentration gegenüber Kulturen, die Hsp60-negative COS1-Zellen enthielten.

Dieses Resultat zeigt, dass die Hsp60-induzierte Steigerung der IFN $\gamma$ -Produktion auch in Abwesenheit von DX5<sup>+</sup>-NK-Zellen erfolgen kann. NK-Zellen sind deshalb wahrscheinlich nicht maßgeblich an der durch Hsp60 gesteigerten IFN $\gamma$ -Freisetzung beteiligt.

Der folgende Abschnitt beschäftigt sich nun mit der Untersuchung der Mechanismen, die der Verstärkung einer T-Zellantwort durch Hsp60 *in vitro* zugrundeliegen können.

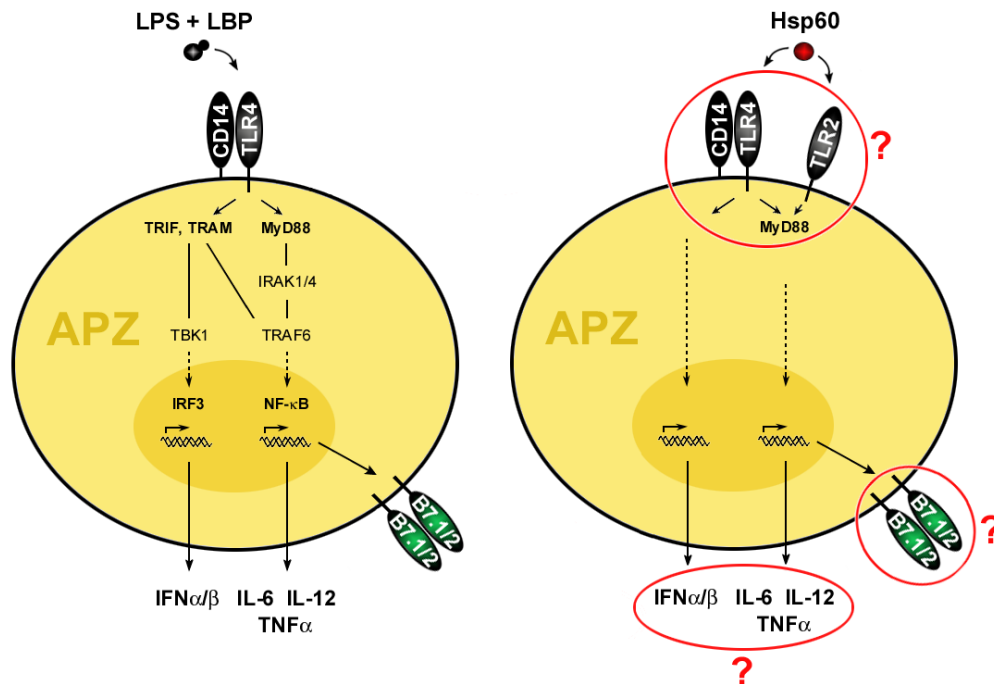
### **3.4 Teil III: Untersuchungen zum Mechanismus der adjuvanten Wirkung von Hsp60**

#### **3.4.1 Mechanismen der Hsp60-vermittelten T-Zellstimulation**

T-Zellen benötigen für ihre Aktivierung antigenpräsentierende Zellen (APZ), die neben der Antigenpräsentation auch das notwendige kostimulatorische Signal vermitteln können. APZ wie dendritische Zellen und Makrophagen können durch verschiedene Stimuli zur Freisetzung von Zytokinen und zu einer gesteigerten Expression kostimulatorischer Moleküle wie B7.1 (CD80) und B7.2 (CD86) angeregt werden. Eine solche Aktivierung von APZ trägt wesentlich zu einer Verstärkung einer

antigenabhängigen T-Zellantwort bei und wurde für bakterielles LPS und bakterielle wie eukaryontische Hitzeschockproteine wie Hsp60 beschrieben (Kol et al., 1999; Kol et al., 2000; Basu et al., 2000; Vabulas et al., 2001; Moré et al., 2001; Breloer et al., 2002).

In den folgenden Abschnitten sollte nun vergleichend untersucht werden, welche Wirkung Hsp60 und LPS auf APZ besitzen. Zunächst sollte überprüft werden, ob Hsp60 spezifisch an die Zelloberfläche von Makrophagen bindet und APZ-Funktionen wie die Expression kostimulatorischer B7-Moleküle und die Freisetzung von Zytokinen moduliert. Anschließend sollte der Einfluss dieser Faktoren auf die Hsp60-induzierte Steigerung der IFN $\gamma$ -Produktion in T-Zellen untersucht und in diesem Teil der Arbeit auch geklärt werden, ob die signalgebende Komponente des LPS-Rezeptorkomplexes, TLR4, und der TLR-assoziierte MyD88-Signalweg an der Hsp60-vermittelten Immunstimulation beteiligt sind. Abbildung 3.14 gibt einen schematischen Überblick über Signaltransduktionsmechanismen und Effekte, die durch LPS in APZ induziert werden, und die bei der Stimulation von APZ und T-Zellen mit Hsp60 untersucht werden sollten.



**Abb. 3.14** Untersuchung der Modulation von APZ-Funktionen durch LPS und Hsp60

**links:** LPS induziert in APZ wie Makrophagen über den Rezeptorkomplex CD14/TLR4 die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B. Dies führt zu einer Freisetzung proinflammatorischer Zytokine wie IL-6, IL-12 und TNF $\alpha$  sowie zu einer gesteigerten Expression kostimulatorischer B7-Proteine auf der Zelloberfläche. Der NF- $\kappa$ B-aktivierende Signalweg verläuft über das zentrale TLR-assoziierte Adaptermolekül MyD88. TLR4 verfügt darüber hinaus über einen alternativen Signalweg, der zu einer Aktivierung von IFN-regulierenden Transkriptionsfaktoren wie IRF3 und zur Expression der Typ I-Interferone IFN $\alpha$  und IFN $\beta$  führt.

**rechts:** In den folgenden Abschnitten des Ergebnisteils sollte überprüft werden, ob Hsp60 wie LPS die Freisetzung der Zytokine IL-6, IL-12 und TNF $\alpha$  sowie die Expression kostimulatorischer B7-Moleküle in APZ stimulieren kann, und ob diese Faktoren einen Einfluss auf die durch Hsp60 gesteigerte IFN $\gamma$ -Produktion in T-Zellen besitzen. Dabei sollte auch die Funktion der Typ I-Interferone IFN $\alpha$  und IFN $\beta$  überprüft und schließlich untersucht werden, ob der TLR4-Rezeptor und der TLR-assoziierte MyD88-Signalweg, der ebenfalls von TLR2, dem zweiten putativen Hsp60-Rezeptor, verwendet wird, einen Beitrag zur Steigerung der IFN $\gamma$ -Expression in T-Zellen bei Stimulation mit Hsp60 leisten.

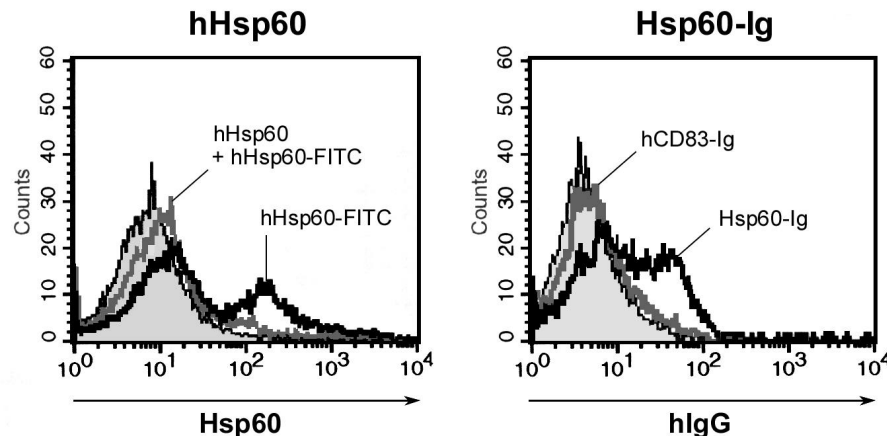


### 3.4.2 Wirkung von Hsp60 auf APZ

#### 3.4.2.1 Hsp60 bindet an peritoneale Makrophagen

Zunächst wurde überprüft, ob das hier hergestellte Hsp60-Ig-Fusionsprotein spezifisch an die Zelloberfläche von Makrophagen bindet. Dafür wurden PEC nach Blockade der Fc-Rezeptoren mit Mausserum mit Hsp60-Ig-Fusionsprotein inkubiert und anschließend mit anti-hIgG-Antikörper gefärbt. Zur Kontrolle der Spezifität der Bindung wurde daneben humanes CD83-Ig-Protein verwendet, das nicht an murine Makrophagen bindet (Cramer, 2001). Als weitere Kontrolle wurde rekombinantes humanes Hsp60-Protein, das mit dem Fluoreszenzfarbstoff FITC markiert war, eingesetzt. Hierbei wurde die Bindung des Hsp60-FITC-Proteins in einem parallelen Ansatz durch Präinkubation der Zellen mit unmarkiertem humanem Hsp60-Protein als Kompetitor blockiert, um die Spezifität der Bindung zu demonstrieren.

Abbildung 3.15 zeigt, dass sowohl das humane Hsp60 als auch das hier hergestellte Hsp60-Ig-Protein an die Oberfläche von peritonealen Makrophagen binden.



**Abb. 3.15 Hsp60 bindet an peritoneale Makrophagen**

**links:**  $2 \times 10^5$  PEC wurden in 100  $\mu$ l Medium mit 5  $\mu$ g/ml rekombinantes hHsp60-FITC dreißig Minuten auf Eis inkubiert und anschließend im Durchflusszytometer analysiert (schwarze Linie). Parallel wurde die Bindung durch Präinkubation der Zellen mit unmarkiertem hHsp60 (150  $\mu$ g/ml) dreißig Minuten auf Eis blockiert und erst hiernach Hsp60-FITC in der oben genannten Konzentration zugegeben (dunkelgraue Linie). Der hellgrau gefüllte Bereich zeigt ungefärbte PEC.

**rechts:**  $2 \times 10^5$  PEC wurden nach Blockade der Fc-Rezeptoren mit Mausserum in 100  $\mu$ l Medium mit 12  $\mu$ g/ml Hsp60-Ig (schwarze Linie) oder hCD83-Ig (dunkelgraue Linie) dreißig Minuten auf Eis inkubiert, die Zellen gewaschen und danach mit anti-hIgG gefärbt. Der hellgrau gefüllte Bereich zeigt ungefärbte PEC.

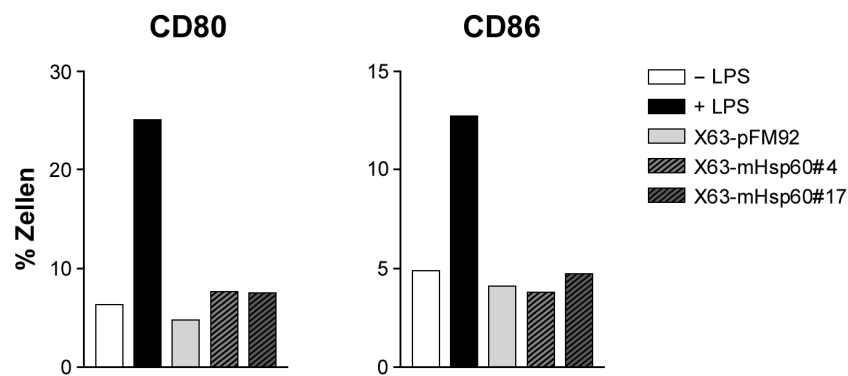
Bei Verwendung von FITC-markiertem humanen Hsp60-Protein wurden 33.8 % positive Zellen detektiert. Die Bindung konnte durch Präinkubation der Zellen mit unmarkiertem humanen Hsp60 blockiert werden und ist deshalb Hsp60-spezifisch.

Die Bindung von Hsp60-Ig-Fusionsprotein an die Zelloberfläche wurde durch spezifische Färbung des humanen Ig-Teils gemessen. Dabei wurden 24.4 % positive Zellen detektiert. Eine Kontrollfärbung von Zellen, die mit dem hCD83-Ig-Fusionsprotein inkubiert worden waren, zeigte erwartungsgemäß, dass dieses Protein nicht an die Oberfläche der Makrophagen bindet. Da der Ig-Teil beider Fusionsproteine identisch ist, kann ausgeschlossen werden, dass dieser für die Bindung von Hsp60-Ig an die Zelloberfläche der Makrophagen verantwortlich ist. Auch die Bindung des Hsp60-Ig-Fusionsproteins ist deshalb Hsp60-spezifisch.

Dieses Resultat zeigt, dass sowohl rekombinantes humanes Hsp60 als auch das hier hergestellte Hsp60-Ig-Fusionsprotein spezifisch an die Oberfläche von Makrophagen bindet.

#### **3.4.2.2 Einfluss von Hsp60 auf die Expression kostimulatorischer Moleküle auf der Zelloberfläche von PEC**

Da Hsp60 spezifisch an die Zelloberfläche von Makrophagen bindet, sollte nun untersucht werden, ob das Hitzeschockprotein einen Einfluss auf die Expression kostimulatorischer Moleküle auf der Oberfläche von Makrophagen besitzt. Dabei wurde die Expression der kostimulatorischen B7-Moleküle B7.1 (CD80) und B7.2 (CD86) betrachtet. Hierfür wurden pFM92-transfizierte Hsp60-negative oder pFM92-mHsp60-transfizierte X63-Zellen, die das membrangebundene Hsp60 exprimieren, vierundzwanzig Stunden mit peritonealen Makrophagen (PEC) koinkubiert. In einem Parallelansatz wurden PEC mit LPS stimuliert. Die Zellen wurden anschließend entnommen und die Expression von CD80 und CD86 durchflusszytometrisch analysiert. Abbildung 3.16 zeigt das Ergebnis dieser Untersuchung.



**Abb. 3.16 Hsp60 stimuliert weder die Expression von CD80 noch CD86 in PEC**

$5 \times 10^4$  Balb/c-PEC wurden allein (weiß), mit  $2 \times 10^4$  transfizierten Hsp60-negativen (X63-pFM92, hellgrau) oder mHsp60-positiven X63-Klonen (X63-mHsp60#4, X63-mHsp60#17, dunkelgrau-gestreift) beziehungsweise 100 ng/ml LPS (schwarz) 24h inkubiert. Die PEC wurden anschließend CD80- beziehungsweise CD86-spezifisch gefärbt und der prozentuale Anteil CD80- und CD86-positiver Zellen (y-Achse) im Durchflusszytometer ermittelt. Die Abbildung zeigt eines von zwei Experimenten.

Ohne weiteren Stimulus wurden 6.3% CD80-positive PEC detektiert. In Gegenwart von LPS konnte die Anzahl CD80-exprimierender Zellen auf 25.1% gesteigert werden. Im Gegensatz dazu wurden nach Koinkubation mit Hsp60-negativen wie mHsp60-positiven X63-Zellen etwa vergleichbare Mengen CD80-exprimierender PEC gefunden (5.0 %, 7.6% beziehungsweise 7.5%), die auch gegenüber unstimulierten PEC (6.3%) keine wesentliche Induktion der CD80-Expression durch Hsp60 erkennen ließen.

In unstimulierten PEC wurden daneben 4.9% CD86-exprimierende PEC detektiert, deren Anteil nach Stimulation mit LPS auf 12.72% gesteigert wurde. Die Expression dieses Moleküls wird dagegen in Gegenwart von mHsp60 auf der Zelloberfläche von X63-Zellen (3.8% bzw. 4.7%) im Vergleich mit Hsp60-negativen Kontrollkulturen (4.0%) nicht gesteigert.

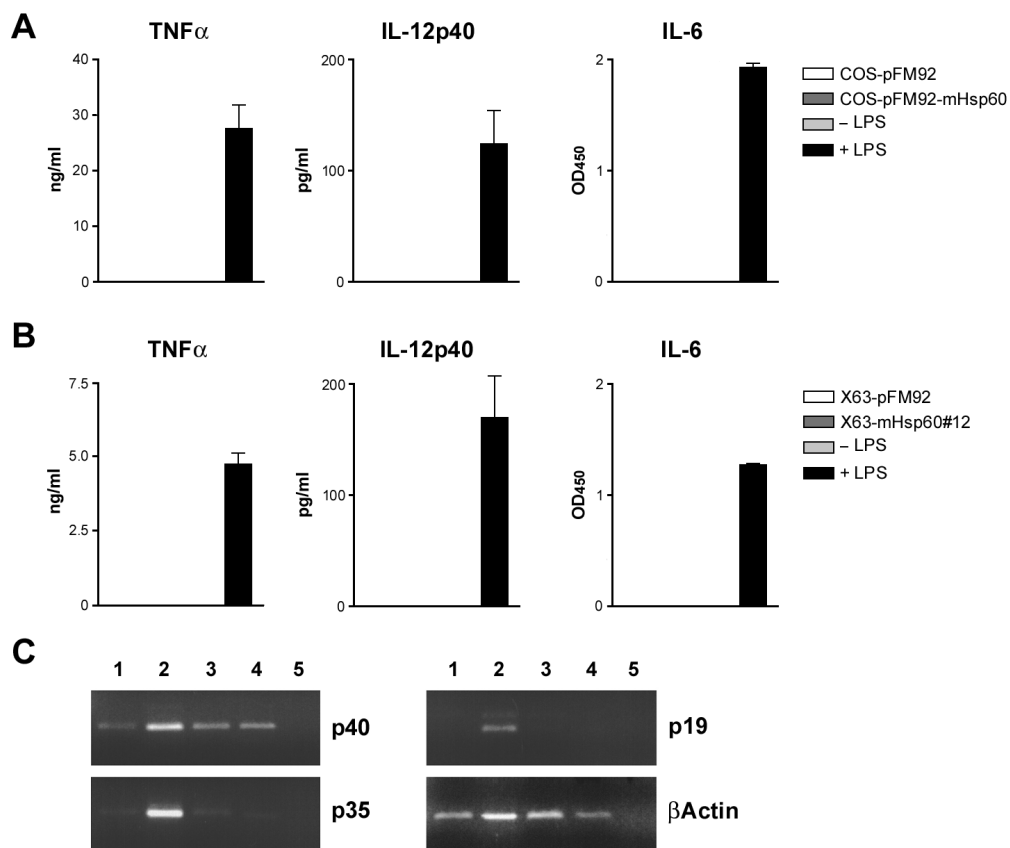
Dieses Resultat zeigt, dass Hsp60, im Gegensatz zu LPS, in Makrophagen weder die Oberflächenexpression des kostimulatorischen CD80 (B7.1)- noch CD86 (B7.2)-Moleküls induziert.

### 3.4.2.3 Hsp60 aktiviert in Makrophagen nicht die Produktion von IL-6, IL-12 und TNF $\alpha$

Im Folgenden wurde untersucht, welche löslichen, von Makrophagen produzierten Faktoren, eine Rolle bei der Hsp60-verstärkten IFN $\gamma$ -Produktion spielen könnten. Es wurde beschrieben, dass die durch Hsp60-induzierte Aktivierung von Makrophagen wie die von LPS abhängig ist von der Signaltransduktion durch TLR4 (Ohashi et al., 2000; Vabulas et al., 2001). Da das Engagement des TLR4 in Makrophagen unter anderem zu einer gesteigerten Produktion von TNF $\alpha$ , IL-6 und IL-12, dem wichtigsten Induktor einer IFN $\gamma$ -Antwort in T-Zellen, führt (Übersicht bei Imler und Hoffmann, 2003; Sabroe et al., 2003), wurde nun die Expression dieser Zytokine nach Stimulation von Makrophagen in Gegenwart Hsp60-exprimierender und Hsp60-negativer COS1- und X63-Zellen untersucht.

Dafür wurden zunächst Zellen der Makrophagenlinie RAW264.7 mit mHsp60-positiven und Hsp60-negativen COS1- und X63-Zellen vierundzwanzig Stunden koinkubiert und die genannten Zytokine im Kulturüberstand durch spezifische ELISA quantifiziert. Für den Nachweis von IL-12 im Kulturüberstand wurde dabei ein ELISA verwendet, der die p40-Untereinheit dieses Zytokins detektiert. Zum Vergleich wurde parallel stets die Stimulation durch LPS untersucht (Abb. 3.17-A und -B).

Darüber hinaus wurde die Expression der beiden Untereinheiten des IL-12, p35 und p40, in PEC nach Inkubation mit mHsp60-positiven oder negativen COS1-Zellen beziehungsweise nach Stimulation mit LPS mit Hilfe eines spezifischen PCR-Nachweises untersucht (Abb. 3.17-C). Außerdem wurde ebenfalls die Expression eines weiteren Moleküls, p19, untersucht (Abb. 3.17-C), welches der p35-Untereinheit von IL-12 strukturell verwandt ist (Oppmann et al., 2000) und zusammen mit der IL-12p40-Untereinheit ein weiteres funktionelles Zytokin, IL-23, bildet (Übersicht bei Langrish et al., 2004). Die Expression von IL-23 wird ebenfalls durch TLR4 und auch TLR2 induziert (Strominger et al., 2001; Langrish et al., 2004).



**Abb. 3.17 Hsp60 induziert nicht die Expression von IL-6, IL-12 und TNF $\alpha$  in Makrophagen**

**A)**  $1 \times 10^5$  RAW264.7-Makrophagen wurden 24h mit  $2 \times 10^4$  transfizierten Hsp60-negativen (COS-pFM92, weiß) oder mHsp60-positiven COS1-Zellen (COS-pFM92-mHsp60, dunkelgrau) beziehungsweise 100 ng/ml LPS (schwarz) kultiviert und die Freisetzung der Zytokine IL-6, IL-12 und TNF $\alpha$  mit Hilfe des ELISA im Kulturüberstand nachgewiesen (y-Achse). Dargestellt sind die Mittelwerte und SEM von Triplikaten.

**B)** In einem Parallelexperiment wurden neben LPS (100 ng/ml, schwarz) anstelle von COS1-Zellen Hsp60-negative (X63-pFM92, weiß) und mHsp60-positiv X63-Zellen (X63-mHsp60#12, dunkelgrau) eingesetzt und die Zytokine IL-6, IL-12 und TNF $\alpha$  im Kulturüberstand quantifiziert (y-Achse). Dargestellt sind die Mittelwerte und SEM von Triplikaten.

**C)** Die Abbildung zeigt den PCR-Nachweis der Expression der IL-12-Untereinheiten p40 und p35 sowie der p19-Kette, die zusammen mit der p40-Untereinheit von IL-12 das Zytokin IL-23 bildet.  $1 \times 10^5$  PEC wurden 24h mit LPS (Spur 2) oder  $2 \times 10^4$  Hsp60-negativen COS1- (Spur 3) beziehungsweise mHsp60-exprimierenden COS1-Zellen (Spur 4) koinkubiert. Anschließend wurde cDNA präpariert und für den PCR-Nachweis eingesetzt. Spur 1 zeigt unstimulierte PEC und Spur 5 eine Kontrolle der PCR, bei der anstelle von cDNA H<sub>2</sub>O eingesetzt wurde. Die Qualität der aus den PEC präparierten cDNA wurde mit Hilfe einer  $\beta$ -Actin-spezifischen PCR überprüft.

Im Gegensatz zu einer Stimulation mit LPS konnten im Kulturüberstand von RAW264.7-Makrophagen, die mit mHsp60-positiven oder negativen COS1-beziehungsweise X63-Zellen koinkubiert worden waren, die Zytokine IL-6, IL-12 und TNF $\alpha$  nicht nachgewiesen werden (Abb. 3.17-A und -B). Die Expression dieser Zytokine wurde auch in Gegenwart von Hsp60-Ig-sekretierenden COS1-Zellen nicht induziert (Daten nicht gezeigt). Vergleichbare Ergebnisse wurden auch bei Stimulation von PEC erhalten (Daten nicht gezeigt).

Darüber hinaus konnte mit Hilfe der PCR von cDNA, die durch reverse Transkription von mRNA aus PEC nach Stimulation mit LPS oder nach Koinkubation mit Hsp60-negativen oder mHsp60-positiven COS1-Zellen generiert wurde, gezeigt werden, dass membrangebundenes Hsp60 weder die mRNA-Expression der p40- noch der p35-Untereinheit von IL-12 induziert. Auch die mRNA-Expression der p19-Kette des IL-23 wird in Gegenwart von membranverankertem Hsp60 auf der Zelloberfläche nicht gesteigert (Abb. 3.17-C). Im Gegensatz dazu ist bei Stimulation mit LPS eine gesteigerte mRNA-Expression sowohl der IL-12-Untereinheiten p35 und p40 als auch der IL-23-Untereinheit p19 im Vergleich mit unstimulierten Zellen, aber auch PEC, die mit mHsp60-negativen oder -positiven COS1 inkubiert worden waren, erkennbar.

Die Kontrollstimulationen mit LPS belegen, dass sowohl die RAW264.7-Makrophagen als auch die PEC, die für diesen Test eingesetzt wurden, die untersuchten Zytokine infolge eines entsprechenden Stimulus prinzipiell exprimieren können.

Diese Ergebnisse zeigen, dass das auf der Oberfläche von COS1- und X63-Zellen exprimierte Hsp60-Protein, das im T-Zellaktivierungstest biologisch aktiv war und eine Steigerung der IFN $\gamma$ -Produktion induzieren konnte, in Makrophagen weder die Produktion von messbaren Mengen der Zytokine IL-6, IL-12 und TNF $\alpha$  stimuliert, noch die mRNA-Expression der IL-12- und IL-23-Untereinheiten aktiviert.

#### **3.4.2.4 Bedeutung von IL-6, IL-12 und TNF $\alpha$ bei der Hsp60-vermittelten Verstärkung der IFN $\gamma$ -Produktion in T-Zellen**

Obwohl in Makrophagen keine messbare Expressionssteigerung der Zytokine IL-6, IL-12 und TNF $\alpha$  durch Hsp60 nachgewiesen werden konnte, könnten geringe Mengen dieser Zytokine produziert werden, die aber unterhalb der Nachweisgrenze eines ELISA liegen. Bei der T-Zellaktivierung könnten diese Zytokine trotz niedriger Konzentration im engen Kontakt von APZ und T-Zelle in der immunologischen Synapse (Kupfer et

al., 2003) biologisch aktiv sein und einen Einfluss auf die T-Zellaktivierung ausüben. Denkbar ist außerdem, dass von T-Zellen produzierte Zytokine wie IFN $\gamma$  in einem positiven Rückkopplungsmechanismus auf die APZ einwirken und die Expression von IL-6, IL-12 oder TNF $\alpha$  stimulieren. Deshalb sollte die Frage beantwortet werden, ob die genannten Faktoren bei der Hsp60-vermittelten T-Zellaktivierung eine Rolle spielen. Hierfür wurden Stimulationsexperimente durchgeführt, bei denen die biologische Aktivität dieser Zytokine durch spezifische Antikörper neutralisiert wurde.

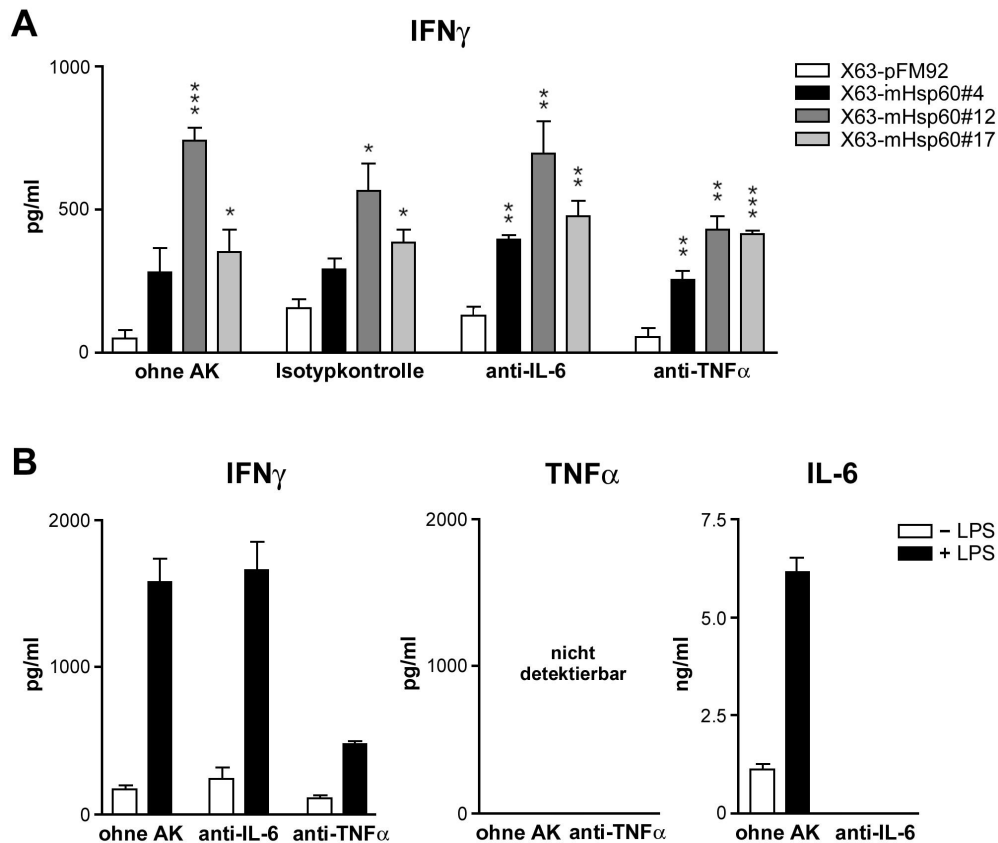
Zunächst wurde der Einfluss der Blockade von TNF $\alpha$  und IL-6 auf die Stimulation von DO11.10-T-Zellen mit OVA-Peptidantigen in Gegenwart von APZ und Hsp60-präsentierenden oder Hsp60-negativen X63-Zellklonen untersucht. In Abbildung 3.18 ist das typische Ergebnis eines solchen Experimentes dargestellt.

Das Experiment zeigt, dass die Blockade der Zytokine IL-6 und TNF $\alpha$  keinen Einfluss auf die Steigerung der IFN $\gamma$ -Produktion in T-Zellen durch Hsp60 hatte. Alle drei mHsp60-exprimierenden Zellklone, die bei diesen Experimenten eingesetzt wurden, konnten unabhängig von IL-6 und TNF $\alpha$  eine IFN $\gamma$ -Antwort in T-Zellen stimulieren.

Im Gegensatz dazu konnte die LPS-induzierte IFN $\gamma$ -Sekretion in Gegenwart von blockierendem anti-TNF $\alpha$ -Antikörper deutlich reduziert werden, während die Blockade von IL-6 keinen Einfluss auf die durch LPS stimulierte IFN $\gamma$ -Produktion hatte.

Die Neutralisation der Zytokine wurde durch spezifische ELISA nach achtundvierzig Stunden überprüft. Dabei wurde erwartungsgemäß in Abwesenheit des neutralisierenden anti-IL-6-Antikörpers eine Induktion der IL-6-Produktion durch LPS beobachtet. In Gegenwart des inhibierenden anti-IL-6-Antikörpers war das Zytokin im Kulturüberstand jedoch nicht mehr nachweisbar. Es kann deshalb davon ausgegangen werden, dass dieser Antikörper in der eingesetzten Konzentration die biologische Funktion von IL-6 im Experiment vollständig inhibieren konnte. TNF $\alpha$  war zu diesem Zeitpunkt auch ohne Blockade durch anti-TNF $\alpha$ -Antikörper im Kulturüberstand nicht mehr nachweisbar. Da jedoch die LPS-induzierte IFN $\gamma$ -Produktion in Gegenwart dieses Antikörpers drastisch reduziert wurde, ist davon auszugehen, dass auch dieser Antikörper in der hier eingesetzten Konzentration von 2  $\mu$ g/ml die biologische Aktivität von TNF $\alpha$  im Testsystem blockieren konnte. Zudem wurde die neutralisierende Wirkung des anti-TNF $\alpha$ -Antikörpers bei der Stimulation von Makrophagen durch LPS zuvor überprüft. In diesem vorangegangenen Experiment konnte bereits eine

Konzentration von 1 µg/ml anti-TNFα die durch 1 µg/ml LPS induzierte TNFα-Produktion vollständig blockieren (Daten nicht gezeigt).



**Abb. 3.18 Hsp60 induziert die Produktion von IFN $\gamma$  unabhängig von IL-6 und TNF $\alpha$**

**A)**  $5 \times 10^4$  MHC II<sup>+</sup>-depletierte DO11.10-Milzzellen wurden 24h in Gegenwart von  $1 \times 10^5$  PEC als APZ und  $5 \times 10^4$  Hsp60-negativen X63 (weiß) beziehungsweise drei Hsp60-positiven Zellklonen (X63-mHsp60#4 (schwarz), #12 (dunkelgrau), #17 (hellgrau) mit 1 µg/ml OVA-Peptid aktiviert und dabei die Funktion von IL-6 und TNF $\alpha$  durch blockierende Antikörper inhibiert. Daneben wurde eine Antikörper-Isotypkontrolle (anti-IgG2A) sowie eine Kontrollstimulation ohne Antikörper (ohne AK) mitgeführt. Alle Antikörper wurden in einer Konzentration von 2 µg/ml eingesetzt. IFN $\gamma$  wurde im Anschluss mit Hilfe des ELISA im Kulturüberstand quantifiziert (y-Achse). Die Abbildung zeigt eines von drei voneinander unabhängigen Experimenten. Dargestellt sind die Mittelwerte von Triplikaten und SEM. Sternchen repräsentieren die Signifikanz der Hsp60-induzierten Steigerung der IFN $\gamma$ -Produktion. Sie wurde mit dem Students-t-Test (unpaired, two-tailed) ermittelt. \* p<0.05, \*\* p<0.005, \*\*\* p<0.0005

**B)** Zur Kontrolle wurden  $5 \times 10^4$  MHC II<sup>+</sup>-depletierte DO11.10-Milzzellen mit  $1 \times 10^5$  PEC in Gegenwart von 1 µg/ml LPS, 1 µg/ml OVA-Peptid und mit oder ohne die angezeigten Antikörper stimuliert. Im Kulturüberstand wurde IFN $\gamma$  nach 24h und TNF $\alpha$  und IL-6 nach 48h quantifiziert (y-Achse). Dargestellt sind die Mittelwerte von Triplikaten und SEM.



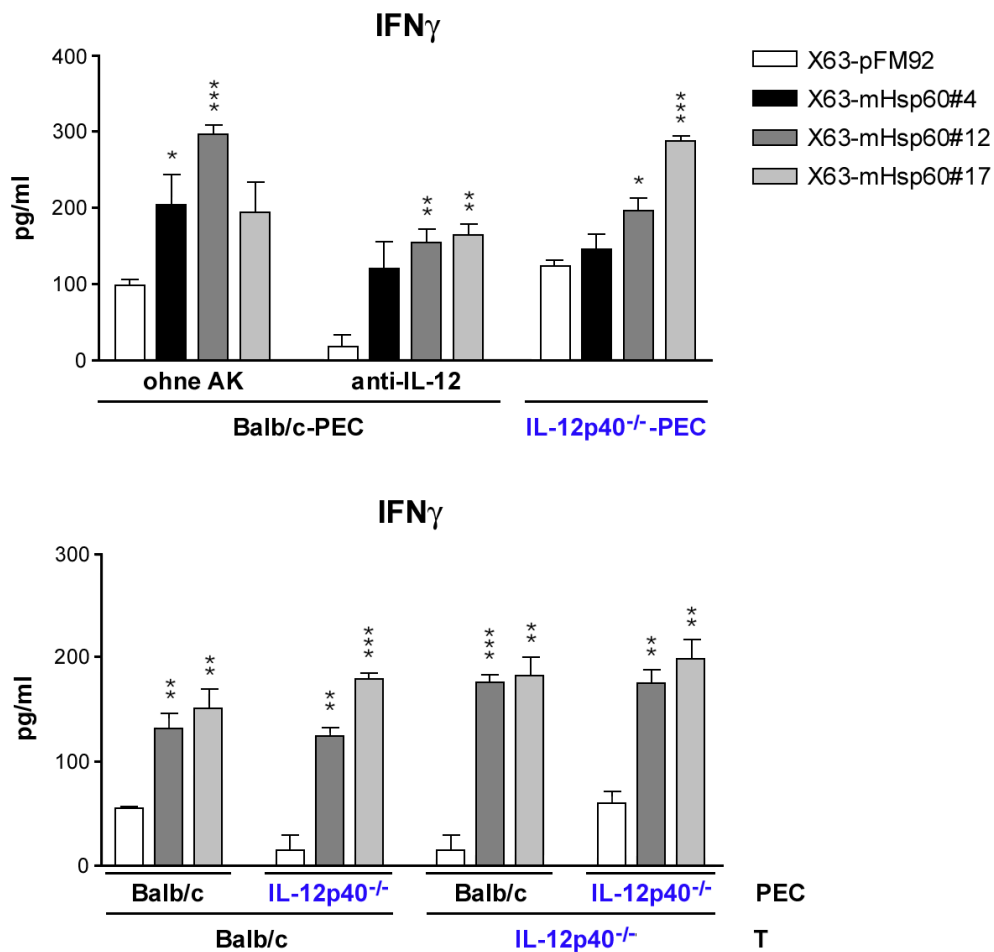
Dieses Experiment zeigt, dass die Zytokine IL-6 und TNF $\alpha$  für die Steigerung der IFN $\gamma$ -Produktion durch Hsp60 entbehrlich sind. Im Gegensatz hierzu ist die LPS-induzierte IFN $\gamma$ -Antwort von TNF $\alpha$  abhängig.

Da für die Induktion von IFN $\gamma$  in T-Zellen IL-12 eine besonders wichtige Funktion besitzt, wurde nun untersucht, ob die Neutralisation dieses Zytokins durch einen Antikörper, der die p40-Untereinheit von IL-12 bindet, einen Einfluss auf die durch Hsp60 verstärkte T-Zellantwort hat. Darüber hinaus wurden auch peritoneale Makrophagen, die aus Balb/c-IL-12p40-Knockout-Mäusen (IL-12p40<sup>-/-</sup>) gewonnen wurden, eingesetzt. Die Zellen dieser Mäuse produzieren aufgrund der Deletion des für die p40-Untereinheit kodierenden Gens weder das funktionelle IL-12p70-Zytokin noch IL-23.

DO11.10-T-Zellen wurden für diese Untersuchungen mit Balb/c-PEC ohne und mit Zusatz von 2  $\mu$ g/ml neutralisierendem anti-IL-12p40-Antikörper oder mit IL-12p40<sup>-/-</sup>-PEC in Gegenwart von Hsp60-negativen und mHsp60-positiven X63-Zellen antigenabhängig stimuliert (Abb. 3.19, oben). Parallel wurde auch hier die Stimulation der T-Zellantwort in Gegenwart von LPS untersucht (Abb. 3.20, links) und die Inhibition von IL-12 durch Nachweis der p40-Untereinheit des Zytokins mit Hilfe des ELISA überprüft (Abb. 3.20, rechts).

Um eine Beteiligung von IL-12 bei der T-Zellaktivierung vollständig ausschließen zu können, wurden außerdem in einem weiteren Testansatz IL-12p40<sup>-/-</sup>-T-Zellen in Gegenwart von IL-12p40<sup>-/-</sup>-PEC und Hsp60-präsentierenden oder negativen X63-Zellklonen mit anti-CD3 stimuliert (Abb. 3.19, unten).

Das Ergebnis dieser Untersuchungen zeigt, dass die Gegenwart von Hsp60 auf der Zelloberfläche von X63-Zellen im Vergleich mit Hsp60-negativen Kontrollzellen bei der antigenabhängigen T-Zellaktivierung eine Steigerung der IFN $\gamma$ -Produktion nicht nur in Gegenwart eines neutralisierenden IL-12-spezifischen Antikörpers, sondern auch bei Einsatz von PEC aus IL-12p40<sup>-/-</sup>-Mäusen stimulieren konnte, auch wenn hier möglicherweise der Effekt etwas schwächer ausfiel (Abb. 3.19, oben).



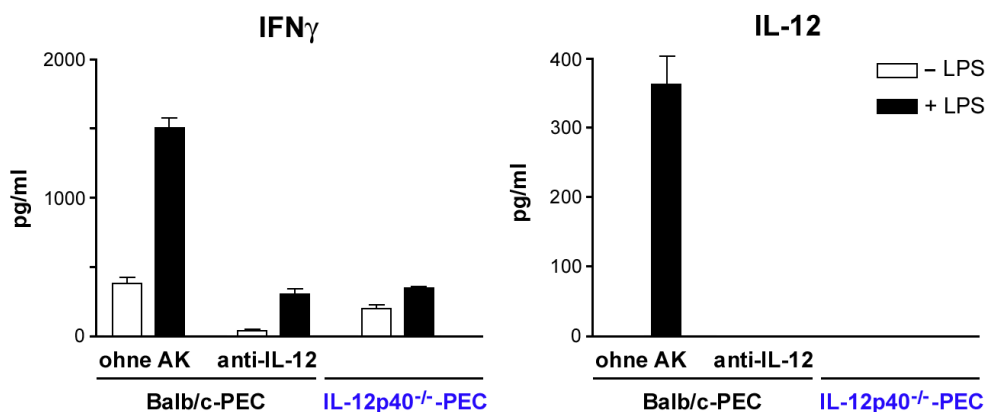
**Abb. 3.19 Die Hsp60-induzierte IFN $\gamma$ -Produktion ist unabhängig von IL-12p40**

**oben:**  $5 \times 10^4$  MHC II<sup>+</sup>-depletierte DO11.10-Milzzellen wurden in Gegenwart von  $5 \times 10^4$  Balb/c- oder IL-12p40<sup>-/-</sup>-PEC und  $5 \times 10^4$  Hsp60-negativen X63 (X63-pFM92, weiß) oder mHsp60-positiven X63-Zellklonen (X63-mHsp60#4 (schwarz), #12 (dunkelgrau), #17 (hellgrau)) 24h mit 1  $\mu$ g/ml OVA-Peptid stimuliert. Bei Verwendung von Balb/c-PEC wurde außerdem neben der Kontrolle ohne Antikörper (ohne AK) 2  $\mu$ g/ml anti-IL-12p40 zugesetzt. IFN $\gamma$  wurde mit Hilfe des ELISA im Kulturüberstand quantifiziert (y-Achse). **unten:**  $1 \times 10^5$  Pan T cell kit-gereinigte T-Zellen aus der Milz von Balb/c- oder IL-12p40<sup>-/-</sup>-Mäusen wurden in Gegenwart von  $1 \times 10^4$  Balb/c- oder IL-12p40<sup>-/-</sup>-PEC sowie Hsp60-negativen (weiß) oder mHsp60-positiven X63-Zellen (X63-mHsp60#12 (dunkelgrau), #17 (hellgrau)) mit 0.3  $\mu$ g/ml anti-CD3 stimuliert und IFN $\gamma$  nach 24h im Kulturüberstand quantifiziert (y-Achse). Gezeigt ist je eines von drei Experimenten. Dargestellt sind die Mittelwerte und SEM von Triplikaten. Sternchen symbolisieren die Signifikanz der durch Hsp60 induzierten Steigerung der IFN $\gamma$ -Produktion, die mit dem Students-t-Test (unpaired, two-tailed) ermittelt wurde. \*\* p0.005, \*\*\* p<0.0005

Dieses Resultat wird durch das in Abb. 3.19 (unten) gezeigte Experiment, bei dem alle möglichen Kombinationen von Balb/c- und IL-12p40<sup>-/-</sup>-PEC und -T-Zellen in einer

Stimulation mit anti-CD3 untersucht wurden, bestätigt. Insbesondere die durch membrangebundenes Hsp60 auf der Zelloberfläche von X63-Zellen stimulierte IFN $\gamma$ -Freisetzung bei Einsatz von IL-12p40<sup>-/-</sup>-APZ und IL-12p40<sup>-/-</sup>-T-Zellen verdeutlicht, dass für diesen Hsp60-vermittelten Effekt IL-12 entbehrlich ist. Da IL-12p40<sup>-/-</sup>-Zellen ebenfalls kein funktionelles IL-23 produzieren können, zeigt dieses Experiment außerdem, dass auch dieses Zytokin bei der Hsp60-induzierten Steigerung der IFN $\gamma$ -Produktion keine wesentliche Rolle spielt.

Im Gegensatz zur Stimulation der IFN $\gamma$ -Freisetzung durch mHsp60 ist die Stimulation der IFN $\gamma$ -Produktion in T-Zellen durch LPS (Abb. 3.20, links) abhängig von IL-12p40. Die LPS-induzierte IFN $\gamma$ -Sekretion wurde durch den neutralisierenden IL-12p40-spezifischen Antikörpers erheblich reduziert, und bei Einsatz von IL-12p40<sup>-/-</sup>-PEC als APZ ist kaum noch ein kostimulatorischer Effekt durch LPS zu beobachten.



**Abb. 3.20 Die LPS-induzierte IFN $\gamma$ -Produktion ist abhängig von IL-12p40**

Analog zu Abb.3.19 (oben) wurden  $1 \times 10^5$  MHC II<sup>+</sup>-depletierte DO11.10-Milzzellen mit 1  $\mu$ g/ml OVA-Peptid ohne Zusatz (weiß) oder mit 1  $\mu$ g/ml LPS (schwarz) stimuliert. IL-12 wurde mit 2  $\mu$ g/ml anti-IL-12p40 blockiert oder IL-12p40<sup>-/-</sup>-PEC eingesetzt und eine Kontrolle ohne Antikörper (ohne AK) mitgeführt. IFN $\gamma$  wurde nach 24h im Kulturüberstand quantifiziert (y-Achse) (links). Die Neutralisation von IL-12 wurde durch den Nachweis des Zytokins nach 48h (rechts) im ELISA überprüft (y-Achse).

Die Qualität der IL-12-Blockade sowie des IL-12p40-Knockouts wurde durch Nachweis von IL-12p40 im ELISA analysiert (Abb. 3.20, rechts). Hierbei konnte IL-12 ausschließlich im Kulturüberstand von Zellen, die Balb/c-PEC enthielten und mit LPS

stimuliert worden waren, nachgewiesen werden, nicht aber in Kulturen, die IL-12p40<sup>-/-</sup>-PEC enthielten, oder in denen das Zytokin durch anti-IL-12-Antikörper blockiert wurde. Es kann deshalb davon ausgegangen werden, dass dieser Antikörper in der eingesetzten Konzentration eine nahezu vollständige Blockade der biologischen Funktion dieses Zytokins gewährleistet.

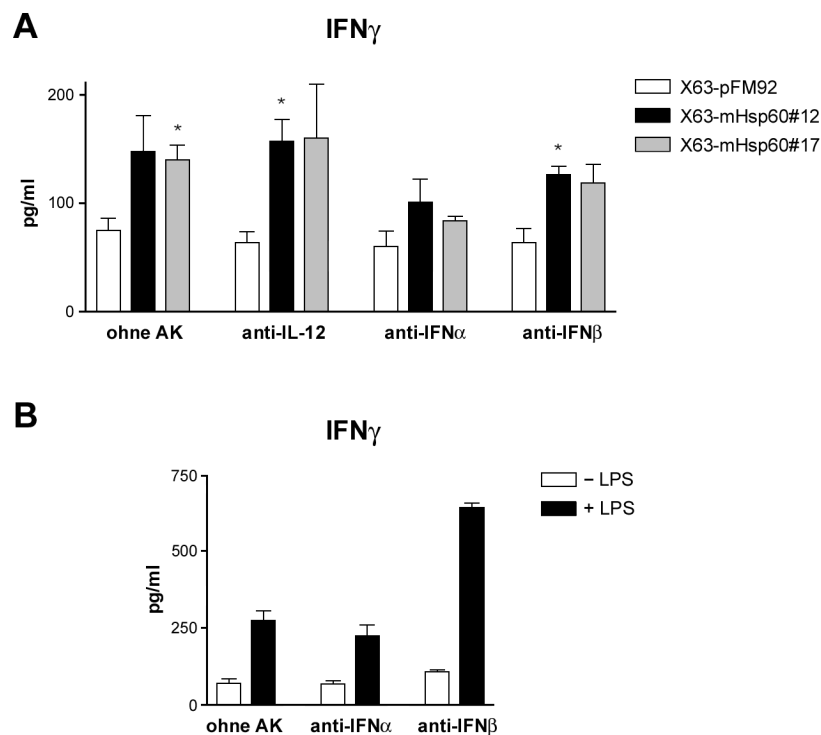
Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse, dass im Gegensatz zur LPS-induzierten IFN $\gamma$ -Produktion die Zytokine IL-12 und auch IL-23 für die IFN $\gamma$ -Freisetzung durch T-Zellen bei Stimulation mit Hsp60 nicht erforderlich sind. Auch IL-6 und TNF $\alpha$  sind an der kostimulatorischen Wirkung von Hsp60 auf die T-Zellaktivität nicht maßgeblich beteiligt.

#### **3.4.2.5 Rolle der Typ I-Interferone IFN $\alpha$ und IFN $\beta$ bei der Hsp60-vermittelten Steigerung der IFN $\gamma$ -Produktion in T-Zellen**

Neben Zytokinen wie IL-12 und TNF $\alpha$  ist auch die Produktion der Typ I-Interferone IFN $\alpha$  und IFN $\beta$  ein frühes Ereignis in der angeborenen Immunantwort. Sie wird ebenfalls durch den TLR4 induziert (Übersicht bei Barton und Medzhitov, 2003). Eine bekannte Funktion dieser Zytokine ist die Induktion der IFN $\gamma$ -Produktion in dendritischen Zellen und T-Zellen (Brinkmann et al., 1993; Cousens et al., 1999; Montoya et al., 2002; Santiago-Raber et al., 2003). Deshalb sollte nun die Rolle dieser Zytokine bei der Hsp60-vermittelten Steigerung der IFN $\gamma$ -Produktion in T-Zellen untersucht werden. Hierfür wurden DO11.10-T-Zellen in Gegenwart von mHsp60-positiven oder Hsp60-negativen X63-Zellen und neutralisierenden IFN $\alpha$ - und IFN $\beta$ -spezifischen Antikörpern mit OVA-Peptidantigen stimuliert. Kontrollkulturen enthielten entweder keinen Antikörper oder neutralisierenden anti-IL-12-Antikörper. Abbildung 3.21-A zeigt das Ergebnis eines solchen Experimentes.

Wie zuvor gezeigt, hatte die Blockade des Zytokins IL-12 keinen Einfluss auf die Hsp60-induzierte IFN $\gamma$ -Produktion. Eine Steigerung der IFN $\gamma$ -Freisetzung durch zwei mHsp60-exprimierende X63-Klone gegenüber Hsp60-negativen X63-Zellen wurde sowohl ohne blockierende Antikörper als bei Neutralisation von IL-12 beobachtet. Die Gegenwart von mHsp60-positiven Zellen führte hier etwa zu einer Verdopplung der IFN $\gamma$ -Konzentration im Kulturüberstand. Im Gegensatz hierzu war insbesondere bei Neutralisation von IFN $\alpha$ , aber auch IFN $\beta$ , im Vergleich mit den Kontrollkulturen die Steigerung der IFN $\gamma$ -Produktion schwächer ausgeprägt. Bei Blockade von IFN $\alpha$  konnte

durch die Gegenwart von Hsp60 die Konzentration von IFN $\gamma$  nur um etwa ein Drittel angehoben werden. Dieses Resultat weist auf eine mögliche Beteiligung der Typ I-Interferone, insbesondere von IFN $\alpha$ , bei der Steigerung der IFN $\gamma$ -Produktion durch Hsp60 hin.



**Abb. 3.21 Neutralisation der Typ I-Interferone IFN $\alpha$  und IFN $\beta$  bei der T-Zellaktivierung in Gegenwart von Hsp60**

**A)**  $1 \times 10^5$  Pan T cell kit-gereinigte DO11.10-T-Zellen wurden in Gegenwart von  $2 \times 10^4$  Balb/c-PEC und  $2 \times 10^4$  Hsp60-negativen (X63-pFM92, weiß) oder mHsp60-positiven X63-Zellen (X63-mHsp60#12, schwarz; X63-mHsp60#17, grau) ohne Antikörper (ohne AK), mit anti-IL-12 (2  $\mu$ g/ml), anti-IFN $\alpha$  (10  $\mu$ g/ml) oder anti-IFN $\beta$  (3.38 kU/ml) mit 1  $\mu$ g/ml OVA-Peptid stimuliert und IFN $\gamma$  nach 48h im Kulturüberstand quantifiziert (y-Achse). Das gezeigte Ergebnis ist repräsentativ für zwei Experimente. Dargestellt sind die Mittelwerte und SEM von Triplikaten. Die Signifikanz der Hsp60-induzierten Steigerung der IFN $\gamma$ -Produktion ist durch Sternchen symbolisiert und wurde mit dem Students-t-Test (unpaired, two-tailed) ermittelt. \* $p < 0.05$

**B)** Analog wurden  $1 \times 10^5$  DO11.10-T-Zellen mit 1  $\mu$ g/ml OVA-Peptid ohne LPS (weiß) und mit 1  $\mu$ g/ml LPS (schwarz) stimuliert und IFN $\gamma$  nach 48h im Kulturüberstand quantifiziert (y-Achse).

Kontrollexperimente, in denen die Zellen mit LPS stimuliert wurden (Abb. 3.21, B), zeigten, dass die Inhibition von IFN $\alpha$  und IFN $\beta$  keinen Einfluss auf die Induktion von IFN $\gamma$  durch LPS hatte. Da keine IFN $\alpha$ - und IFN $\beta$ -spezifischen ELISA zur Verfügung standen, konnte die Neutralisation dieser Zytokine durch die blockierenden Antikörper nicht wie bei den in Abbildung 3.18 bis 3.20 gezeigten Experimenten kontrolliert werden. Die Bedingungen für die Blockade dieser Zytokine wurden entsprechend der persönlichen Mitteilung von Thorsten Lieke (Bernhard-Nocht-Institut für Tropenmedizin) gewählt.

### **3.4.3 Welche Rolle spielen TLR4 und TLR-assoziierte Signaltransduktionsmechanismen?**

Im vorangegangenen Abschnitt des Ergebnisteils dieser Arbeit wurden einige Hinweise darauf gefunden, dass die biologische Aktivität des CD14/TLR4-Liganden LPS und des putativen CD14/TLR4-Liganden Hsp60 sich unterscheidet. Es wurde gezeigt, dass Hsp60, im Gegensatz zu LPS, in Makrophagen weder die Expression von TNF $\alpha$ , IL-6 und IL-12 induziert, noch spielen diese Zytokine bei der Hsp60-vermittelten IFN $\gamma$ -Antwort in T-Zellen eine wesentliche Rolle. Deshalb lag der Verdacht nahe, dass der immunstimulatorische Effekt von Hsp60 möglicherweise nicht wie bei LPS über TLR4 als signalgebenden Rezeptor vermittelt wird.

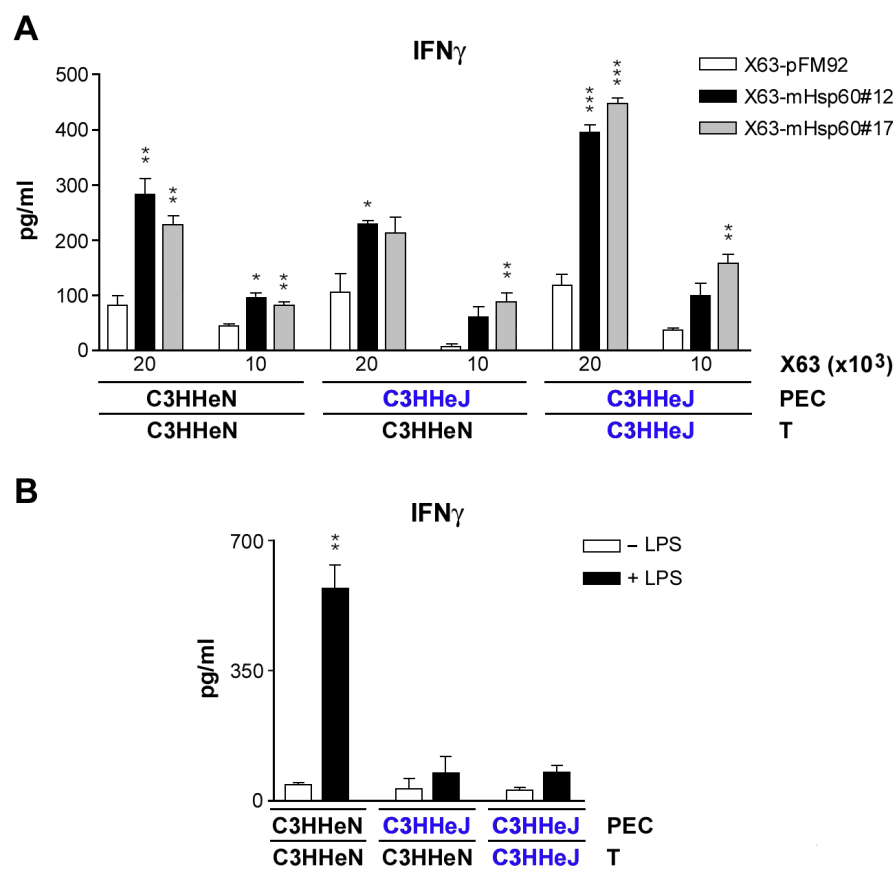
Im folgenden Abschnitt sollte deshalb geprüft werden, ob TLR4 für die immunstimulatorische Aktivität des Hsp60-Proteins von Bedeutung ist. Ferner sollte untersucht werden, ob das zentrale TLR-assoziierte intrazelluläre Adaptermolekül MyD88 (*myeloid differentiation factor 88*) an der Hsp60-induzierten Signaltransduktion beteiligt ist.

#### **3.4.3.1 Rolle von TLR4 bei der Hsp60 induzierten IFN $\gamma$ -Antwort**

Für die Analyse der Beteiligung von TLR4 an der Hsp60-vermittelten Stimulation wurden PEC und T-Zellen aus C3HHeN- und C3HHeJ-Mäusen verwendet. Letztere besitzen eine Punktmutation im TLR4-kodierenden Gen, die zu einem Aminosäureaustausch in der zytoplasmatischen Domäne des Rezeptors führt. Der TLR4-Rezeptor dieser Tiere ist deshalb nicht funktionell (Poltorak et al., 1998). PEC und T-Zellen aus C3HHeN- und C3HHeJ-Mäusen wurden für die

Stimulationsexperimente wechselseitig kombiniert und in Gegenwart von mHsp60-positiven und Hsp60-negativen X63-Zellen mit anti-CD3 stimuliert.

Das Ergebnis dieser Experimente ist in Abbildung 3.22-A dargestellt. Es zeigt, dass X63-Zellen, die das Hsp60-Protein auf ihrer Oberfläche präsentieren, im Vergleich mit Hsp60-negativen X63-Zellen sowohl bei Verwendung von C3HHeN-PEC wie auch C3HHeJ-PEC, die keinen funktionellen TLR4 exprimieren, in derselben C3HHeN-T-Zellpräparation die durch das TCR-Engagement induzierte IFN $\gamma$ -Antwort verstärkten.



**Abb. 3.22 Die Induktion von IFN $\gamma$  durch Hsp60 ist unabhängig von TLR4**

**A)**  $1 \times 10^5$  Pan T cell kit-gereinigte T-Zellen aus C3HHeN- bzw. C3HHeJ-Mäusen wurden in Gegenwart von  $5 \times 10^4$  PEC aus C3HHeN- bzw. C3HHeJ-Mäusen und  $2 \times 10^4$  bzw.  $1 \times 10^4$  Hsp60-negativen (X63-pFM92, weiß) oder mHsp60-positiven X63-Klonen (X63-mHsp60#12, schwarz; X63-mHsp60#17, grau) mit 0.1  $\mu$ g/ml anti-CD3 stimuliert. IFN $\gamma$  wurde nach 24h im Kulturüberstand mit Hilfe des ELISA quantifiziert. Gezeigt ist eines von drei unabhängigen Experimenten. Dargestellt sind die Mittelwerte und SEM von Triplikaten. Sternchen symbolisieren die Signifikanz der durch Hsp60-induzierten Steigerung der IFN $\gamma$ -Produktion. Sie wurde mit dem Students-t-Test (unpaired, two-tailed) ermittelt. \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.005$ , \*\*\*  $p < 0.0005$   
**B)** Gezeigt ist eine Kontrollstimulation der genannten C3HHeN- und C3HHeJ-Zellen mit 0.3  $\mu$ g/ml anti-CD3 ohne (weiß) und mit 1  $\mu$ g/ml LPS (schwarz).

Darüber hinaus war ebenfalls eine Steigerung der IFN $\gamma$ -Produktion bei Kombination von C3HHeJ-PEC mit C3HHEJ-T-Zellen zu beobachten. In dieser Situation ist eine Kontamination mit APZ, die einen funktionellen TLR4 exprimieren und möglicherweise in der C3HHeN-T-Zellpräparation zur Stimulation beitragen, vollständig ausgeschlossen. Im Gegensatz dazu stimulierte LPS erwartungsgemäß ausschließlich in Gegenwart von C3HHeN-PEC, nicht aber bei Einsatz von TLR4-defekten C3HHeJ-PEC als APZ, die IFN $\gamma$ -Produktion in T-Zellen (Abb. 3.22-B).

Zusammenfassend zeigt dieses Experiment, dass Hsp60 im Gegensatz zu LPS eine Steigerung der IFN $\gamma$ -Produktion in T-Zellen unabhängig von funktionellem TLR4 vermitteln kann.

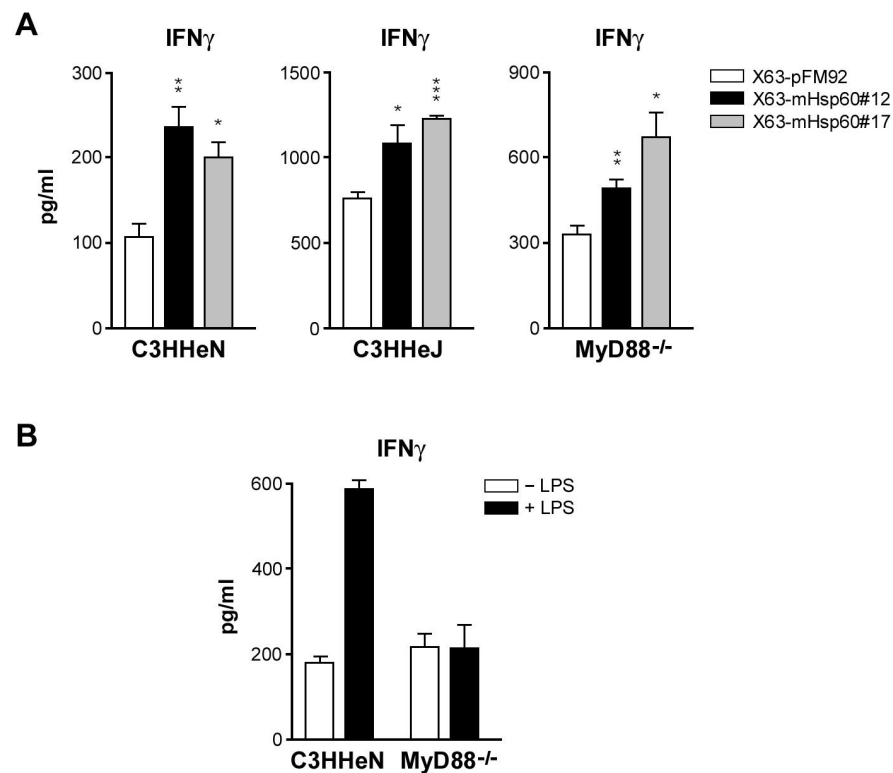
#### **3.4.3.2 Rolle des MyD88-Signalwegs bei der Hsp60-vermittelten IFN $\gamma$ -Produktion in T-Zellen**

Die TLR-Rezeptorfamilie umfaßt bislang zehn bekannte Mitglieder (TLR1-10). Alle TLR sind strukturell verwandt und nutzen ähnliche intrazelluläre Signaltransduktionswege. Ein zentrales Adaptermolekül, über das nahezu alle TLR ein intrazelluläres Signal vermitteln, ist der *myeloid differentiation factor 88* (MyD88). Um zu prüfen, ob dieses Adaptermolekül der TLR-Signalgebung eine Rolle bei der Hsp60-vermittelten Steigerung der IFN $\gamma$ -Produktion in T-Zellen spielt, wurden Gesamtmilzzellen aus C3HHeN-, C3HHeJ- und C3HHeN-MyD88-Knockout (MyD88<sup>-/-</sup>)-Mäusen in Gegenwart von mHsp60-exprimierenden oder Hsp60-negativen X63-Zellen mit anti-CD3 stimuliert (Abbildung 3.23-A). Zum Vergleich wurde auch hier eine Stimulation mit LPS mitgeführt (Abbildung 3.23-B).

Während die Zugabe von LPS erwartungsgemäß lediglich in Zellen mit funktionellem TLR4 und MyD88 eine Steigerung der IFN $\gamma$ -Produktion stimulieren konnte, führte die Gegenwart von Hsp60 auf der Zelloberfläche von X63-Zellen im Vergleich zu Kontrollkulturen mit Hsp60-negativen X63-Zellen zu einer deutlichen T-Zellaktivierung auch in TLR4-defekten und MyD88<sup>-/-</sup>-Milzzellen.

Die Ergebnisse dieser Experimente zeigen, dass die Induktion einer IFN $\gamma$ -Antwort durch Hsp60 auch in Milzzellen möglich ist, deren darin enthaltene APZ das MyD88-Protein als zentrales Adaptermolekül der TLR-Signalgebung nicht exprimieren. Nicht nur TLR4, sondern auch der TLR-assoziierte MyD88-Signalweg, scheint somit für die Hsp60-induzierte Steigerung der IFN $\gamma$ -Antwort keine essentielle Funktion zu besitzen.





**Abb. 3.23 Der MyD88-Signalweg ist für die Induktion von IFN $\gamma$  durch Hsp60 entbehrlich**

**A)**  $2 \times 10^5$  Milzzellen aus C3HHeN-, C3HHeJ- und C3HHeN-MyD88-Knockout (MyD88<sup>-/-</sup>)-Mäusen wurden in Gegenwart von  $2 \times 10^4$  Hsp60-negativen (weiß) oder mHsp60-positiven X63-Zellen (X63-mHsp60#12, schwarz; X63-mHsp60#17, grau) 24h mit 0.1  $\mu\text{g/ml}$  anti-CD3 stimuliert und IFN $\gamma$  im Kulturüberstand mit Hilfe des ELISA quantifiziert (y-Achse). Das gezeigte Resultat ist repräsentativ für zwei voneinander unabhängige Experimente. Dargestellt sind die Mittelwerte und SEM von Triplikaten. Sternchen symbolisieren die Signifikanz der Hsp60-vermittelten Steigerung der IFN $\gamma$ -Produktion. Sie wurde mit dem Students-t-Test (unpaired, two-tailed) ermittelt. \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.005$ , \*\*\*  $p < 0.0005$

**B)** Gezeigt ist eine Kontrollstimulation von  $2 \times 10^5$  C3HHeN- und MyD88<sup>-/-</sup>-Milzzellen mit 0.1  $\mu\text{g/ml}$  anti-CD3 ohne LPS (weiß) und mit 1  $\mu\text{g/ml}$  LPS (schwarz).

### **3.5 Teil IV: Modulation der Tumorimmunität durch Hsp60 *in vivo***

In den vorangegangenen Kapiteln des Ergebnisteils wurde in *in vitro*-Testsystemen gezeigt, dass Hsp60, das als membrangebundenes Protein auf der Zelloberfläche von Tumorzellen exprimiert wird, *in vitro* eine T-Zellantwort stimulieren kann, die durch eine gesteigerte Freisetzung des Zytokins IFN $\gamma$  gekennzeichnet ist. Der *in vitro* beobachtete kostimulatorische Effekt des Hsp60-Proteins sollte nun im lebenden Organismus überprüft werden. Für die Untersuchung der adjuvanten Funktion des Hsp60-Proteins *in vivo* wurden mHsp60-positive und Hsp60-negative X63-Zellen verwendet. Die X63-Zelllinie ist eine B-Zelllymphomlinie aus Balb/c-Mäusen. Diese Tumorzellen exprimieren kein Modellantigen. Untersucht wurde deshalb, ob die Expression des Hsp60-Proteins auf der Zelloberfläche von X63-Zellen *in vivo* in Balb/c-Mäusen eine Immunantwort gegenüber X63-spezifischen Tumorantigenen induzieren und die Immunogenität dieser Tumorzellen steigern kann.

#### **3.5.1 Die Oberflächenexpression von Hsp60 steigert die Tumorimmunogenität *in vivo***

Balb/c-Mäuse wurden zunächst mit bestrahlten teilungsunfähigen Hsp60-negativen oder mHsp60-positiven X63-Tumorzellen, die das Hsp60-Protein auf der Zelloberfläche exprimieren, intraperitoneal zweimal im Abstand von sieben Tagen immunisiert. Die Zellen wurden in PBS-Puffer appliziert und deshalb eine Kontrollgruppe entsprechend mit PBS allein behandelt. Sieben Tage nach der zweiten Immunisierung wurden die Milzzellen der Tiere entnommen und mit bestrahlten parentalen X63-Tumorzellen oder syngenen Balb/c-Milzzellen zur Kontrolle der Tumorspezifität der Immunreaktion koinkubiert. Abbildung 3.24 zeigt das Vorgehen schematisch.



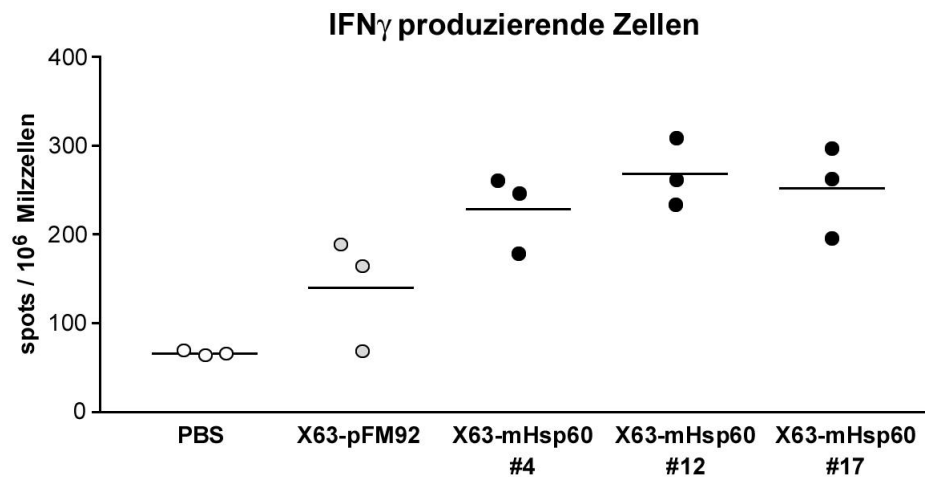
**Abb. 3.24 Immunisierung von Mäusen mit mHsp60-positiven und Hsp60-negativen X63-Tumorzellen**

$2 \times 10^7$  bestrahlte Hsp60-negative (X63-pFM92) oder mHsp60-positive X63-Tumorzellen (X63-mHsp60) wurden im Abstand einer Woche wiederholt in das Peritoneum von Balb/c-Mäusen injiziert. Nach vierzehn Tagen wurden die Milzzellen der Tiere entnommen und mit parentalen X63-Tumorzellen oder Balb/c-Milzzellen koinkubiert.

Die Anzahl  $\text{IFN}\gamma$ -produzierender Zellen in Milzzellpräparationen immunisierter Mäuse in Gegenwart parentaler X63-Tumorzellen wurde mit Hilfe des ELISPOT-Tests ermittelt und ist in Abbildung 3.25 dargestellt.

Die Applikation von Hsp60-negativen X63-Zellen (X63-pFM92) induzierte erwartungsgemäß eine Grundimmunisierung der Mäuse und führte gegenüber den PBS-Kontrollen im Kontakt mit parentalen X63-Tumorzellen zu einer gesteigerten Anzahl  $\text{IFN}\gamma$ -produzierender Zellen in der Milz der Tiere. Durch die Immunisierung mit mHsp60-exprimierenden X63-Zellen konnte im Vergleich hierzu die Zahl der  $\text{IFN}\gamma$ -Produzenten jedoch deutlich gesteigert werden. Dieser Effekt wurde bei der Immunisierung mit drei verschiedenen mHsp60-exprimierenden X63-Zellklonen (X63-mHsp60#4, #12 und #17) beobachtet. Durchschnittlich führte die Immunisierung der Tiere mit allen drei mHsp60-exprimierenden X63-Klonen etwa zu einer Verdopplung der Anzahl  $\text{IFN}\gamma$ -produzierender Zellen gegenüber der Immunisierung mit Hsp60-negativen X63-Tumorzellen.

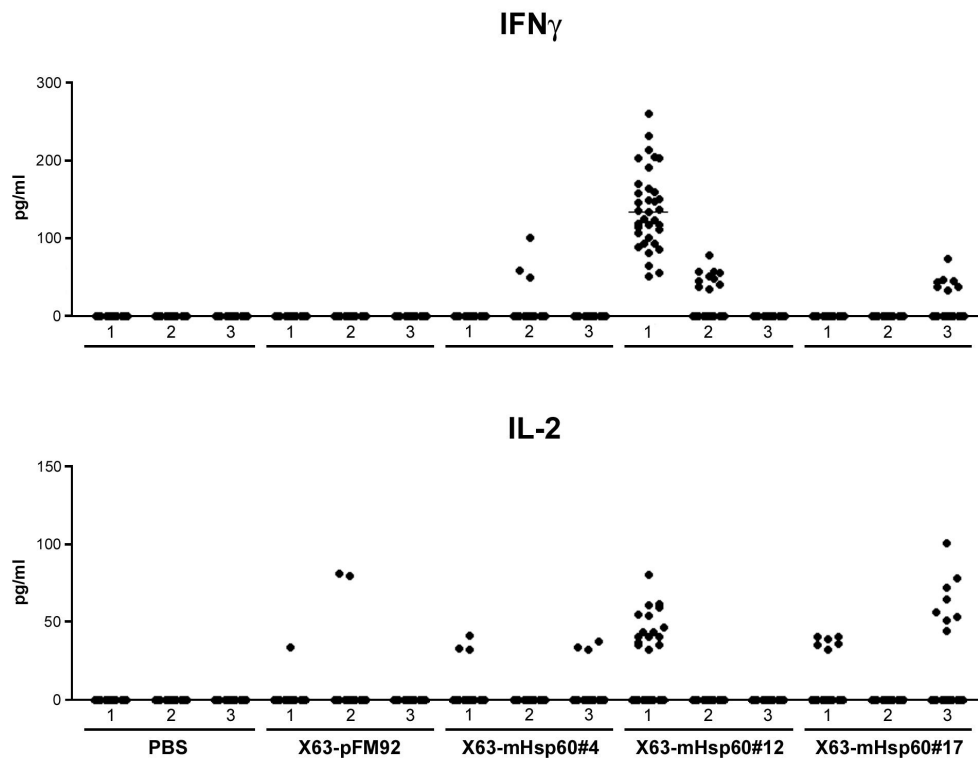
Die Stimulation der  $\text{IFN}\gamma$ -Produktion in den Milzzellen immunisierter Tiere erfolgte dabei ohne weiteren Kostimulus allein durch parentale X63-Zellen ohne weitere Zugabe von Hsp60.



**Abb. 3.25 IFN $\gamma$ -ELISPOT einer Kokultur von Milzzellen immunisierter Mäuse und X63-Tumorzellen**

Je drei Balb/c-Mäuse wurden im Abstand von einer Woche zweimal mit  $2 \times 10^7$  bestrahlten Hsp60-negativen (X63-pFM92; grau) oder mHsp60-positiven X63-Zellen (X63-mHsp60#4, X63-mHsp60#12, X63-mHsp60#17; schwarz) in 400  $\mu$ l PBS beziehungsweise mit PBS allein (weiß) intraperitoneal immunisiert. Eine Woche nach der zweiten Immunisierung wurden  $1 \times 10^6$  Milzzellen dieser Tiere 24h mit  $2 \times 10^4$  bestrahlten X63-Zellen in ELISPOT-Platten kultiviert und die Anzahl IFN $\gamma$ -produzierender Zellen bestimmt (y-Achse). Jeder Messpunkt repräsentiert den Mittelwert von Triplikaten, die von jeder immunisierten Maus erhoben wurden. Die Querbalken geben den Mittelwert der Messdaten aller drei Mäuse jeder Gruppe wider. Das Ergebnis ist repräsentativ für zwei voneinander unabhängige Experimente.

Um die Spezifität der Immunantwort zu überprüfen, wurden daneben Milzzellen immunisierter Tiere parallel mit bestrahlten parentalen X63-Tumorzellen oder zur Kontrolle der Immunität gegenüber „selbst“-Antigenen mit bestrahlten syngenem Balb/c-Milzzellen koinkubiert und die Zytokine IFN $\gamma$  und IL-2 im Kulturüberstand quantifiziert. Dabei wurden pro Tier jeweils 35 Messdaten erhoben. Das Ergebnis dieser Analysen ist in Abbildung 3.26 und 3.27 gezeigt.

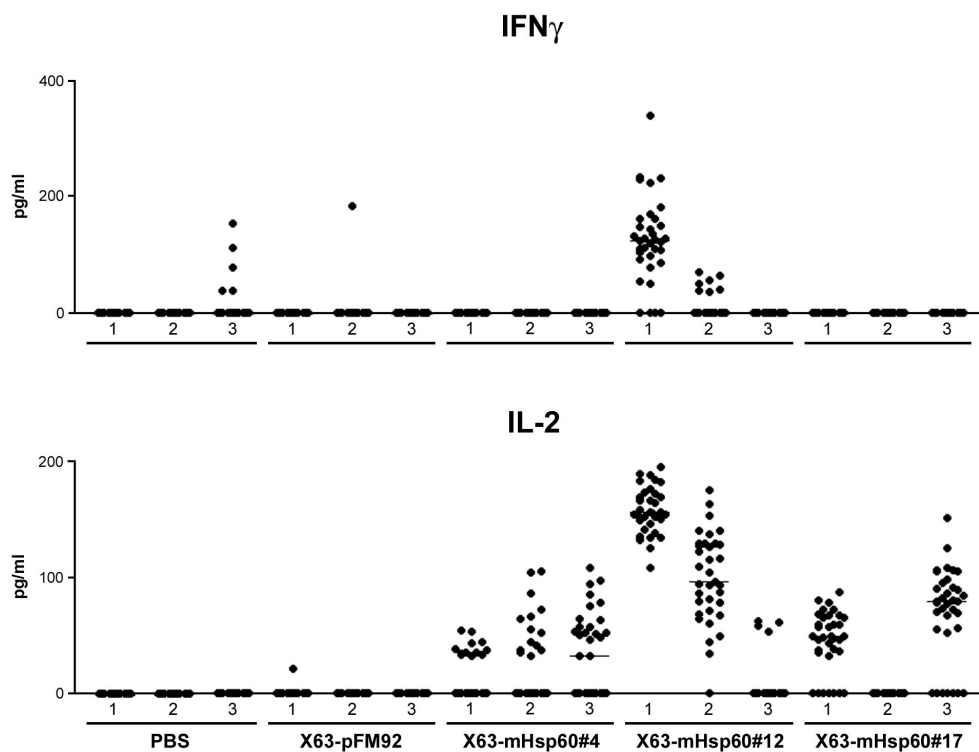


**Abb. 3.26 Zytokinproduktion von Milzzellen immunisierter Tiere in Gegenwart von X63-Tumorzellen**

Wie in Abb. 3.24 beschrieben wurden je drei Balb/c-Mäuse im Abstand von einer Woche zweimal mit PBS zur Kontrolle oder mit  $2 \times 10^7$  bestrahlten Hsp60-negativen (X63-pFM92) oder mHsp60-positiven X63-Zellen (X63-mHsp60#4, X63-mHsp60#12, X63-mHsp60#17) immunisiert. Eine Woche nach der zweiten Immunisierung wurden  $1 \times 10^5$  Milzzellen dieser Tiere mit  $2 \times 10^4$  bestrahlten X63-Zellen kokultiviert und IFN $\gamma$  und IL-2 nach 48h im Kulturüberstand quantifiziert (y-Achse). Dabei wurden für jedes Tier (Nr. 1-3) jeweils 35 Messwerte ermittelt, die hier einzeln aufgetragen sind. Querbalken repräsentieren den Mittelwert aller Messdaten einer Maus.

Die Gegenwart parentaler X63-Tumorzellen führte in Milzzellen aus Mäusen, die mit Hsp60-negativen X63-Tumorzellen immunisiert worden waren, *ex vivo* nicht zu einer im ELISA messbaren Produktion von IFN $\gamma$  und IL-2. Im Vergleich hierzu wurde in den Milzzellen aus je einer Maus der X63-mHsp60#4- und X63-mHsp60#17-Gruppe sowie zwei Tieren der X63-mHsp60#12-Gruppe in Gegenwart von X63-Zellen eine zwar schwache, aber messbare IFN $\gamma$ -Antwort induziert. In Milzzellen aus einer Maus der X63-mHsp60#12-Gruppe und zwei Mäusen der X63-mHsp60#17-Gruppe wurde außerdem eine schwach gesteigerte IL-2-Produktion beobachtet (Abb. 3.26).

Abbildung 3.27 zeigt die Koinkubation der Milzzellen immunisierter Tiere mit syngenen Balb/c-Milzzellen. Dabei reagierten die Milzzellen aller Tiere, die mit mHsp60-exprimierenden X63-Zellen immunisiert worden waren, ebenfalls auf die Gegenwart von Balb/c-Milzzellen mit einer verstärkten Zytokinproduktion. Gegenüber Milzzellen von Tieren, die mit Hsp60-negativen Tumorzellen immunisiert worden waren, wurde insbesondere eine Steigerung der IL-2-Produktion beobachtet. Außerdem führte die Gegenwart von Balb/c-Milzzellen in den Milzzellen von zwei Tieren der X63-mHsp60#12-Gruppe zu einer messbaren Freisetzung von  $\text{IFN}\gamma$ .



**Abb. 3.27 Zytokinproduktion von Milzzellen immunisierter Tiere in Gegenwart von Balb/c-Milzzellen**

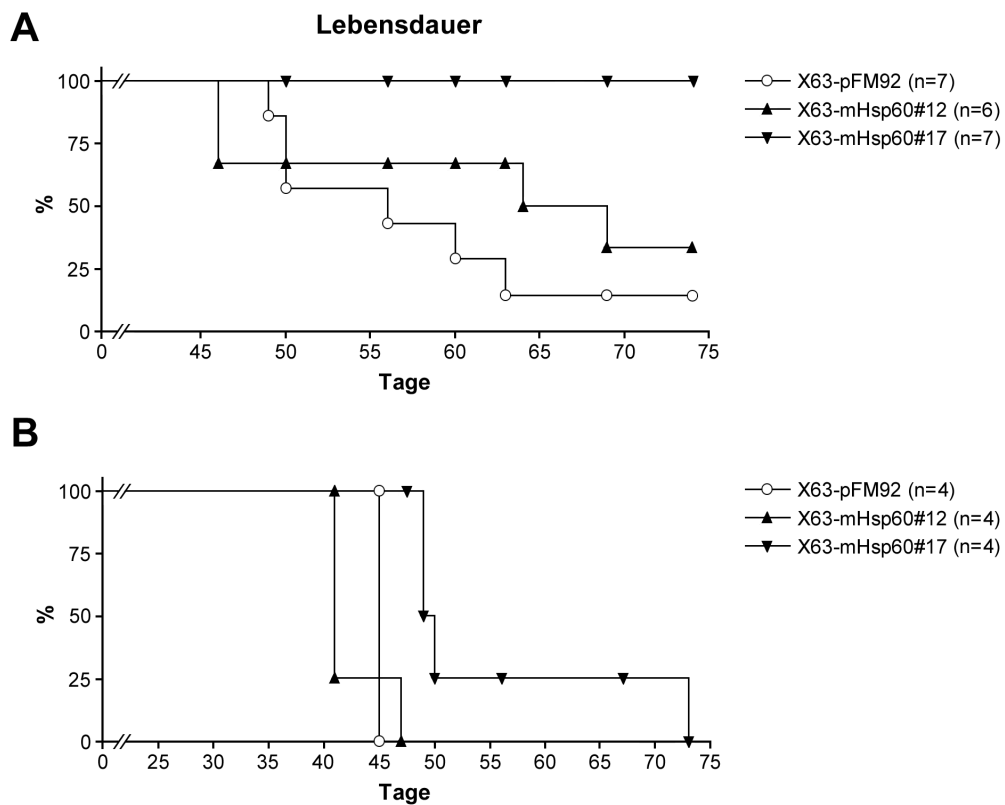
$1 \times 10^5$  Milzzellen immunisierter Tiere (siehe Abb. 3.26) wurden mit  $1 \times 10^5$  bestrahlten Balb/c-Milzzellen kokultiviert und  $\text{IFN}\gamma$  und IL-2 nach 48h im Kulturüberstand quantifiziert. Dabei wurden für jedes Tier (Nr. 1-3) jeweils 35 Messwerte ermittelt, die hier einzeln aufgetragen sind. Querbalken repräsentieren den Mittelwert der Messdaten des angezeigten Tieres.

Dieses Resultat zeigt, dass die Immunisierung mit mHsp60-exprimierenden X63-Tumorzellen zu einer allgemeinen Aktivierung des Immunsystems führt, die sich *ex vivo* durch eine unspezifische Freisetzung von IFN $\gamma$  und IL-2 zeigt. Wahrscheinlich wurde keine, gegen X63-Tumorantigene gerichtete, spezifische Immunreaktion induziert.

### 3.5.2 Hsp60 als Adjuvanz in der Tumorabwehr

Um zu prüfen, ob die unspezifische Aktivierung des Immunsystems durch Hsp60 auf der Oberfläche der X63-Tumorzellen die Tumorabwehr *in vivo* unterstützen kann, wurde nun das Wachstum mHsp60-exprimierender und Hsp60-negativer X63-Zellen in Balb/c-Mäusen untersucht. Dafür wurden vitale mHsp60-positive oder negative Tumorzellen intravenös über die Schwanzvene in Balb/c-Mäuse injiziert. Die Tiere wurden getötet, wenn das Tumorwachstum zu einer Erkrankung gemäß den drei festgelegten Kriterien (dicker Bauch, struppiges Fell, erhebliche Bewegungseinschränkungen/Lähmungen) geführt hatte. Dabei wurde die Überlebensdauer der Tiere notiert. In Abbildung 3.28 ist die Überlebensrate der Tiere in Prozent und die Überlebensdauer in Tagen dargestellt.

Das Experiment zeigt, dass die Gegenwart von Hsp60 auf der Oberfläche von Tumorzellen die Entwicklung von Tumoren *in vivo* verlangsamen und im Fall des Klons X63-mHsp60#17 bei Injektion von  $1 \times 10^4$  Tumorzellen bis zum Abbruch des Experimentes an Tag 73 verhindern konnte. Die Tiere, die mHsp60-positive Tumorzellen des Klons X63-mHsp60#17 erhalten hatten, zeigten zu diesem Zeitpunkt keine äußerlich erkennbaren Anzeichen einer Erkrankung. Auch bei Injektion von  $1 \times 10^5$  Tumorzellen überlebte eine von vier Mäusen, die Zellen des Klons X63-mHsp60#17 erhalten hatte, etwa dreißig Tage länger als alle übrigen Mäuse.



**Abb. 3.28 Überlebensdauer der Mäuse nach Injektion von Hsp60-negativen und mHsp60-positiven X63-Tumorzellen**

**A)**  $1 \times 10^4$  vitale Hsp60-negative X63-Zellen (X63-pFM92) beziehungsweise mHsp60-positive X63-Zellen (X63-mHsp60#12, X63-mHsp60#17) wurden intravenös in Balb/c-Mäuse injiziert und die Überlebensdauer der Tiere beobachtet (x-Achse). y-Achse: lebende Tiere in %; n = Anzahl der Tiere pro Gruppe

**B)** Analog wurden  $1 \times 10^5$  Hsp60-negative X63-Zellen (X63-pFM92) beziehungsweise mHsp60-positive X63-Zellen (X63-mHsp60#12, X63-mHsp60#17) appliziert. x-Achse: Überlebensdauer; y-Achse: lebende Tiere in %; n = Anzahl der Tiere pro Gruppe

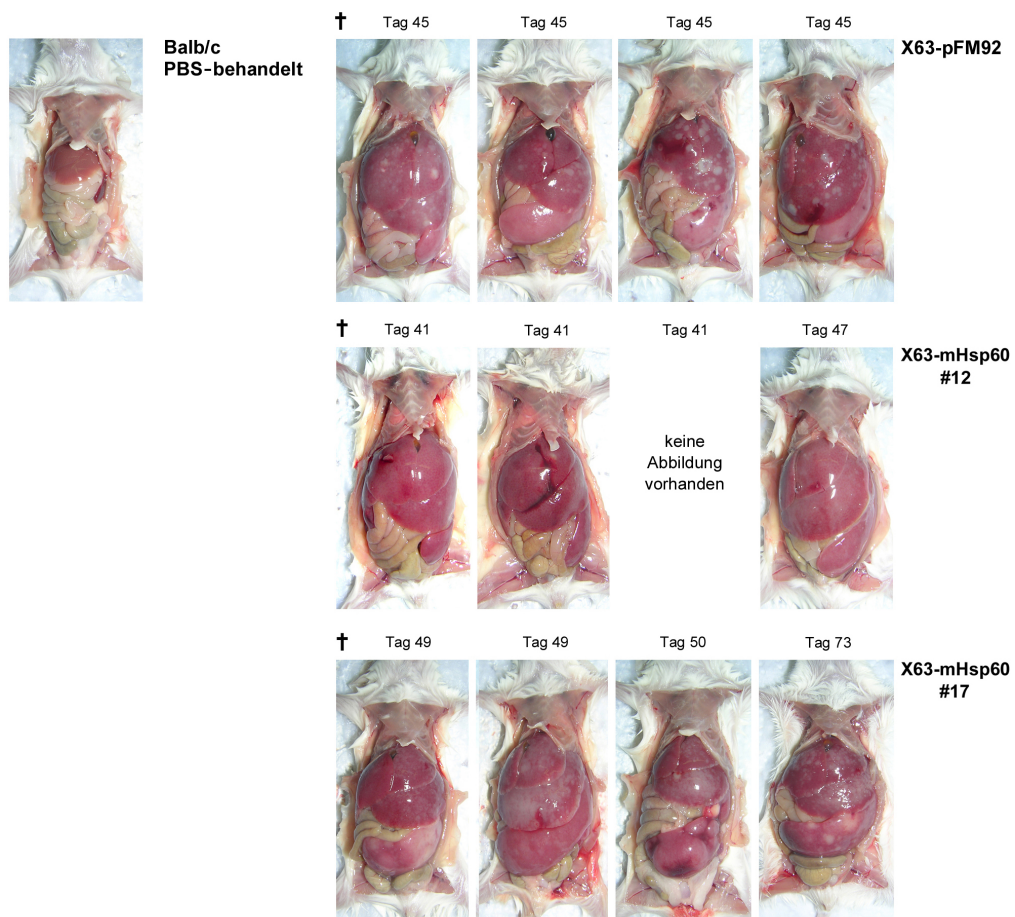
Dieses Resultat zeigt, dass Hsp60 *in vivo* eine adjuvante Wirkung bei der Tumormunität besitzt. Die durch die Oberflächenexpression von Hsp60 induzierte unspezifische Aktivierung des Immunsystems (siehe 3.5.1) scheint eine anti-Tumorantwort *in vivo* zu unterstützen. Allein die Expression des Hsp60-Proteins kann jedoch das Tumorstadium nicht vollständig inhibieren. Alle Mäuse, die  $1 \times 10^5$  Tumorzellen erhalten hatten, entwickelten Tumoren.

Die in den Abschnitten 3.5.1 und 3.5.2 beschriebenen Experimente zeigen zusammenfassend, dass die *in vitro* beobachtete immunstimulatorische Funktion des Hsp60-Proteins auch *in vivo* relevant ist.



### 3.5.3 Hsp60-negative und mHsp60-exprimierende X63-Tumorzellen infiltrieren Leber und Milz

Alle Mäuse, die eine hohe Dosierung ( $1 \times 10^5$ ) Hsp60-negativer oder mHsp60-positiver X63-Tumorzellen erhalten hatten, entwickelten Tumoren und wurden nach der Tötung geöffnet und fotografiert. Abbildung 3.29 zeigt, dass sowohl Hsp60-negative als auch mHsp60-positive X63-Tumorzellen bei allen Tieren sowohl in der Milz als auch in der Leber massiv metastasierten. Andere Organe waren nicht betroffen. Bei allen Tieren hatten sich jedoch daneben große kapsuläre Tumoren im Bauchraum entwickelt, die einen Durchmesser von 0.5-1.5 cm besaßen (Daten nicht gezeigt).



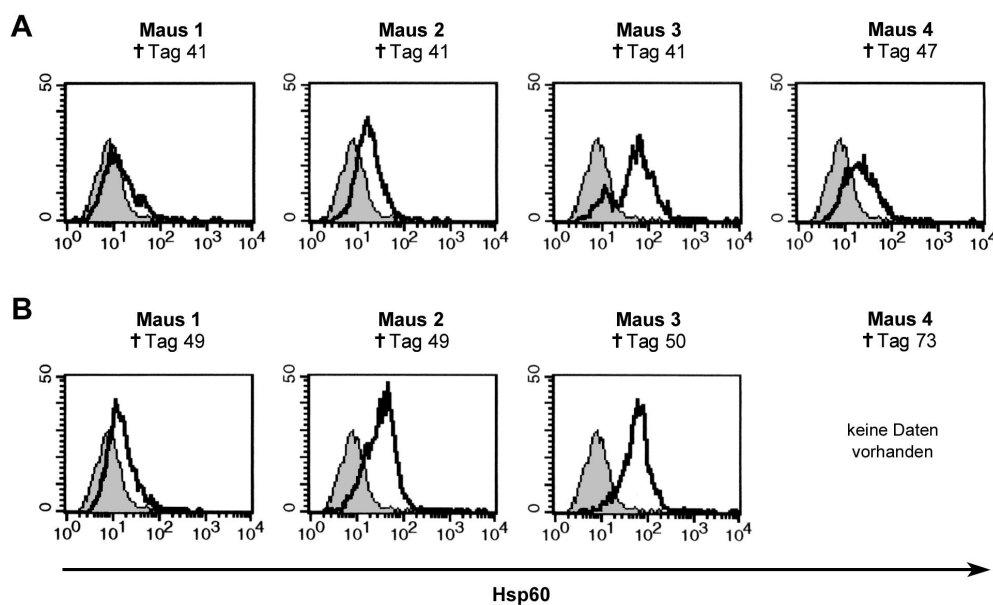
**Abb. 3.29 X63-Tumorzellen infiltrieren Leber und Milz**

Die Tiere aus dem in Abbildung 3.28-B gezeigten Experiment, die  $1 \times 10^5$  Hsp60-negative X63-Zellen (X63-pFM92, oben) beziehungsweise mHsp60-positive X63-Zellen (X63-mHsp60#12, Mitte; X63-mHsp60#17, unten) erhalten hatten, wurden, geöffnet und fotografiert. Links ist eine Kontrollmaus dargestellt, die nur mit PBS behandelt worden war. Angegeben ist außerdem der Todestag der Tiere.

Dieses Ergebnis zeigt, dass die Expression von Hsp60 auf der Tumorzelloberfläche keinen Einfluss auf das metastasierende Verhalten der Tumorzellen *in vivo* besitzt.

### 3.5.4 Expression von Oberflächen-Hsp60 auf *ex vivo*-präparierten Tumorzellen

Um zu überprüfen, ob die Tumoren nach ihrer Entwicklung *in vivo* das Hsp60-Protein noch auf ihrer Oberfläche exprimierten, wurde aus den in Abbildung 3.29 gezeigten Tieren Tumorgewebe entnommen und hieraus Tumorzellen *in vitro* rekultiviert. Um zu kontrollieren, ob die Tumorzellen auch nach der *in vivo*-Passage das auf dem Vektor pFM92 transportierte Neomycin-Resistenzgen weiterhin in das Genom integriert trugen, wurden die Zellen dabei in G418-haltigem Selektionsmedium kultiviert. Nachdem die Tumorzellen herangewachsen waren, wurden sie durchflusszytometrisch hinsichtlich der Expression von Oberflächen-Hsp60 untersucht. Das Ergebnis dieser Untersuchungen ist in Abbildung 3.30 dargestellt.



**Abb. 3.30 Hsp60-Expression auf der Oberfläche *ex vivo* kultivierter Tumorzellen**

X63-mHsp60#12-Tumorzellen aus vier Mäusen (A) und X63-mHsp60#17-Tumorzellen (B) aus drei Mäusen sowie X63-pFM92-Tumorzellen wurden *ex vivo* kultiviert, mit anti-Hsp60-Antikörper gefärbt und im Durchflusszytometer analysiert. Der grau gefüllte Bereich zeigt die Färbung von X63-pFM92-Tumorzellen einer Maus. Die Färbung der X63-mHsp60#12- und X63-mHsp60#17-Tumorzellen ist als schwarze Linie dargestellt. y-Achse: Zellzahl, x-Achse: Fluoreszenzintensität

Die durchflusszytometrische Analyse zeigt, dass die Oberflächenexpression des Hsp60-Proteins auf Tumoren, die sich aus dem X63-mHsp60#12- wie auch dem X63-mHsp60#17-Klon *in vivo* entwickelt hatten, variierte. Bei X63-mHsp60#12-Tumoren dreier Tiere sowie dem X63-mHsp60#17-Tumor einer Maus wurde das Hsp60-Protein auf der Tumorzelloberfläche erheblich schwächer als zum Zeitpunkt der Tumorzellinjektion exprimiert (siehe Abb. 3.8). Nur bei einem Tier mit X63-mHsp60#12-Tumoren, jedoch zwei Tieren mit X63-mHsp60#17-Tumoren, exprimierten die *ex vivo* kultivierten Tumorzellen das rekombinante Hsp60-Protein vergleichbar stark auf ihrer Oberfläche wie zum Zeitpunkt der Tumorzellapplikation. Leider konnte eine solche Analyse nicht für Maus 4, die Tumoren des X63-mHsp60#17-Klons trug und erheblich länger als die übrigen Mäuse überlebte, durchgeführt werden, da hier die *in vitro*-Kultur der Tumorzellen misslang.

Die Ergebnisse dieser Untersuchungen deuten darauf hin, dass *in vivo* ein Selektionsdruck besteht, der das Wachstum von Tumorzellen, die das Hsp60-Protein nicht oder nur schwach auf der Zelloberfläche exprimieren oder aber die Expression des rekombinanten Hsp60-Proteins negativ regulieren konnten, begünstigt. Möglicherweise ist die Fähigkeit zur Negativregulation der mHsp60-Expression bei den aggressiveren X63-mHsp60#12-Tumorzellen stärker ausgeprägt.

## 4 Diskussion

### 4.1 Hsp60 als endogenes Gefahrensignal – ein LPS-Artefakt?

Es wurde gezeigt, dass Hsp60 in APZ die Freisetzung von Zytokinen stimuliert (Chen et al., 1999; Kol et al., 1999; Vabulas et al., 2001; Moré et al., 2001; Flohé et al., 2003), die Reifung von dendritischen Zellen induziert (Chen et al., 1999; Kol et al., 2000; Moré et al., 2001; Ueki et al., 2002; Wallin et al., 2002; Flohé et al., 2003) und bei der antigenabhängigen T-Zellaktivierung die IFN $\gamma$ -Produktion steigert (Breloer et al., 2001; Moré et al., 2001; Breloer et al., 2002). Die in diesen Studien verwendeten Proteinpräparationen enthielten jedoch bakterielle Pathogen-assoziierte Moleküle (*pathogen associated molecular pattern*, PAMP), insbesondere LPS. Hsp60 und LPS scheinen denselben Rezeptorkomplex zu nutzen (Kol et al., 2000; Ohashi et al., 2000) und initiieren deshalb wahrscheinlich ähnliche Signaltransduktionswege.

Das in den Proteinpräparationen enthaltene LPS kann mit Hilfe des LPS-spezifischen LAL-Testes (*Limulus amoebocyte lysate assay*) quantifiziert und durch entsprechende Verfahren weitgehend, jedoch nicht vollständig, eliminiert werden. Zusätzliche Kontrollen sollten deshalb die durch Hsp60 und LPS induzierten immunologischen Effekte voneinander abgrenzen. Dazu gehörte die Hitzedenaturierung des thermolabilen Hsp60-Proteins, während LPS für thermostabil gehalten wurde, oder die Zugabe des LPS-Inhibitors Polymyxin B (PmB) zu den Testkulturen. Jedoch wurde gezeigt, dass LPS in geringen wie auch höheren Konzentrationen durchaus hitzeempfindlich ist (Gao und Tsan, 2003), und dass PmB die immunstimulatorische Wirkung von LPS nicht vollständig inhibieren konnte. Schließlich konnte mit Hilfe dieser Kontrollen außerdem eine Beteiligung weiterer PAMP, wie bakterielle CpG-DNA oder Lipoproteine, die im LAL-Test nicht nachgewiesen werden können, nicht ausgeschlossen werden. Sie waren deshalb ungeeignet, die Hsp60-Spezifität der beobachteten Immunstimulation eindeutig zu demonstrieren. Jüngere Publikationen stellen die immunstimulatorische Funktion des Hsp60-Proteins generell in Frage und führen diese allein auf die Kontamination mit bakteriellen PAMP zurück (Gao und Tsan, 2003; Gao und Tsan, 2004).

Ob Hsp60 selbst über immunstimulatorische Eigenschaften verfügt, kann nur in einem vollständig Endotoxin-freien Testsystem untersucht werden. Ein solches Testsystem wurde in dieser Arbeit etabliert. Dabei wurde das Hsp60-Protein in eukaryontischen Zellen zur Expression gebracht und Hsp60-exprimierende Zellen als Werkzeug zur

---

Untersuchung des immunmodulatorischen Potentials des Hsp60-Proteins im *in vitro*-Testsystem und *in vivo* in der Maus eingesetzt.

## **4.2 Expression des murinen Hsp60-Proteins in eukaryontischen Zelllinien**

Das murine Hsp60-Protein konnte als membranverankertes Oberflächenprotein (mHsp60) oder als sezerniertes Hsp60-Ig-Fusionsprotein transient in der Affennierenzelllinie COS1 zur Expression gebracht werden. Beide Fusionsproteine waren anhand spezifischer extra- und intrazellulärer Färbungen der transfizierten Zellen im Durchflusszytometer sowie im Hsp60-spezifischen Western-Blot von Lysaten transfizierter COS1-Zellen nachweisbar. Sie besitzen gegenüber dem endogenen mitochondrialen Hsp60 (68 kDa) ein apparentes Molekulargewicht von 84 kDa (mHsp60) beziehungsweise 90 kDa (Hsp60-Ig) (siehe Abschnitt 3.2.2.1 und 3.2.2.3). Das Hsp60-Ig-Fusionsprotein konnte außerdem im Kulturüberstand transfizierter COS1-Zellen mit Hilfe spezifischer ELISA detektiert und quantifiziert werden (15-20 ng/ml). Die Konzentration des Hsp60-Ig-Proteins war damit zwar zu gering für den direkten Einsatz des Kulturüberstandes im *in vitro*-Testsystem, jedoch konnte das Protein über Protein A-Säulen hinreichend aufkonzentriert werden, um es für Bindungsstudien zu verwenden.

Da es sich bei COS1-Zellen um Affennierenzellen handelt und mit diesen Zellen *in vivo*-Untersuchungen im Modellorganismus Maus nicht möglich sind, sollten darüber hinaus Zelllinien etabliert werden, die das membranverankerte Hsp60-Protein stabil auf ihrer Oberfläche exprimieren. Die stabile Expression des rekombinanten Hsp60-Proteins auf der Oberfläche verschiedener Zelllinien (T-, Melanom-, Fibroblastenzellen) war nicht erfolgreich. Häufig wurden zunächst mHsp60-positive Zellklone erhalten, die aber die Expression des rekombinanten Proteins nach einiger Zeit wieder herunterregulierten. Möglicherweise wirkt sich die Expression des HSP in diesen Zellen toxisch aus. Durch den Austausch der mitochondrialen Signalsequenz durch ein sekretorisches Signalpeptid wird das Protein nicht in die Mitochondrien importiert, sondern in den sekretorischen Proteinexpressions- und Transportweg eingeschleust. Dabei wird es kotranslational in das Endoplasmatische Reticulum (ER) importiert. In diesem Kompartiment, in dem es natürlicherweise nicht vorkommt, könnte eine Assoziation von Hsp60 mit Proteinen des ER Stoffwechselwege und andere Funktionen

des ER, wie den Transport von sekretorischen und Membranproteinen, behindern und deshalb toxische Auswirkungen auf die Zelle besitzen.

Schließlich konnten verschiedene Klone der murinen X63-Plasmazelllinie erzeugt werden, die das membrangebundene Hsp60-Protein stabil auf ihrer Oberfläche exprimierten. Die Expression des rekombinanten Fusionsproteins konnte in diesen Zellen ebenfalls durch extrazelluläre Färbungen mit spezifischen Antikörpern gegen das Hsp60-Protein selbst oder eines der beiden angefügten Epitope (Hämagglutinin (HA), *myc*) im Durchflusszytometer sowie im Zytospin nachgewiesen werden (siehe Abschnitt 3.2.2.2). Der Zytospin zeigt, dass das mHsp60-Protein auf der Oberfläche von X63-Zellen nicht gleichmäßig verteilt, sondern vielmehr in großen Aggregaten konzentriert vorliegt. Eine mögliche Ursache hierfür ist die Oligomerisierung des Hitzeschockproteins auf der Zelloberfläche. Das mitochondriale funktionelle Hsp60-Protein ist ein Oligomer, das aus vierzehn Hsp60-Untereinheiten besteht (Bukau und Horwich, 1998). Dabei formen zwei heptamere Ringe eine fassähnliche Struktur, die auch als „*Double Doughnut*“ bezeichnet wird, und in dessen Lumen die Faltung assoziierter Proteine erfolgt. Zusätzlich kann auch die Fusion mit der Transmembranregion des PDGF-Rezeptors zu einer Oligomerisierung beitragen. Eine weitere Erklärungsmöglichkeit bietet die Lokalisation des Proteins in definierten Membranregionen, sogenannten „*Lipid Rafts*“ (Heerklotz, 2002). Diese Membranregionen weisen eine von der übrigen Zellmembran abweichende Zusammensetzung auf. Insbesondere finden sich hier Anreicherungen von Sphingomyelin, Cholesterol und Glykolipiden sowie hydrophobe Membranproteine, die häufig über gesättigte Alkylreste in der Membran verankert sind (Heerklotz, 2002). Angesiedelt in solchen Membranregionen könnte das Hsp60-Protein mit weiteren hydrophoben Membranproteinen aggregieren. Möglicherweise ist dies die Ursache dafür, dass das rekombinante Hsp60-Protein im Western-Blot von Zelllysaten transfizierter X63-Zellen nicht nachgewiesen werden konnte. Bei der hier durchgeführten kalten Zellyse mit Triton-X100 ist bekannt, dass eine Detergenz-unlösliche Fraktion erhalten wird (Schroeder et al., 1994; Schroeder et al., 1998; Patra et al., 1999; London und Brown, 2000), bei der es sich wahrscheinlich um Raft-ähnliche Strukturen handelt. Nach der Zentrifugation verbleiben diese Fraktionen im Pellet und gelangen so nicht mit dem Überstand auf das Gel und den Western-Blot. In COS1-Zellen wurde dagegen im Zytospin neben kleineren Aggregaten eine ebenmäßigere Verteilung des membranverankerten Hsp60-Proteins auf der Zelloberfläche beobachtet

(Daten nicht gezeigt). Wie beschrieben konnte hier das rekombinante Protein im Western-Blot von Zelllysaten transfizierter Zellen identifiziert werden. Da das membranverankerte Hsp60-Protein jedoch mit Hsp60-spezifischem Antikörper auf der Oberfläche stabil transfizierter X63-Zellen in der durchflusszytometrischen Analyse und im Zytospin detektierbar war, wird eine korrekte Konformation des rekombinanten Fusionsproteins angenommen.

### **4.3 Hsp60 ist ein immunologischer Signalverstärker**

Es wurde gezeigt, dass eukaryontisches Hsp60-Protein ebenso wie LPS und andere bakterielle PAMP bei der antigenabhängigen Stimulation naiver CD4<sup>+</sup>- und CD8<sup>+</sup>-T-Zellen *in vitro* die Expression des Zytokins IFN $\gamma$  steigert (Moré et al., 2001; Breloer et al., 2001; Breloer et al., 2002). Dieser Effekt wurde auch bei Einsatz der eingangs erwähnten Kontrollen wie die Hitzedenaturierung des Hsp60-Proteins und die Inhibition von LPS durch Zugabe von PmB beobachtet. In dem in dieser Arbeit etablierten Endotoxin-freien Testsystem wurde diese immunmodulatorische Eigenschaft des Hsp60-Proteins überprüft. Dabei wurden naive T-Lymphocyten in Gegenwart von APZ und COS1-Zellen oder X63-Zellen, die das murine Hsp60-Protein als membrangebundenes Molekül auf der Zelloberfläche präsentierten oder als Hsp60-Ig-Fusionsprotein in den Kulturüberstand freisetzen, antigenabhängig stimuliert. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen zeigen, dass Hsp60 in Abwesenheit jeglicher kontaminierender bakterieller PAMP eine adjuvante Wirkung bei der Aktivierung naiver T-Zellen besitzt. Sowohl das von COS1-Zellen sezernierte Hsp60-Ig-Fusionsprotein als auch das membranverankerte Hsp60-Protein auf der Zelloberfläche von transient transfizierten COS1-Zellen oder verschiedenen stabil transfizierten X63-Klonen führte im Vergleich zu Testkulturen mit Hsp60-negativen COS1-Zellen oder X63-Klonen *in vitro* zu einer statistisch signifikanten Steigerung der Produktion des Zytokins IFN $\gamma$  bei der antigenabhängigen Aktivierung naiver CD4<sup>+</sup>-T-Zellen (siehe Abschnitt 3.3.2) und CD8<sup>+</sup>-T-Zellen (Daten nicht gezeigt). Im Vergleich mit Hsp60-negativen Kontrollzellen wurde etwa eine Verdopplung der IFN $\gamma$ -Konzentration im Kulturüberstand beobachtet. Der adjuvante Effekt von Hsp60 bei der T-Zellaktivierung war abhängig von der Anzahl der eingesetzten Hsp60-exprimierenden Zellen und damit von der Hsp60-Konzentration im Testsystem.

Die Steigerung der IFN $\gamma$ -Produktion in T-Zellen war Hsp60-spezifisch, wie folgende Kontrollen zeigen: 1. Der immunstimulatorische Effekt des Hsp60-Proteins wurde bei Einsatz verschiedener mHsp60-exprimierender X63-Zellklone gegenüber verschiedenen Hsp60-negativen X63-Zellklonen beobachtet. 2. Da weder mHsp60-exprimierende X63-Zellklone noch Hsp60-negative X63-Zellklone die für die Präsentation des verwendeten OVA-Peptidantigens an DO11.10-T-Zellen notwendigen MHC II-Moleküle des I-A<sup>d</sup>-Haplotyps exprimierten (Daten nicht gezeigt), kann die verstärkte IFN $\gamma$ -Freisetzung nicht auf eine verstärkte MHC-Expression einzelner Klone zurückgeführt werden. Aufgrund dieser Kontrollen beruht der adjuvante Effekt von Hsp60 nicht auf der klonalen Varianz einzelner stabil transfizierter Zellklone. 3. Desweiteren wurde eine verstärkte Produktion von IFN $\gamma$  auch in Gegenwart von transient transfizierten Hsp60-Ig- oder mHsp60-exprimierenden COS1-Zellen gegenüber COS1-Zellen, die mit dem entsprechenden Vektor ohne Hsp60-Insert transfiziert waren, beobachtet (siehe Abschnitt 3.2.2.1 und 3.2.2.3). Diese Zellen wurden bereits vierundzwanzig oder achtundvierzig Stunden nach der Transfektion im *in vitro*-Testsystem eingesetzt, so dass die Ausbildung spezifischer zellulärer Varianzen aus zeitlichen Gründen ausgeschlossen ist.

Diese Ergebnisse belegen die biologische Funktionalität sowohl des Hsp60-Ig-Proteins als auch des auf der Oberfläche von COS1-Zellen oder X63-Zellen exprimierten membrangebundenen Hsp60-Proteins und zeigen, dass das murine Hsp60-Protein über eine intrinsische immunmodulatorische Aktivität verfügt, die stimulierend auf die Expression des Zytokins IFN $\gamma$  bei der antigenabhängigen Aktivierung von T-Zellen wirkt. Diese Beobachtungen bestätigen die bei Moré et al. (2001) und Breloer et al. (2001 und 2002) beschriebene immunstimulatorische Funktion des Hsp60-Proteins.

Der Einfluss von Hsp60 auf die Aktivierung von NK-Zellen, die zu den wichtigsten IFN $\gamma$ -produzierenden Zellen des angeborenen Immunsystems gehören (Übersicht bei Biron und Brossay, 2001; Das et al., 2001), wurde bislang noch nicht untersucht. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen jedoch, dass eine Beteiligung von NK-Zellen an der durch Hsp60 stimulierten IFN $\gamma$ -Expression unwahrscheinlich ist, da Hsp60 auch in T-Zellpräparationen, aus denen die DX5<sup>+</sup>-NK-Zellen nahezu vollständig depletiert worden waren, die Produktion von IFN $\gamma$  gleichermaßen stimulieren konnte (siehe Abschnitt 3.3.3). Bei der Hsp60-responsiven Zellpopulation, die auf die Gegenwart dieses Hitzeschockproteins mit der Produktion von IFN $\gamma$  reagiert, handelt es sich deshalb wahrscheinlich ausschließlich um T-Zellen.



Das von T-Zellen und NK-Zellen produzierte Zytokin IFN $\gamma$  spielt eine wichtige Rolle bei der Abwehr verschiedener bakterieller und viraler Pathogene (Weiss et al., 1992; Dai et al., 1997; Lohman und Welsh, 1998; Übersicht bei Harty et al., 2000). Die frühe Freisetzung von IFN $\gamma$  begünstigt dabei eine Differenzierung von CD4<sup>+</sup>-T-Zellen zu T<sub>H</sub>1-Zellen und von CD8<sup>+</sup>-T-Zellen zu zytotoxischen Effektorzellen (Übersicht bei Mosmann und Coffman, 1989; Das et al., 2001), die für die Verteidigung des Organismus gegenüber diesen Pathogenen wichtig sind. Die Stimulation der IFN $\gamma$ -Produktion durch Hsp60 führt zu der Vermutung, das autologes Hsp60, das bei einer Infektion oder anderen Stresssituationen von körpereigenen Zellen in die Umgebung freigesetzt oder auch auf der Zelloberfläche präsentiert wird (Basu et al., 2000; Belles et al., 1999), als immunologischer Signalverstärker einen wichtigen Beitrag zur Ausbildung und Differenzierung einer adaptiven Immunantwort in Richtung einer T<sub>H</sub>1- und CTL-Antwort leisten kann. Eine solche Funktion des Hsp60-Proteins wurde bereits früher vorgeschlagen (Breloer et al., 2001; Flohé et al. 2003).

#### **4.4 Untersuchungen zum Mechanismus der adjuvanten Funktion von Hsp60**

##### **4.4.1 Rezeptoren**

###### **4.4.1.1 Hsp60 bindet an spezifische Rezeptoren auf der Oberfläche von APZ**

T-Zellen benötigen für ihre Aktivierung akzessorische antigenpräsentierende Zellen (APZ) wie Makrophagen und dendritische Zellen, die das notwendige kostimulatorische Signal vermitteln können (Übersicht bei Croft und Dubey, 1997). Für verschiedene HSP wurde ein modulatorischer Einfluss auf APZ-Funktionen wie die Freisetzung von Zytokinen, die die T-Zellaktivierung beeinflussen, beschrieben (Chen et al., 1999; Basu et al., 2000; Singh-Jasuja et al., 2000; Asea et al., 2000; Kol et al., 2000; Panjwani et al., 2000; Moré et al., 2001; Breloer et al., 2002), und es wurde gezeigt, dass HSP spezifisch an die Oberfläche von APZ wie Makrophagen und DC binden (Singh-Jasuja et al., 2000; Basu et al., 2001; Habich et al., 2002; Becker et al., 2002; Delneste et al., 2002; Übersicht bei Binder et al., 2004).

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass sowohl das rekombinante murine Hsp60-Ig-Fusionsprotein als auch humanes Hsp60 an die Zelloberfläche von murinen peritonealen Makrophagen binden (siehe Abschnitt 3.4.2.1). Die Bindung beider Proteine war

Hsp60-spezifisch, weil erstens die Bindung von FITC-markiertem humanen Hsp60 durch Präinkubation der Zellen mit unmarkiertem Hsp60 als Kompetitor inhibiert werden konnte, und zweitens im Gegensatz zu Hsp60-Ig die Bindung eines Kontroll-Ig-Fusionsproteins (humanes CD83-Ig) erwartungsgemäß nicht nachgewiesen werden konnte. Da beide Fusionsproteine über einen identischen Ig-Teil verfügen, erfolgt die Bindung des Hsp60-Ig-Proteins an die Makrophagenoberfläche unabhängig vom Ig-Teil und ist deshalb Hsp60-spezifisch. Diese Ergebnisse bestätigen die früher gezeigte spezifische Bindung von Hsp60 an die Oberfläche von APZ (Habich et al., 2002; Habich et al., 2003) und belegen erneut die Funktionalität des Hsp60-Ig-Fusionsproteins.

Als ein genereller Rezeptor für verschiedene HSP, darunter Hsp70, gp96 und Hsp90, wurde der  $\alpha$ 2Makroglobulin-Rezeptor (CD91) beschrieben (Basu et al., 2001; Übersicht bei Binder et al., 2004). Weitere Rezeptoren, die mit der Bindung und Aktivierung von APZ durch HSP in Verbindung gebracht werden, sind CD36 und Lox-1, die Mitglieder derselben Scavenger-Rezeptorfamilie wie CD91 sind, sowie CD40 (Übersicht bei Binder et al., 2004). CD36 scheint eine wichtige Rolle bei der Bindung und Phagozytose von gp96 zu besitzen. So wurde gezeigt, dass Makrophagen aus CD36-Knockout-Mäusen eine deutlich reduzierte Aufnahme von gp96 und gp96-assoziierten Peptiden aufweisen (Panjwani et al., 2000). Eine vergleichbare Funktion wurde auch für Lox-1 bei der Bindung und Endozytose von Hsp70 und Hsp70-assoziierten Peptiden durch humane DC gezeigt (Delneste et al., 2002). CD40 wurde als signalgebender Rezeptor für mycobakterielles, jedoch nicht eukaryontisches Hsp70 (Wang et al., 2001), sowie als endozytotischer Rezeptor für murines Hsp70 beschrieben (Becker et al., 2002). Scavenger-Rezeptoren wie CD91, CD36 und Lox-1 scheinen somit auch eine Funktion bei der Erkennung von autologen HSP zu besitzen.

Die Identität des oder der für die Bindung von Hsp60 verantwortlichen Rezeptoren auf der Oberfläche monozytärer Zellen ist noch nicht bekannt. Da die Bindung des Hsp60-Proteins an die Oberfläche von J774- und RAW264.7-Makrophagen nicht durch Präinkubation der Zellen mit anderen HSP wie Hsp70 und gp96 kompetiert wird (Habich et al., 2002), scheinen die an der Bindung dieser HSP beteiligten oben angeführten Rezeptoren für die Bindung von Hsp60 nicht verantwortlich zu sein.

Die Bindung von Hsp60 wird jedoch durch spezifische Rezeptoren vermittelt (Habich et al., 2002). Dabei kompetieren Hsp60-Proteine verschiedener eukaryontischer Spezies wie Mensch, Maus und Ratte um dieselbe Bindungsstelle auf der Oberfläche von

Makrophagen (Habich et al., 2003). Die Bindung des humanen Hsp60-Proteins an die Makrophagenoberfläche konnte durch einen Hsp60-spezifischen Antikörper blockiert und das für die Bindung verantwortliche Hsp60-Epitop in der C-terminalen Region des Hsp60-Proteins (p481-p500) lokalisiert werden (Habich et al., 2004).

In der Literatur finden sich Hinweise darauf, dass der CD14-Rezeptor, der Bestandteil des LPS-Rezeptorkomplexes ist, an der Bindung von Hsp60 beteiligt ist. Die Bindung des humanen Hsp60-Proteins, jedoch nicht des murinen Hsp60-Proteins, an den humanen CD14-Rezeptor wurde von Breloer et al. (2002) gezeigt. Der CD14-Rezeptor sowie die mit diesem Rezeptor assoziierten signalgebenden Toll-like-Rezeptoren TLR4 (Übersicht bei Beutler, 2000; Übersicht bei Takeda et al., 2003) und TLR2 (Yang et al., 1998; Kirschning et al., 1998; Manukyan et al., 2005) werden außerdem mit der durch Hsp60 induzierten Immunstimulation in Verbindung gebracht (Ohashi et al., 2000; Kol et al., 2000; Vabulas et al., 2001; Zanin-Zhorov et al., 2003; Zanin-Zhorov et al., 2005).

#### 4.4.1.2 Funktion von TLR

Für die Hsp60-stimulierte IFN $\gamma$ -Produktion bei der T-Zellaktivierung wurde die Modulation von APZ-Funktionen verantwortlich gemacht (Chen et al., 1999; Breloer et al., 2001; Moré et al., 2001; Breloer et al., 2002; Flohé et al., 2003). Wie zuvor beschrieben liefert die Literatur einige Hinweise darauf, dass an der Stimulation der Zytokinproduktion und der Expression kostimulatorischer Oberflächenmoleküle in Makrophagen und DC durch Hsp60 der LPS-Rezeptorkomplex CD14/TLR4 beteiligt ist (Kol et al., 2000; Vabulas et al., 2001). Um die Bedeutung von TLR4 bei der Hsp60-induzierten Stimulation der IFN $\gamma$ -Produktion bei der T-Zellaktivierung zu überprüfen, wurden peritoneale Makrophagen und T-Zellen aus C3HHeN-Wildtypmäusen und C3HHeJ-Mäusen eingesetzt. Letztere besitzen eine Punktmutation, die zu einem Aminosäureaustausch in der zytoplasmatischen Domäne des TLR4-Rezeptors führt (P712H) (Poltorak et al., 1998). Der in C3HHeJ-Mäusen exprimierte TLR4 ist deshalb nicht funktionell, und die Tiere sind gegenüber LPS nur noch schwach responsiv (Poltorak et al., 1998). Verschiedene PEC/T-Zellkombinationen aus C3HHeN-Wildtyp- und C3HHeJ-Mäusen wurden in Gegenwart von mHsp60-exprimierenden X63-Zellen oder LPS mit anti-CD3 stimuliert. Erwartungsgemäß steigerte LPS in diesem System in Abwesenheit eines funktionellen TLR4 eine Steigerung der IFN $\gamma$ -Produktion kaum (Poltorak et al., 1998). In dieser Arbeit konnte jedoch erstmals gezeigt werden, dass Hsp60 sowohl in Gegenwart von APZ, die über einen intakten TLR4 verfügen, als auch

APZ, die einen disfunktionellen TLR4 exprimieren, eine Steigerung der IFN $\gamma$ -Expression in Wildtyp- wie auch TLR4-mutanten T-Zellpräparationen induzieren konnte (siehe Abschnitt 3.4.3.1). Wildtyp- wie TLR4-defekte PEC erwiesen sich hierbei als gleichermaßen kompetente APZ, die auch in C3HHeJ-T-Zellpräparationen eine durch Hsp60-gesteigerte IFN $\gamma$ -Antwort induzieren konnten. Die Steigerung der IFN $\gamma$ -Expression in T-Zellen durch Hsp60 in Abwesenheit bakterieller PAMP ist somit, entgegen den in der Literatur beschriebenen Beobachtungen (Kol et al., 2000; Vabulas et al., 2001), unabhängig von funktionellem TLR4 auf APZ.

Neben dem CD14/TLR4-Komplex wurde Hsp60 (Vabulas et al., 2001; Kol et al., 2000) wurde Hsp60 wie auch LPS ebenfalls als Ligand für TLR2 beschrieben (Yang et al., 1998; Kirschning et al., 1998; Vabulas et al., 2001; Zhanin-Zhorov et al., 2003; Zhanin-Zhorov et al., 2005). TLR2 wird wie TLR4 hauptsächlich auf der Oberfläche monozytärer Zellen wie Makrophagen und DC exprimiert und assoziiert ebenfalls mit CD14 (Yang et al., 1998; Kirschning et al., 1998; Manukyan et al., 2005). TLR2 interagiert darüber hinaus mit weiteren TLR wie TLR1 und TLR6 (Ozinsky et al., 2000; Hajjar et al., 2001). Diese Interaktionen resultieren wahrscheinlich in einem erweiterten Repertoire von Liganden, die durch diesen TLR erkannt werden können. Der zentrale Signalweg, der von nahezu allen TLR genutzt wird, verläuft über das Adaptermolekül MyD88, dessen Engagement schließlich zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B und zur NF- $\kappa$ B-induzierten Zytokinfreisetzung und Expression kostimulatorischer Moleküle führt (Übersicht bei Janeway und Medzhitov, 2002). Deshalb wurde ebenfalls die Bedeutung dieses zentralen Adaptermoleküls für die Hsp60-induzierte Steigerung der IFN $\gamma$ -Produktion in T-Zellen untersucht. Dabei zeigte sich, dass auch der TLR-assozierte MyD88-Signalweg für den adjuvanten Effekt des Hsp60-Proteins bei der Aktivierung von T-Zellen entbehrlich ist, da die Gegenwart von Hsp60 auf der Zelloberfläche von X63-Zellen in MyD88<sup>-/-</sup>-Milzzellen eine vergleichbare Steigerung der IFN $\gamma$ -Produktion wie in Wildtyp- oder TLR4-defekten Milzzellen bei Stimulation des TCR mit anti-CD3 steigern konnte (siehe Abschnitt 3.4.3.2). Im Gegensatz hierzu konnte LPS in MyD88<sup>-/-</sup>-Milzzellen keinen stimulatorischen Effekt vermitteln.

Da für den putativen Hsp60-Rezeptor TLR2 ein MyD88-unabhängiger Signalweg nicht bekannt ist, bleibt unklar, ob dieser Rezeptor für den stimulatorischen Effekt von Hsp60 bei der T-Zellaktivierung von Bedeutung ist. Generell scheint jedoch eine Beteiligung

von TLR2 und TLR4 an der Hsp60-induzierten Signalvermittlung aufgrund der Entbehrlichkeit des MyD88-Signalweges eher unwahrscheinlich.

Die in der Literatur beschriebene Abhängigkeit der Hsp60-vermittelten Immunstimulation von TLR4 (Ohashi et al., 2000; Vabulas et al., 2001) und TLR2 (Vabulas et al., 2001; Zanin-Zhorov et al., 2003) ist wahrscheinlich auf eine Kontamination der verwendeten Proteinpräparationen mit LPS und/oder anderen bakteriellen PAMP zurückzuführen.

#### **4.4.2 Modulation von APZ-Funktionen**

##### **4.4.2.1 Expression kostimulatorischer B7-Moleküle**

Es wurde gezeigt, dass sowohl bakterielles als auch rekombinant in Bakterien erzeugtes eukaryontisches Hsp60 ebenso wie LPS in Makrophagen und DC neben der Freisetzung von Zytokinen zu einer gesteigerten Expression der kostimulatorischen B7-Moleküle CD80 (B7.1) und CD86 (B7.2) auf der Zelloberfläche dieser APZ führt (Moré, 2001; Moré et al., 2001; Flohé et al., 2003). Die Expression kostimulatorischer Zelloberflächenmoleküle trägt wesentlich zur Initiation einer adaptiven Immunantwort bei und kann bei der durch Hsp60-vermittelten Steigerung der IFN $\gamma$ -Produktion in T-Zellen eine wichtige Rolle spielen.

In dieser Arbeit wurde mit Hilfe der Hsp60-exprimierenden Zelllinien der Einfluss des Hsp60-Proteins auf die Expression kostimulatorischer Moleküle und auf die Produktion von Zytokinen durch Makrophagen im Endotoxin-freien Testsystem untersucht und mit der Stimulation dieser APZ-Funktionen durch LPS verglichen. Obwohl das in dieser Arbeit erzeugte murine Hsp60-Ig-Fusionsprotein spezifisch an die Oberfläche von Makrophagen bindet, wurde weder in Gegenwart von Hsp60-Ig-sezernierenden COS1-Zellen (Daten nicht gezeigt) noch mHsp60-exprimierenden COS1- oder X63-Zellen eine Expressionssteigerung der kostimulatorischen B7-Moleküle B7.1 (CD80) und B7.2 (CD86) beobachtet. Im Gegensatz hierzu wurden beide Kostimulatoren bei Aktivierung der Makrophagen durch LPS verstärkt exprimiert.

Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die von Moré et al. (2001) und Flohé et al. (2003) gezeigte verstärkte Expression dieser kostimulatorischen Moleküle durch Hsp60 auf Kontaminationen der verwendeten Hsp60-Präparation mit bakteriellen Komponenten zurückzuführen ist. Da die Expression von CD80 und CD86 durch Hsp60 nicht gesteigert wird, spielen diese Moleküle wahrscheinlich keine Rolle bei der Hsp60-vermittelten Stimulation der IFN $\gamma$ -Produktion bei der T-Zellaktivierung.

#### 4.4.2.2 Zytokinexpression

Neben der Expression kostimulatorischer Moleküle auf der Zelloberfläche von APZ wurde gezeigt, dass sowohl bakterielles wie auch eukaryontisches Hsp60 ebenso wie LPS in Makrophagen und DC die Freisetzung von Zytokinen, darunter IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, IL-12 und TNF $\alpha$  stimuliert (Chen et al., 1999; Kol et al., 2000; Moré et al., 2001; Breloer et al., 2002; Ueki et al., 2002; Wallin et al., 2002). Insbesondere die von APZ wie Makrophagen und DC produzierten Zytokine IL-6, IL-12 und TNF $\alpha$  leisten *in vivo* nicht nur einen wichtigen Beitrag zur Initiation einer adaptiven Immunantwort, sondern bestimmen auch maßgeblich deren Polarisierung in Richtung einer T<sub>H</sub>1- oder T<sub>H</sub>2-Antwort. So induziert IL-6 nicht nur die Produktion von Proteinen der akuten Phase (Barton et al., 1997), sondern wurde auch als Wachstums- und Differenzierungsfaktor sowohl in der B- als auch T-Zellentwicklung beschrieben (Cerutti et al., 1998). Auch TNF $\alpha$  spielt eine wichtige Rolle bei der Verteidigung des Organismus nicht nur gegenüber Infektionen mit pathogenen Erregern, sondern auch maligne entarteten körpereigenen Zellen. Dieses Zytokin ist wesentlich an der Ausbildung einer lokalen Entzündungsantwort beteiligt und besitzt vielfältige Funktionen. Hauptsächlich wirkt TNF $\alpha$  autokrin wie parakrin aktivierend auf Monozyten/Makrophagen, in denen es die Produktion von Chemokinen und Zytokinen induziert (Übersicht bei Vilcek und Lee, 1991; Übersicht bei Ruddle, 1992). Daneben stimuliert TNF $\alpha$  die Reifung von DC sowie deren Wanderung zu den Lymphknoten (Cerutti et al., 1998), wo die Initiation der adaptiven Immunantwort erfolgt, und unterstützt, wahrscheinlich durch Stimulation der IL-12-Produktion in APZ, auch die Polarisierung der Immunreaktion in Richtung einer T<sub>H</sub>1-Antwort (Becher et al., 1999). IL-12 besitzt eine besonders wichtige, zwischen dem angeborenen und adaptiven Immunsystem vermittelnde Funktion. IL-12 induziert sowohl in NK-Zellen als auch T-Zellen die Produktion von TNF $\alpha$  und IFN $\gamma$  (Übersicht bei Langrish et al., 2004), die ihrerseits Effektorfunktionen von Makrophagen modulieren (Übersicht bei Billiau, 1996), und fördert die Differenzierung von CD4<sup>+</sup>-T-Zellen zu T<sub>H</sub>1-Zellen und von CD8<sup>+</sup>-T-Zellen zu zytotoxischen Effektorzellen (Macatonia et al., 1995; O'Garra et al., 1995; Billiau 1996). In Abwesenheit von IL-12 wird dagegen die Entwicklung einer T<sub>H</sub>2-Antwort begünstigt (Velupillai und Harn, 1994; Übersicht bei Trinchieri, 2003).

Bislang wurde angenommen, dass die durch Hsp60 stimulierte IFN $\gamma$ -Produktion in T-Zellen hauptsächlich auf die Induktion der IL-12-Produktion und der Expression

kostimulatorischer Moleküle in APZ durch Hsp60 zurückzuführen ist (Moré et al., 2001; Breloer et al., 2002; Flohé et al., 2003). Wie beschrieben konnte die Stimulation der Expression kostimulatorischer B7-Moleküle in APZ durch Hsp60 nicht bestätigt werden. Deshalb wurde weiter die Induktion der Zytokine IL-6, IL-12 und TNF $\alpha$  in Makrophagen in Gegenwart Hsp60-exprimierender Zellen untersucht. Dabei konnte weder das von COS1-Zellen sezernierte Hsp60-Ig-Fusionsprotein noch das auf der Zelloberfläche von COS1- oder X63-Zellen präsentierte Hsp60-Protein die Freisetzung messbarer Mengen der Zytokine IL-6, IL-12 und TNF $\alpha$  in peritonealen Makrophagen sowie der Makrophagenlinie RAW264.7 induzieren. Darüber hinaus konnte in peritonealen Makrophagen nach Koinkubation mit mHsp60-exprimierenden COS1-Zellen auch mit Hilfe der PCR keine Induktion der mRNA-Expression der IL-12-Untereinheiten p35 und p40 festgestellt werden. Im Gegensatz hierzu sezernierten RAW264.7 wie auch peritoneale Makrophagen (Daten nicht gezeigt), die mit LPS stimuliert worden waren, große Mengen IL-6, IL-12 und TNF $\alpha$ . Die Induktion der mRNA-Expression der p35- und p40-Untereinheiten des IL-12 konnte bei Stimulation der Makrophagen mit LPS zudem auch in der spezifischen PCR gezeigt werden.

Darüber hinaus wurde die Expression der p19-Untereinheit des IL-23 untersucht. Sie ist der p35-Kette des IL-12 strukturell verwandt und bildet in Assoziation mit der p40-Untereinheit das funktionelle Zytokin IL-23 (Oppmann et al., 2000). Trotz ihrer strukturellen Verwandtschaft besitzen IL-23 und IL-12 distinkte Funktionen (Übersicht bei Langrish et al., 2004). Im Gegensatz zu IL-12, das die Differenzierung naiver CD4<sup>+</sup>-T-Zellen zu IFN $\gamma$ -produzierenden T<sub>H</sub>1-Zellen fördert, spielt IL-23 wahrscheinlich eine Rolle bei der Aktivierung von T-Gedächtniszellen, die den IL-23-Rezeptor verstärkt exprimieren und auf IL-12 nur schwach reagieren (Oppmann et al., 2000). Die Expression von IL-23 wird in DC und Makrophagen wie die von IL-12 ebenfalls durch bakterielle PAMP induziert. Eine verstärkte Expression der p19-Untereinheit dieses Zytokins wurde bei Stimulation humaner DC und Makrophagen mit Gram-negativen Bakterien wie *Escherichia coli* (Jefford et al., 2003), vor allendingen aber mit Gram-positiven Bakterien beobachtet (Smits et al., 2004). Ob Hsp60 die Expression des IL-23-Zytokins steigert, wurde bislang noch nicht untersucht. In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass Hsp60, das den Makrophagen auf der Oberfläche von COS1-Zellen präsentiert wurde, im Gegensatz zu LPS die Expression der p19-Untereinheit des IL-23 nicht induzieren konnte.

Diese Ergebnisse bestätigen die von Gao und Tsan publizierten Beobachtungen (Gao und Tsan, 2003; Gao und Tsan, 2004), die die durch Hsp60 induzierte Zytokinfreisetzung generell in Frage stellen. Sie konnten zeigen, dass von LPS gereinigtes Hsp60 in der Makrophagenlinie RAW264.7 die Produktion von TNF $\alpha$  und IL-1 $\beta$  sowie die mRNA-Expression von vielen weiteren Zytokinen nicht mehr induzieren konnte.

Zusammen mit den Ergebnissen dieser Arbeit deuten diese Resultate darauf hin, dass die bei Stimulation von Makrophagen mit rekombinantem Hsp60-Protein beobachtete Zytokinfreisetzung auf eine Verunreinigung der Proteinpräparationen mit bakteriellen Endotoxinen zurückzuführen und nicht dem Hsp60-Protein selbst zuzuschreiben ist.

#### **4.4.2.3 Rolle von Zytokinen bei der Hsp60-vermittelten T-Zellstimulation**

Obwohl Hsp60 im Endotoxin-freien Testsystem in APZ weder die Expression kostimulatorischer Oberflächenmoleküle noch die Freisetzung der untersuchten Zytokine induzieren konnte, wurde in Gegenwart von membrangebundenem Hsp60 oder löslichem Hsp60-Ig eine verstärkte Freisetzung des Zytokins IFN $\gamma$  bei der antigenabhängigen Aktivierung naiver T-Zellen beobachtet. Hierbei könnten auch geringe Zytokinmengen, die mit den zur Verfügung stehenden Mitteln möglicherweise nicht mehr nachweisbar waren, eine Rolle spielen. Bei der T-Zellaktivierung stehen APZ und T-Zelle in engem Kontakt (Kupfer und Kupfer, 2003), so dass über die kurze Distanz innerhalb der immunologischen Synapse auch geringe Zytokinkonzentrationen eine biologische Wirkung entfalten können. Zudem sind komplexe Rückkopplungsmechanismen bekannt, die sowohl autokrin wie auch parakrin wirksam sein können. Beispielsweise wirkt das von den T-Zellen produzierte IFN $\gamma$  seinerseits aktivierend auf APZ wie DC und Makrophagen ein und verstärkt unter anderem die Expression von IL-12 (Ma et al., 1996).

Um den Beitrag der Zytokine IL-6, IL-12 und TNF $\alpha$  bei der Hsp60-vermittelten Steigerung der IFN $\gamma$ -Produktion in T-Zellen zu untersuchen, wurden im *in vitro*-Testsystem zur Stimulation naiver CD4<sup>+</sup>-T-Zellen neutralisierende Antikörper eingesetzt, die die biologische Aktivität der genannten Zytokine inhibieren. Die Ergebnisse dieser Experimente haben erstmals gezeigt, dass weder IL-6 und TNF $\alpha$  noch IL-12 bei der Hsp60-vermittelten Steigerung der IFN $\gamma$ -Produktion bei der Aktivierung naiver CD4<sup>+</sup>- T-Zellen eine Rolle spielen. Im Gegensatz hierzu konnte sowohl die



Neutralisation von TNF $\alpha$ - als auch IL-12, nicht aber die Inhibition von IL-6, die LPS-induzierte IFN $\gamma$ -Sekretion drastisch reduzieren. Im Gegensatz zu Hsp60 ist deshalb die Stimulation der IFN $\gamma$ -Produktion in T-Zellen durch LPS abhängig von TNF $\alpha$  und IL-12. Zudem belegt diese Kontrolle die neutralisierende biologische Aktivität der verwendeten Antikörper in der hier eingesetzten Konzentration im Testsystem.

Dass Hsp60 die IFN $\gamma$ -Produktion in T-Zellen tatsächlich unabhängig von IL-12 und auch IL-23 stimulieren kann, wurde schließlich eindeutig bei der Stimulation von APZ und T-Zellen aus IL-12p40<sup>-/-</sup>-Mäusen demonstriert. Die Zellen dieser Tiere exprimieren durch die Deletion der gemeinsamen p40-Untereinheit von IL-12 und IL-23 weder funktionelles IL-12 noch IL-23 (Magram et al., 1996). Dennoch wurde in Gegenwart von mHsp60-exprimierenden X63-Zellen die durch das TCR-Engagement über anti-CD3 induzierte IFN $\gamma$ -Expression signifikant gesteigert. LPS hatte hingegen in diesem System erwartungsgemäß keinen Einfluss auf die IFN $\gamma$ -Produktion.

Die Steigerung der IFN $\gamma$ -Freisetzung durch T-Zellen bei Stimulation mit LPS ist somit strikt von IL-12 und auch TNF $\alpha$ , deren Expression in APZ durch LPS induziert wird, abhängig. Hsp60 dagegen stimuliert die IFN $\gamma$ -Produktion in T-Zellen unabhängig von IL-6, IL-12, IL-23 und TNF $\alpha$ . Dieses Ergebnis steht im Widerspruch zu den von Breloer et al. (2001 und 2002) publizierten Resultaten, die die Abhängigkeit der Hsp60-induzierten IFN $\gamma$ -Produktion in T-Zellen von dem von APZ produzierten Zytokin IL-12 zeigen, und deutet darauf hin, dass die beobachteten Effekte wahrscheinlich auf eine Kontamination des verwendeten Hsp60-Proteins mit bakteriellen Endotoxinen wie LPS zurückzuführen ist.

Weitere Zytokine, die einen wichtigen Beitrag zur Induktion und Polarisierung einer T<sub>H</sub>1- und CTL-Immunantwort leisten, sind die Typ I-Interferone IFN $\alpha$  und IFN $\beta$ . Ihre Expression wird in monozytären Zellen über TLR induziert, die neben dem zentralen MyD88-Signalweg, der zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B führt, zusätzlich einen alternativen Signalweg nutzen, der in der Aktivierung des IFN-regulierenden Transkriptionsfaktors IRF3 und der Expression der Typ I-Interferone resultiert (Akira und Hoshino, 2003; Übersicht bei Imler und Hoffmann, 2003; Übersicht bei Barton und Medzhitov, 2003). Zu diesen TLR gehört neben TLR3, 7 und 9 auch der putative signalgebende Hsp60-Rezeptor TLR4 (Übersicht bei Imler und Hoffmann, 2003; Übersicht bei Barton und Medzhitov, 2003; Übersicht bei Malmgaard, 2004). IFN $\alpha$  und IFN $\beta$  sind insbesondere bei der Initiation antiviraler Immunantworten

(Übersicht bei Malmgaard, 2004; Übersicht bei Theofilopoulos, 2004), aber auch bei der Bekämpfung und Immunotherapie von Tumoren von Bedeutung (Gutterman, 1994; Übersicht bei Grander und Einhorn, 1998; Übersicht bei Smyth et al., 2004). Sie aktivieren wie IL-12 in DC und T-Zellen ebenfalls die Produktion von IFN $\gamma$  und tragen so zur Induktion und Aufrechterhaltung einer T<sub>H</sub>1- und CTL-Immunantwort bei (Brinkmann et al., 1993; Cousens et al., 1999; Montoya et al., 2002; Übersicht bei Smyth et al., 2004). Zudem inhibieren sie zwar die Produktion von IL-12, stimulieren jedoch die Expression der hochaffinen IL-12-Rezeptoruntereinheit IL-12R $\beta$ 2 in CD4<sup>+</sup>-T-Zellen (Biron, 2001). Auf diese Weise steigern die Typ I-Interferone die Responsivität der CD4<sup>+</sup>-T-Zellen gegenüber dem IFN $\gamma$ -induzierenden Zytokin IL-12 und leisten so einen weiteren Beitrag zur Ausbildung einer T<sub>H</sub>1-Antwort.

Auch die Beteiligung der Typ I-Interferone IFN $\alpha$  und IFN $\beta$  an der adjuvanten Wirkung von Hsp60 bei der T-Zellaktivierung wurde durch den Einsatz neutralisierender Antikörper untersucht. Hierbei wurde festgestellt, dass die Steigerung der IFN $\gamma$ -Antwort in Gegenwart mHsp60-exprimierender X63-Zellen bei Neutralisation von IFN $\alpha$  schwächer ausgeprägt war als in den Kontrollkulturen ohne oder mit anti-IL-12-Kontrollantikörper oder bei Blockade von IFN $\beta$ . Dieses Ergebnis deutet auf eine mögliche Funktion von IFN $\alpha$  bei der durch Hsp60 vermittelten Steigerung der IFN $\gamma$ -Expression in T-Zellen hin. Auf die Stimulation der IFN $\gamma$ -Produktion durch LPS hatte die Inhibition dieser Zytokine hingegen keinen Einfluss. Da LPS aber die Sekretion großer Mengen IL-12 und anderer Zytokine in Makrophagen induziert, können diese vermutlich das Fehlen der Typ I-Interferone bei der Induktion von IFN $\gamma$  in T-Zellen kompensieren.

Da weder ein IFN $\alpha$ - noch IFN $\beta$ -spezifischer ELISA zur Verfügung stand, konnte weder die Expression dieser Zytokine in APZ noch die neutralisierende Wirkung der anti-IFN $\alpha$ - und anti-IFN $\beta$ -Antikörper wie bei der Inhibition von IL-6, IL-12 und TNF $\alpha$  durch die entsprechenden Antikörper überprüft werden. Unklar bleibt deshalb, ob die zur Neutralisation der Typ I-Interferone eingesetzten Antikörper die Aktivität dieser Zytokine vollständig inhibieren konnten. Insbesondere die Neutralisation von IFN $\alpha$  ist möglicherweise schwierig. Während IFN $\beta$  ein singuläres Mitglied der Typ I-Interferonfamilie ist, zu der neben IFN $\alpha$  und IFN $\beta$  in der Maus die Interferone  $\epsilon$ ,  $\kappa$ ,  $\omega$  und  $\tau$  gehören, sind in der Maus wie beim Menschen zwanzig IFN $\alpha$ -Gene bekannt. Dreizehn von diesen kodieren funktionelle IFN $\alpha$ -Subtypen (Schlaak et al., 2002;

Theofilopoulos et al., 2005). Bei dem hier eingesetzten neutralisierenden Antikörper gegen IFN $\alpha$  handelt es sich jedoch um einen monoklonalen Antikörper, der wahrscheinlich nicht alle IFN $\alpha$ -Subtypen inhibieren kann. Dennoch konnte dieser Antikörper die Hsp60-stimulierte IFN $\gamma$ -Produktion bereits deutlich reduzieren. Ein wichtiges Ziel ist deshalb, die Funktion dieses Zytokins bei der Hsp60-vermittelten Zytokinproduktion in T-Zellen durch den Einsatz neutralisierender polyklonaler Antikörper zu überprüfen.

#### **4.4.3 Kostimulation mit LPS-kontaminiertem und LPS-freiem Hsp60 – zwei voneinander unabhängige biologisch relevante Mechanismen?**

Die bislang diskutierten Ergebnisse haben gezeigt, dass sowohl Hsp60 als auch LPS bei der antigenabhängigen Aktivierung naiver T-Zellen die IFN $\gamma$ -Produktion verstärken. Hsp60 und LPS scheinen dabei jedoch unterschiedliche Mechanismen zu nutzen.

Die LPS-vermittelte Stimulation der IFN $\gamma$ -Freisetzung ist abhängig von TLR4 und dem TLR-assoziierten MyD88-Signalweg, der zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B und in der Folge zur Produktion von Zytokinen wie IL-12 und TNF $\alpha$  und zu einer gesteigerten Expression kostimulatorischer B7-Moleküle auf der Oberfläche von APZ führt. Insbesondere die in APZ induzierte IL-12- und TNF $\alpha$ -Freisetzung ist essentiell für die durch LPS stimulierte IFN $\gamma$ -Produktion in T-Zellen. Ähnliche Beobachtungen wurden auch mit rekombinant in Bakterien erzeugtem eukaryontischen Hsp60-Protein gemacht, das wahrscheinlich mit bakteriellen Endotoxinen kontaminiert war.

Im Gegensatz hierzu konnte Hsp60 im Endotoxin-freien Testsystem in Makrophagen weder die Expression von IL-6, IL-12, IL-23 und TNF $\alpha$  noch der kostimulatorischen B7-Moleküle aktivieren. Diese Faktoren spielten außerdem bei der Stimulation der IFN $\gamma$ -Expression in T-Zellen durch Hsp60 im Gegensatz zu LPS keine Rolle.

Von Habich et al. wurde vorgeschlagen, dass Hsp60 möglicherweise als Transportprotein für bakterielles LPS fungieren kann. Habich et al. zeigten in ihrer 2005 publizierten Studie, dass Hsp60 spezifisch bakterielles LPS bindet und identifizierten außerdem das für die Bindung von LPS verantwortliche Epitop des Hsp60-Proteins (p351-365) (Habich et al., 2005). Darüber hinaus steigerte die Anwesenheit von Hsp60 die LPS-induzierte TNF $\alpha$ -Produktion in RAW264.7-Makrophagen in einer synergistischen Art und Weise (Habich et al., 2005). Die widersprüchlichen Resultate

dieser Arbeiten sowie früherer Studien und der vorliegenden Dissertation lassen sich durch verschiedene Mechanismen zur Aktivierung von APZ durch Hsp60 erklären:

1. Ähnlich dem LPS-bindenden Protein LBP könnte Hsp60 bei einer bakteriellen Infektion als LPS-Carrier den Transport und die Bindung von LPS an den LPS-Rezeptorkomplex CD14/TLR4 erleichtern und auf diese Weise die LPS-vermittelte Aktivierung von Makrophagen und DC, die zu einer Freisetzung proinflammatorischer Zytokine wie IL-6, IL-12 und TNF $\alpha$  sowie zur Expression kostimulatorischer Zelloberflächenproteine führt, forcieren. Diese Situation wird *in vitro* durch die Stimulation von APZ mit LPS-kontaminiertem Hsp60 widerspiegelt.

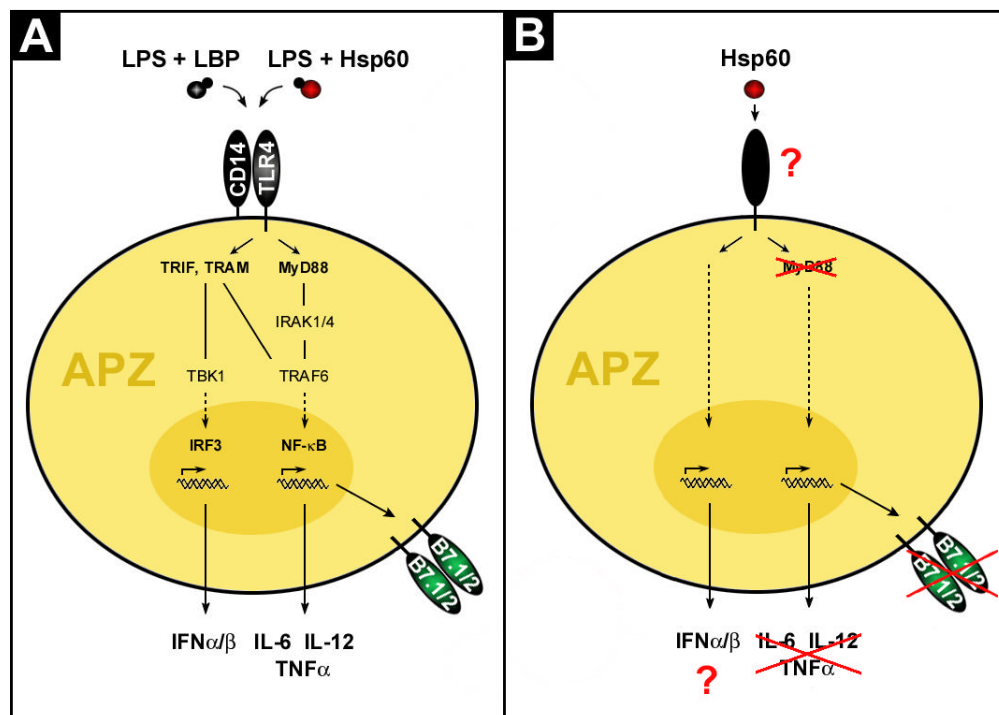
2. In Abwesenheit von LPS, zum Beispiel bei einer viralen Infektion oder anderen Stresssituationen, könnte Hsp60 dagegen auf der Oberfläche von APZ noch unbekannte Rezeptoren und TLR-unabhängige Signalwege nutzen, die nicht zur Freisetzung von IL-6, IL-12 und TNF $\alpha$  und Expression kostimulatorischer B7-Moleküle führen, möglicherweise aber die Expression des Typ I-Interferons IFN $\alpha$  modulieren und auf diese Weise einen Einfluss auf die Polarisierung einer T-Zellantwort ausüben. Diese Situation wird durch das in dieser Arbeit etablierte Endotoxin-freie Testsystem reflektiert.

Abbildung 4.1 stellt diese beiden Hypothesen zum Wirkmechanismus des Hsp60-Proteins schematisch gegenüber.

#### 4.4.4 Aktiviert Hsp60 T-Zellen direkt?

Eine weitere Möglichkeit ist, dass Hsp60 über spezifische Rezeptoren direkt auf T-Zellen einwirken und T-Zellfunktionen unabhängig von APZ modulieren kann. T-Zellen verfügen über Rezeptoren zur Erkennung von bakteriellen PAMP, darunter TLR2 und TLR4 (Hornung et al., 2002; Komai-Koma et al., 2002), und möglicherweise auch endogenen Gefahrensignalen.

In dieser Arbeit durchgeführte *in vitro*-Stimulationsexperimente mit Hsp60-exprimierenden Zelllinien und T-Zellpräparationen, die eine Reinheit von 90-95% T-Zellen aufwiesen und denen keine APZ zugesetzt wurden, deuten darauf hin, dass die Steigerung der IFN $\gamma$ -Produktion in T-Zellen durch Hsp60 möglicherweise unabhängig von APZ vermittelt werden kann (Daten nicht gezeigt).



**Abb. 4.1** Mögliche Wirkmechanismen des Hsp60-Proteins

**A)** Bei einer bakteriellen Infektion kann Hsp60, das von infizierten Zellen oder auch Bakterien freigesetzt wird, als LPS-Carrier ähnlich wie LBP den LPS-Transport und die Bindung von LPS an den Rezeptorkomplex CD14/TLR4 auf der Oberfläche von APZ erleichtern. Auf diese Weise steigert Hsp60 die LPS-vermittelte Aktivierung der APZ, die zu einer Freisetzung von Zytokinen wie IL-6, IL-12, TNF $\alpha$  und Typ I-Interferonen sowie zu einer verstärkten Expression kostimulatorischer B7-Moleküle auf der Zelloberfläche führt. **B)** In Abwesenheit von LPS, zum Beispiel bei einer viralen Infektion, nutzt Hsp60 TLR-unabhängige Signalwege in APZ. Das Engagement noch unbekannter Rezeptoren durch Hsp60 führt möglicherweise zu einer Freisetzung von Typ I-Interferonen. Hsp60 verstärkt jedoch nicht die Produktion von IL-6, IL-12 und TNF $\alpha$  und steigert auch nicht die Expression kostimulatorischer B7-Moleküle.

Hinweise auf einen direkten Einfluss von Hsp60 auf T-Zellen wurden auch in der Literatur beschrieben. So zeigten Zanin-Zhorov et al. in ihrer 2003 publizierte Studie, dass rekombinantes humanes Hsp60 in humanen wie murinen T-Zellen die Expression von Integrinen und die Adhäsionsfähigkeit von T-Zellen modulieren konnte (Zanin-Zhorov et al., 2003). Dabei erwiesen sich murine Wildtyp-T-Zellen und T-Zellen, die keinen funktionellen TLR4-Rezeptor exprimierten, gegenüber Hsp60 als gleichermaßen responsiv. Dieses Ergebnis steht im Einklang mit den Beobachtungen dieser Arbeit, in der gezeigt wurde, dass Hsp60 unabhängig von TLR4 eine Zytokinantwort in T-Zellen

forcieren konnte. Zanin-Zhorov et al. beschreiben weiter, dass der Einfluss von Hsp60 auf T-Zellen durch TLR2-spezifische Antikörper blockiert werden konnte und damit TLR2-abhängig zu sein scheint. Die Beteiligung von TLR2 bei einer direkten Aktivierung von T-Zellen durch Hsp60 wird auch durch die von Zanin-Zhorov 2005 publizierte Studie unterstützt, in der gezeigt wurde, dass Hsp60 TLR2-abhängig die Zytokinproduktion in humanen und murinen T-Zellen moduliert. In humanen T-Zellen und murinen T-Zellen, die aus den Lymphknoten immunisierter Mäuse gereinigt worden waren, wurde bei der *in vitro*-Stimulation mit anti-CD3 in Gegenwart von Hsp60 eine reduzierte Produktion von T<sub>H</sub>1-Zytokinen wie TNF $\alpha$  und IFN $\gamma$  und eine verstärkte Freisetzung des T<sub>H</sub>2-Zytokins IL-10 beobachtet. Dabei moduliert Hsp60 direkt die Expression T<sub>H</sub>1- und T<sub>H</sub>2-spezifischer Transkriptionsfaktoren (Zanin-Zhorov et al., 2005). Diese Ergebnisse stehen scheinbar im Widerspruch zu den Resultaten der vorliegenden Arbeit, in der gezeigt wurde, dass Hsp60 bei der antigenabhängigen T-Zellaktivierung die Expression des T<sub>H</sub>1-Zytokins IFN $\gamma$  nicht reduziert, sondern steigert. Hierbei wurden naive murine T-Zellen eingesetzt. Dagegen handelt es sich bei den von Zanin-Zhorov et al. verwendeten T-Zellen aus der Maus wahrscheinlich um Gedächtnis-T-Zellen, die auf die Gegenwart von Hsp60 mit einer reduzierten Freisetzung von T<sub>H</sub>1-Zytokinen reagieren. Naive T-Zellen und Gedächtnis-T-Zellen unterscheiden sich nicht nur hinsichtlich ihrer Reaktivität auf ihr spezifisches Antigen, sondern möglicherweise auch in ihrer Responsivität gegenüber Hsp60.

Die Ergebnisse der vorliegenden Dissertation deuten außerdem darauf hin, dass eine Beteiligung des TLR2-Rezeptors an der Hsp60-induzierten IFN $\gamma$ -Freisetzung unwahrscheinlich ist, weil dieser Effekt unabhängig von dem TLR-assozierten MyD88-Signalweg war. Schließlich ist, da in den Studien von Zanin-Zhorov und Kollegen wie auch allen anderen bislang durchgeführten Arbeiten rekombinantes in Bakterien exprimiertes Hsp60-Protein verwendet wurde, trotz der durchgeführten Kontrollen wie der eingangs erwähnten Hitzedenaturierung des Hsp60-Proteins und der Einsatz von PmB zur Inhibition von LPS, eine Beteiligung von bakteriellen PAMP an den beobachteten Effekten nicht vollständig auszuschließen. Ob Hsp60 einen direkten Einfluss auf die Aktivierung von T-Zellen ausüben kann, sollte deshalb ebenfalls im Endotoxin-freien Testsystem überprüft werden.

#### 4.5 Hsp60 als immunologisches Adjuvanz in der Tumorabwehr

Die im *in vitro*-Testsystem erhaltenen Ergebnisse deuten auf eine Funktion des Hsp60-Proteins als endogenes Gefahrensignal und immunologischen Signalverstärker hin. Da es sich hierbei jedoch um ein artifizielles Testsystem handelt, lassen sie keinen Rückschluss auf die Bedeutung der immunmodulatorischen Funktion des Hsp60-Proteins im lebenden Organismus zu. Die Relevanz des *in vitro* beobachteten Einflusses von Hsp60 auf die Aktivierung und Polarisierung von T-Zellen wurde deshalb mit Hilfe der mHsp60-exprimierenden und Hsp60-negativen X63-Tumorzellen *in vivo* in der Balb/c-Maus untersucht. Dabei wurden Balb/c-Mäuse wiederholt mit bestrahlten mHsp60-positiven oder Hsp60-negativen X63-Tumorzellklonen immunisiert und die Reaktion von Milzzellen dieser Tiere auf von parentalen X63-Zellen präsentierte Tumorantigene oder syngene Balb/c-Milzzellen zur Kontrolle untersucht. Mäuse, die mit verschiedenen mHsp60-exprimierenden X63-Tumorzellklonen immunisiert worden waren, zeigten dabei gegenüber denjenigen Tieren, die mit Hsp60-negativen X63-Zellen immunisiert worden waren, eine erhöhte Frequenz IFN $\gamma$ -produzierender Zellen in der Milz und eine gesteigerte Freisetzung von IFN $\gamma$  in Gegenwart parentaler X63-Tumorzellen *in vitro*. Dabei handelt es sich um einen Hsp60-spezifisch induzierten Effekt, da verschiedene mHsp60-exprimierende Zellklone eingesetzt wurden. Dieses Ergebnis zeigt, dass die Expression von Hsp60 auf der Zelloberfläche die Immunogenität der Tumorzellen *in vivo* steigert.

Die Milzzellen immunisierter Tiere reagierten *in vitro* jedoch ebenfalls auf die Gegenwart von Balb/c-Milzzellen mit einer verstärkten Sekretion insbesondere von IL-2, aber auch IFN $\gamma$ . Die durch die Expression von Hsp60 auf der Oberfläche von Tumorzellen induzierte Immunantwort war somit nicht spezifisch für X63-assoziierte Tumorantigene. Vielmehr führte die Applikation von mHsp60-exprimierenden X63-Zellen gegenüber Hsp60-negativen X63-Zellen offenbar zu einem allgemeinen präaktivierten Status des Immunsystems, der sich in der spontanen Produktion von IFN $\gamma$  und IL-2 manifestiert. Ähnliche Beobachtungen wurden ebenfalls mit anderen HSP wie gp96 und Hsp70 gemacht (Breloer et al., 1999). Auch diese HSP versetzen bei der Applikation *in vivo* das Immunsystem in eine Art „Alarmzustand“, der zu einer erleichterten Aktivierung von T-Zellen *in vitro* führt.

Desweiteren wurde untersucht, ob die durch die Oberflächenexpression des Hsp60-Proteins gesteigerte Immunogenität der X63-Tumorzellen sich auch auf die Abwehr der

Tumorzellen *in vivo* auswirkt. Tatsächlich konnte in dieser Arbeit erstmals gezeigt werden, dass allein die Expression des autologen Hsp60-Proteins auf der Zelloberfläche von murinen Tumorzellen die Entwicklung von Tumoren in der Maus verlangsamen und teilweise sogar verhindern konnte. Für diese Experimente wurden zwei verschiedene mHsp60-exprimierende Zellklone eingesetzt. Bei einem dieser Klone wurde gegenüber Hsp60-negativen X63-Zellen ein verzögertes Tumorstadium beobachtet, während der zweite Klon sich bis zum Abbruch des Experimentes in keinem der Tiere zu Tumoren entwickelte. Auch wenn bei diesem Experiment eine gewisse klonale Varianz zwischen den zwei verwendeten mHsp60-exprimierenden Zellklonen zu beobachten war, zeigt es doch, dass die Expression von Hsp60 auf der Zelloberfläche die Abwehr dieser Tumoren *in vivo* unterstützt. Diese Experimente belegen, dass die *in vitro* beobachtete Immunstimulation durch Hsp60 auch *in vivo* relevant ist.

Welche Mechanismen hierbei zum Tragen kommen bedarf der näheren Untersuchung. In der Literatur wurde beschrieben, dass die Überexpression von HSP wie Hsp70, Hsp90 und gp96 in Tumorzellen eine tumorspezifische Immunantwort *in vivo* induzieren konnte (Zheng et al., 2001; Dai et al., 2003; Massa et al., 2004; Wang et al., 2004). Die Tumorspezifität der durch diese HSP induzierten Immunreaktion beruht wahrscheinlich auf ihrer Assoziation mit tumorspezifischen zellulären Peptiden, die durch sie in APZ transportiert und von diesen präsentiert werden. Auf diese Weise induzieren die genannten HSP eine spezifische CTL-Antwort gegenüber genau dem Tumor, in dem sie exprimiert wurden (Übersicht bei Srivastava et al., 1998, und Schild et al., 1999). Eine Assoziation von Hsp60 mit zellulären Peptiden ist hingegen nicht bekannt, und eine Funktion des Hsp60-Proteins als Peptidantigen-Carrier scheint unwahrscheinlich, da Hsp60 keine Tumorantigen-spezifische Immunreaktion induzieren konnte.

Eine weitere Möglichkeit ist die Erkennung von Hsp60 auf der Tumorzelloberfläche durch aktivierende Rezeptoren auf NK-Zellen. Die Aktivierung der zytotoxischen Aktivität von NK-Zellen kann maßgeblich zur Eliminierung der Tumorzellen beitragen und wurde für die Überexpression von Hsp70 in Tumorzellen, die auch zu einer Lokalisation des HSP in der Zellmembran führt, beschrieben (Multhoff et al., 1999). Die Gegenwart von Hsp70 konnte hier die zytolytische Aktivität wie auch die Produktion von IFN $\gamma$  in NK-Zellen anregen. Ob Hsp60 die zytotoxische Aktivität und die mit dieser Funktion korrelierende IFN $\gamma$ -Produktion in NK-Zellen stimulieren kann,



wurde in dieser Arbeit nicht untersucht. *In vitro* konnte Hsp60 in Milzzellen in Abwesenheit von Antigen jedoch keine IFN $\gamma$ -Antwort induzieren (Daten nicht gezeigt). Zudem waren NK-Zellen bei der Steigerung der IFN $\gamma$ -Produktion bei der antigenabhängigen T-Zellaktivierung entbehrlich. Diese *in vitro* erhaltenen Resultate argumentieren gegen einen aktivatorischen Einfluss von Hsp60 auf NK-Zellen.

Eine Aktivierung von NK-Zellen wurde bislang nur bei einer Überexpression des mitochondrialen Hsp60-Proteins beschrieben. Sie führt zu einer verbesserten Erkennung dieser Zellen durch NK-Zellen (Michaelsson et al., 2002). Hieran sind der CD94- und NKG2A-Rezeptor beteiligt. NKG2A ist ein inhibitorischer NK-Zellrezeptor, der auf normalen Körperzellen ein nicht-klassisches MHC I-Molekül, das HLA-E, erkennt. Dieses MHC-Molekül präsentiert normalerweise hauptsächlich Peptide, die der Signalsequenz anderer MHC I-Moleküle entstammen. Bei der Überexpression von Hsp60 werden diese jedoch durch Peptide aus der mitochondrialen Signalsequenz des Hsp60-Proteins aus der Bindung an HLA-E verdrängt. Die Erkennung durch NKG2A ist so nicht mehr möglich. Der Rezeptor verliert seine inhibitorische Funktion und das Gleichgewicht aktivatorischer und inhibitorischer Signale verschiebt sich in der NK-Zelle zugunsten einer Aktivierung (Michaelsson et al., 2002). Bei der Zelloberflächenexpression von Hsp60 wurde in dieser Arbeit jedoch das mitochondriale Signalpeptid des Hsp60-Proteins durch eine sekretorische Signalsequenz ersetzt. Dieser Mechanismus kann deshalb an der durch die Oberflächenexpression des Hsp60-Proteins verbesserten anti-Tumorimmunität nicht beteiligt sein.

Die Ergebnisse dieser Arbeit deuten vielmehr darauf hin, dass Hsp60 als Adjuvanz fungiert. Die Oberflächenexpression von Hsp60 führte *in vivo* zu einer unspezifischen Aktivierung des Immunsystems, die durch eine gesteigerte Expression von IFN $\gamma$  und IL-2 in der Milz immunisierter Mäuse gekennzeichnet ist, und die für eine verbesserte Tumorabwehr im lebenden Organismus verantwortlich scheint. Welche zellulären und humoralen Mechanismen hierbei *in vivo* eine Rolle spielen bedarf der weiteren Erforschung. Ein interessanter Ansatzpunkt ist dabei die Untersuchung der Funktion des Typ I-Interferons IFN $\alpha$ .

## 4.6 Ausblick

Im Ergebnisteil dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass Hsp60 einen Einfluss auf die Aktivierung von T-Zellen besitzt. Unklar bleibt jedoch, welche Signaltransduktions- und Effektormechanismen Hsp60 bei der Stimulation von APZ und T-Zellen nutzt. Deutlich geworden ist, dass der TLR4-Rezeptor und der MyD88-abhängige Signalweg, der von nahezu allen Rezeptoren der TLR-Familie genutzt wird, für die immunstimulatorische Funktion von Hsp60 nicht verantwortlich sind. Die Identifizierung des oder der für die Bindung von Hsp60 und die Hsp60-induzierte Signaltransduktion verantwortlichen Rezeptoren auf der Oberfläche von APZ und möglicherweise auch T-Zellen stellt deshalb ein wichtiges Ziel weiterer Forschungen dar. Darüber hinaus wurden in dieser Arbeit Hinweise darauf gefunden, dass möglicherweise das Typ I-Interferon IFN $\alpha$  eine Rolle bei der durch Hsp60 stimulierten IFN $\gamma$ -Produktion in T-Zellen spielen. Dies ist ein wichtiges Indiz dafür, dass Hsp60 einen Einfluss auf die Modulation von APZ-Funktionen besitzt. Hier bleibt zu prüfen, ob Hsp60 in APZ die IFN $\alpha$ -Produktion stimulieren kann, und welchen Einfluss die Expression dieses Zytokins bei der Stimulation der IFN $\gamma$ -Produktion in T-Zellen durch Hsp60 besitzt.

Ein auch für die Immunotherapie interessantes Ergebnis ist die Steigerung der Tumorimmunogenität durch membranexprimiertes Hsp60 *in vivo*. Entsprechende Experimente unter Verwendung von Knockout-Mäusen, die Defizienzen für verschiedene Rezeptoren, Zytokine oder auch Transkriptionsfaktoren aufweisen, können Aufklärung darüber bringen, welche Mechanismen für die Hsp60-induzierte Immunstimulation *in vivo* von Bedeutung sind. Ein interessanter Kandidat, der als löslicher Mediator eine wichtige Rolle spielen könnte, ist IFN $\alpha$ . Daneben ist die Identifikation der an dieser Reaktion beteiligten zellulären Komponenten ein besonders wichtiges Ziel. In diesem Zusammenhang sollte untersucht werden, welche Funktionen APZ, T-Zellen und auch NK-Zellen bei der durch Hsp60 verbesserten Tumorabwehr erfüllen. Zudem muss ausgeschlossen werden, dass Hsp60 autoimmune T- und B-Zellreaktionen induziert, um eine therapeutische Nutzung dieses HSP in Erwägung ziehen zu können.

## 5 Zusammenfassung

Die Ausbildung einer effektiven adaptiven Immunantwort ist abhängig von der Präsentation von Antigen im Zusammenhang mit kostimulatorischen Signalen. Moleküle, die einen kostimulatorischen Effekt vermitteln können, sind Pathogen-assoziierte exogene Strukturen (*pathogen associated molecular pattern*, PAMP) sowie körpereigene Moleküle, die als endogene Gefahrensignale wirksam sind. Dazu zählen auch die ubiquitär exprimierten und stark konservierten Hitzeschockproteine (HSP). Das mitochondriale Hsp60-Protein ist an der Faltung in die Mitochondrien importierter Proteine beteiligt. Seine Expression wird wie die der meisten HSP in gestressten Zellen verstärkt, und das Protein lokalisiert unter diesen Bedingungen auch in anderen zellulären Kompartimenten wie dem Zytosol und in der Zellmembran. Dort ist es, wie auch bei seiner Freisetzung aus nekrotischen Zellen, für Zellen des Immunsystems zugänglich. Die Gegenwart von Hsp60 führt *in vitro* zu einer Aktivierung von APZ und T-Zellen, wie sie auch durch bakterielles LPS stimuliert wird. Beide Moleküle scheinen dabei denselben Rezeptorkomplex aus CD14 und TLR4 zu nutzen und deshalb sehr ähnliche Effekte zu induzieren. Für die Untersuchung der immunmodulatorischen Funktionen des Hsp60-Proteins wurde in den bislang durchgeführten Studien jedoch bakteriell exprimiertes rekombinantes Hsp60-Protein verwendet, das mit bakteriellen PAMP, insbesondere LPS, kontaminiert war. Trotz der durchgeführten Kontrollen, wie der Hitzedenaturierung des Proteins gegenüber dem für thermostabil erachteten LPS und der Inhibition von LPS durch PmB, konnte die immunstimulatorische Wirkung von Hsp60 und LPS sowie anderen PAMP nicht eindeutig differenziert werden. In dieser Arbeit wurde deshalb die immunmodulatorische Aktivität des Hsp60-Proteins bei der Stimulation von APZ sowie der antigenabhängigen T-Zellaktivierung in einem vollständig Endotoxin-freien *in vitro*-Testsystem analysiert und mit der Wirkung von bakteriellem LPS verglichen.

Die Ergebnisse dieser Arbeit haben gezeigt, dass Hsp60 über eine intrinsische immunstimulatorische Aktivität verfügt, die bei der antigenabhängigen Aktivierung naiver T-Zellen zu einer gesteigerten Freisetzung des  $T_H1$ -Zytokins IFN $\gamma$  führt. Diese Funktion des Hsp60-Proteins ist entgegen früheren Beobachtungen unabhängig von den Zytokinen IL-6, IL-12, IL-23 und TNF $\alpha$ , deren Freisetzung, ebenso wie die Expression der kostimulatorischen B7-Moleküle B7.1 (CD80) und B7.2 (CD86), durch Hsp60 in APZ nicht induziert wird. Im Gegensatz hierzu führt die Stimulation von APZ mit

bakteriellem LPS sowohl zur Produktion großer Mengen IL-6, IL-12 und TNF $\alpha$  als auch zu einer gesteigerten Expression von B7.1 und B7.2. Die LPS-induzierte Stimulation der IFN $\gamma$ -Freisetzung in T-Zellen ist außerdem strikt abhängig von IL-12 und TNF $\alpha$ . Die in früheren Studien beobachtete Zytokinfreisetzung bei der Stimulation von APZ mit rekombinantem Hsp60 ist aufgrund dieser Ergebnisse wahrscheinlich auf Kontaminationen der Proteinpräparationen mit bakteriellen PAMP zurückzuführen.

Darüber hinaus wurde in dieser Arbeit gezeigt, dass Hsp60 im Gegensatz zu LPS unabhängig von funktionellem Toll-like-Rezeptor 4 (TLR4) und dem TLR-assoziierten MyD88-Signalweg die IFN $\gamma$ -Produktion in T-Zellen steigern konnte. TLR4 und auch andere TLR sind deshalb an der Hsp60-vermittelten Immunstimulation wahrscheinlich nicht beteiligt. Hsp60 und LPS nutzen folglich bei der Stimulation der IFN $\gamma$ -Produktion in T-Zellen offenbar unterschiedliche Signaltransduktionswege. Bei der Hsp60-vermittelten T-Zellstimulation ist dabei möglicherweise das Typ I-Interferon IFN $\alpha$  von Bedeutung.

Die Relevanz der *in vitro* beobachteten immunstimulatorischen Aktivität des Hsp60-Proteins wurde schließlich *in vivo* überprüft. Die Expression des Hsp60-Proteins auf der Zelloberfläche von Tumorzellen führte *in vivo* zu einer gesteigerten Immunogenität der Tumorzellen und einer verbesserten Tumorabwehr, die möglicherweise auf eine unspezifische, durch die spontane Freisetzung von IFN $\gamma$  und IL-2 gekennzeichnete, Aktivierung des Immunsystems zurückzuführen ist.

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse dieser Arbeit, dass Hsp60 immunstimulatorische Eigenschaften besitzt, die dieses HSP als endogenes Gefahrensignal und immunologischen Signalverstärker kennzeichnen. In Abwesenheit von bakteriellen PAMP wie LPS nutzt Hsp60 für diese biologische Funktion jedoch andere Signalwege als in der Literatur für bakteriell exprimiertes rekombinantes Hsp60-Protein beschrieben wurde.

## 6 Literatur

- Abbas A. K., Murphy K. M., Sher A. (1996): Functional diversity of helper T lymphocytes. *Nature* **383**:787
- Adams E., Britton W., Morgan A., Sergeantson S., Basten A. (1994): Individuals from different populations identify multiple and diverse T cell determinants on mycobacterial hsp70. *Scand J Immunol* **39**:588
- Aggarwal S., Ghilardi N., Xie M. H., de Sauvage F. J., Gurney a. L. (2003): Interleukin-23 promotes a distinct CD4 T cell activation state characterized by the production of interleukin-17. *J Biol Chem* **278**:1910
- Akira S. (2003): Mammalian Toll-like receptors. *Curr Opin Immunol* **15**:5
- Akira S., Hoshino K. (2003): Myeloid differentiation factor 88-dependent and -independent pathways in Toll-like receptor signaling. *J Infectious Diseases* **187**:356
- Albert M. L., Pearce S. F. A., Francisco L. M., Sauter B., Roy P., Silverstein R. L., Bhardwaj N. (1998): Immature dendritic cells phagocytose apoptotic cells via  $\alpha\text{v}\beta 5$  and CD36, and cross-present antigens to cytotoxic T lymphocytes. *J Exp Med* **188**:1359
- Ang D., Liberek K., Skowrya D., Zylicz M., Georgeopoulos (1991): Biological role und regulation of the universally conserved heat shock proteins. *J Biol Chem* **266**:24233
- Arredouani M. S., Kobzik L. (2004): The structure and function of marco, a macrophage class a scavenger receptor. *Cell Mol Biol* **50**:657
- Asea A., Kraeft S. K., Kurt-Jones E. A., Stevenson M. A., Chen I. B., Finberg R. W., Koo G. C., Calderwood S. K. (2000): Hsp70 stimulates cytokine production through a CD14-dependent pathway, demonstrating its dual role as a chaperone and cytokine. *Nat Med* **6**:435
- Babbit B. P., Allen P. M., Matsueda G., Haber E., Unanue E. R. (1985): Binding of immunogenic peptides to Ia histocompatibility molecules. *Nature* **317**:359
- Banchereau J., Steinman R. M. (1998): Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* **392**:245
- Barton B. E. (1997): IL-6: insights into novel biological activities. *Clin Immunol Immunopathol* **85**:16
- Barton G. M., Medzhitov R. (2002): Toll-like receptors and their ligands. *Curr Top Microbiol Immunol* **270**:81
- Barton G. M., Medzhitov R. (2003): Linking Toll-like receptors to IFN- $\alpha/\beta$  expression. *Nat Immunol* **4**:432
- Basu S., Binder R. J., Suto R., Anderson K. M., Srivastava P. K. (2000): Necrotic but not apoptotic cell death releases heat shock proteins, which deliver a partial maturation signal to dendritic cells and activate the NF- $\kappa$ B pathway. *Int Immunol* **12**:1539
- Basu S., Binder R. J., Ramalingam T., Srivastava P. K. (2001): CD91 is a common receptor for heat shock proteins gp96, hsp90, hsp70, and calreticulin. *Immunity* **14**:303
- Becher B., Blain M., Giacomini P. S., Antel J. P. (1999): Inhibition of Th1 polarization by soluble TNF receptor is dependent on antigen-presenting cell-derived IL-12. *J Immunol* **162**:684
- Becker J., Craig E. A. (1994): Heat shock proteins as molecular chaperones. *Eur J Biochem* **219**:11
- Becker T., Hartl F. U., Wieland F. (2002): CD40, an extracellular receptor for binding and uptake of Hsp70-peptide complexes. *J Cell Biol* **158**:1277

- Belladonna M. L., Renaud J. C., Bianchi R., Vacca C., Fallarino F., Orabona C., Fioretti M. C., Grohmann U., Puccetti P. (2002): IL-23 and IL-12 have overlapping, but distinct, effects on murine dendritic cells. *J Immunol* **168**:5448
- Belles C., Kuhl A., Nosheny R., Cardino S. R. (1999): Plasma membrane expression of heat shock protein 60 *in vivo* in response to infection. *Inf Immunity* **67**:4191-4200
- Bethke K., Staib f., Distler M., Schmitt U., Jonuleit H., Enk A. H., Galle P. R., Heike M. (2002): Different efficiency of heat shock proteins (HSP) to activate human monocytes and dendritic cells: superiority of HSP60. *J Immunol* **169**:6141
- Beutler B. (2000): TLR4: Central component of the sole mammalian LPS sensor. *Curr Opin Immunol* **12**:20
- Beutler B., Hoebe K., Du X., Ulevitch R. J. (2003): How we detect microbes and respond to them: the Toll-like receptors and their transducers. *J Leukoc Biol* **74**:479
- Billiau A. (1996): Interferon-gamma in autoimmunity. *Cytokine Growth Factor Rev* **7**:25
- Binder R. J., Vatner R., Srivastava P. (2004): Review: The heat-shock protein receptors: some answers and more questions. *Tissue Antigens* **64**:442
- Biron C. A. (2001): Interferons  $\alpha$  and  $\beta$  as immune regulators – a new look. *Immunity* **14**:661
- Biron C. A., Brossay L. (2001): NK cells and NKT cells in innate defense against viral infections. *Curr Opin Immunol* **13**:458
- Breloer M., Dorner B., Moré S. H., Roderian T., Fleischer B., von Bonin B. (2001): Heat shock proteins as „danger signals“: eukaryotic Hsp60 enhances and accelerates antigen-specific IFN-gamma production in T cells. *Eur J Immunol* **31**:31:2051
- Breloer M., Fleischer B., von Bonin A. (1999): *In vivo* and *in vitro* activation of T cells after administration of Ag-negative heat shock proteins. *J Immunol* **162**:3141.
- Breloer M., Moré S. H., Osterloh A., Stelter F., Jack R. S., von Bonin A. (2002): Macrophages as main inducers of IFN- $\gamma$  in T cells following administration of human and mouse heat shock protein 60. *Int Immunol* **14**:1247
- Bretscher P., Cohn M. (1970): A theory of self-nonsel self discrimination. *Science* **169**:1042
- Brinkmann V., Geiger T., Alkan S., Heusser C. H. (1993): Interferon  $\alpha$  increases the frequency of interferon  $\gamma$ -producing human CD4<sup>+</sup> T cells. *J Exp Med* **178**:1655
- Brunda M., Luistro L., Warriar R. R., Wright R. B., Hubbard B. R., Murphy M., Wolf S. F., Gately M. K. (1993): Antitumor and antimetastatic activity of interleukin 12 against murine tumors. *J Exp Med* **178**:1223
- Bukau B., Horwich A. L. (1998): The Hsp70 and Hsp60 chaperone machines. *Cell* **92**:351-366
- Burnet F. M. (1959): The clonal selection theory of acquired immunity. Cambridge University Press, London
- Cambier J. C., Pleissen C. M., Clack M. E. (1994): Signal transduction by B-cell antigen receptors and its conception. *Annu Rev Immunol* **12**:458
- Cammarota G., Scheirle A., Takacs B., Doran D. M., Knorr R., Bannwarth W., Guardiola J., Sinigaglia F. (1992): Identification of a CD4 binding site on the beta 2 domain of HLA-DR molecules. *Nature* **356**:799
- Castellino F., Boucher P. E., Eichelberg K., Mayhew M., Rothman J., E., Houghton A. N., Germain R. N. (2000): Receptor-mediated uptake of antigen/heat shock protein complexes results in major

- histocompatibility complex class I antigen presentation via two distinct processing pathways. *J Exp Med* **191**:1957
- Caux C., Massacrie C., Vanbervliet B., Dubois B., van Kooten C., Durand I., Banchereau J. (1994): Activation of human dendritic cells through CD40 cross-linking. *J Exp Med*. **180**:1263
- Cella M., Engering A., Pinet V., Pieters J., Lanzavecchia A. (1997): Inflammatory stimuli induce accumulation of MHC class II complexes on dendritic cells. *Nature* **388**:782
- Cella M., Facchetti F., Lanzavecchia A., Colonna M. (2000): Plasmacytoid dendritic cells activated by influenza virus and CD40L drive a potent T<sub>H</sub>1 polarization. *Nat Immunol* **1**:305
- Cerutti A., Zan H., Schaffer A., Bergsagel L., Harindranath N., Max E. E., Casali P. (1998): CD40 ligand and appropriate cytokines induce switching to IgG, IgA, and IgE and coordinated germinal center and plasmacytoid phenotypic differentiation in a human monoclonal IgM<sup>+</sup>IgD<sup>+</sup> B cell line. *J Immunol* **160**:2145
- Chen W., Syldath U., Bellmann K., Kart U., Kolb H. (1999): Human 60-kDa heat-shock protein: a danger signal to the innate immune system. *J Immunol* **162**:3212
- Chen Y., Kuchroo V. K., Inobe J., Hafler D. A., Weiner H. L. (1994): Regulatory T cell clones induced by oral tolerance: suppression of autoimmune encephalomyelitis. *Science* **265**:1237
- Chesnut R. W., Grey H. M. (1985): Antigen presenting cells and mechanisms of antigen presentation. *Crit Rev Immunol* **5**:263
- Chomczynski P., Sacchi N. (1987): Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* **162**:156
- Colombo M. P., Trinchieri G. (2002): Interleukin 12 in anti-tumor immunity and immunotherapy. *Cytokine Growth Factor Rev* **13**:155
- Cousens L. P., Peterson R., Hsu S., Dorner A., Altman J. D. (1999): Two roads diverged: interferon  $\alpha/\beta$ - and interleukin 12-mediated pathways in promoting T cell interferon  $\gamma$  responses during viral infection. *J Exp Med* **189**:1315
- Cramer S. O. (2001): Funktionelle Charakterisierung des CD83-Moleküls und Identifizierung eines CD83-Liganden. Dissertation im Fachbereich Biologie, Universität Hamburg
- Croft M., Dubey C. (1997): Accessory molecules and costimulation requirements for CD4 T-cell response. *Crit Rev Immunol* **17**:89
- Cua D. J., Sherlock J., Chen Y., Murphy C. A., Joyce B., Seymour B., Lucian L., To W., Kwan S., Churakova T., Zurawski S., Wiekowski M., Lira S. A., Gorman D., Kastelein R. A., Sedgwick J. D. (2003): Interleukin-23 rather than interleukin-12 is the critical cytokine for autoimmune inflammation of the brain. *Nature* **421**:744
- Dai J., Liu B., Caudill M. M., Zheng H., Qiao Y., Podack E. R., Li Z. (2003): Cell surface expression of heat shock protein gp96 enhances cross-presentation of cellular antigens and the generation of tumor-specific T cell memory. *Cancer Immun* **3**:1
- Dai W. J., Bartens W., Kohler G., Hufnagel M., Kopf M., Brombacher F. (1997): Impaired macrophage listericidal and cytokine activities are responsible for the rapid death of *Listeria monocytogenes*-infected IFN-gamma receptor-deficient mice. *J Immunol* **158**:5279
- Das G., Sheridan S., Janeway C. A. Jr (2001): The source of early IFN- $\gamma$  that plays a role in T<sub>H</sub>1 priming. *J Immunol* **167**:2004
- DeFranco A. L. (1987): Molecular aspects of B lymphocyte activation. *Annu Rev Cell Biol* **3**:143

- Delneste Y., Magistrelli G., Gauchat J., Haeuw J., Aubry J., Nakamura K., Kawakami-Honda N., Goetsch L., Sawamura T., Bonnefoy J., Jeannin P. (2002): Involvement of LOX-1 in dendritic cell-mediated antigen cross-presentation. *Immunity* **17**:353
- de Mello Coelho V., Nguyen D., Giri B., Bunbury A., Schaffer E., Taub D. (2004): Quantitative differences in lipid raft components between murine CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells. *BMC Immunology* **5**:2
- Doetze A., Satoguina J., Burchard G., Rau T., Loliger C., Fleischer B., Hoerauf A. (2000): Antigen-specific cellular hyporesponsiveness in a chronic human helminth infection is mediated by T(h)3/T(r)1-type cytokines IL-10 and transforming growth factor-beta but not by a T(h)1 to T(h)2 shift. *Int Immunol* **12**:623
- Doherty P. C., Zinkernagel R. M. (1975): H-2 compatibility is required for T-cell mediated lysis of target cells infected with lymphocytic choriomeningitis virus. *J Exp Med* **141**:502
- Elomaa O., Kangas M., Sahlberg C., Tuukanen J., Sormunen R., Liakka A. (1995): Cloning of a novel bacteria-binding receptor structurally related to scavenger receptors and expressed on a subset of macrophages. *Cell* **80**:603
- Emmrich F., Thole J., van Emden J., Kaufmann S. H. E. (1986): A recombinant 64 kDa protein of *Mycobacterium bovis* BCG specifically stimulates human T4 clones reactive to mycobacterial antigens. *J exp Med* **163**:1024
- Feng H., Zeng Y., Whitesell L., Katsanis E. (2001): Stressed apoptotic tumor cells express heat shock proteins and elicit tumor-specific immunity. *Blood* **97**:3505
- Flohé S. B., Brüggemann J., Lendemans S., Nikulina M., Meierhoff G., Flohé S., Kolb H. (2003): Human heat shock protein 60 induces maturation of dendritic cells versus a Th1-promoting phenotype. *J Immunol* **170**:2340
- Fraser I. P., Koziel H., Ezekowitz R. A. (1998): The serum mannose-binding protein and the macrophage mannose receptor are pattern recognition molecules that link innate and adaptive immunity. *Semin Immunol* **10**:363
- Frosch S., Kuntzlin D., Fleischer B. (1996): Infection with *Trypanosoma cruzi* selectively upregulates B7-2 molecules on macrophages and enhances their costimulatory activity. *Infect Immunol* **65**:971
- Fukaury H., Kent S. C., Pietruszewicz M. J., Khoury S. J., Weiner H. L., Hafler D. A. (1996): Induction of circulating myelin basic protein and proteolipid protein-specific transforming growth factor-beta1-secreting T<sub>H</sub>3 T cells by oral administration of myelin in multiple sclerosis patients. *J Clin Invest* **98**:70
- Gallucci S., Lolkema M., Matzinger P. (1999): Natural adjuvants: endogenous activators of dendritic cells. *Nat Med* **5**:1249
- Gallucci S., Matzinger P. (2001): Danger signals: SOS to the immune system. *Curr Opin Immunol* **13**:114
- Gao G. F., Tormo J., Gerth U. C., Wyer J. R., McMichael A. J., Stuart D. I., Bell J. L., Jones E. Y., Jakobsen B. K. (1997): Crystal structure of the complex between human CD8(alpha) and HLA-A2. *Nature* **387**:630
- Gao B., Tsan M. F. (2003): Recombinant human heat shock protein 60 does not induce the release of tumor necrosis factor alpha from murine macrophages. *J Biol Chem* **278**:22523
- Gao B., Tsan M. F. (2004): Induction of cytokines by heat shock proteins and endotoxin in murine macrophages. *Biochem Biophys Research Communications* **317**:1149
- Gewurz H., Mold C., Siegel J., Fiedel B. (1982): C-reactive protein and the acute phase response. *Adv Intern Med* **27**:345
- Gowans J. L., Knight E. J. (1964): The route of recirculation of lymphocytes in the rat. *Proc Roy Soc London* **159**:257



- Grander D., Einhorn S. (1998): Interferon and malignant disease – How does it work and why doesn't it always? *Acta Oncol* **37**:331
- Groux H., O'Garra A., Bilger M., Rouleau M., Antonenko S., de Vries J. W., Roncarolo M. G. (1997): A CD4<sup>+</sup> T-cell subset inhibits antigen-specific T-cell responses and prevents colitis. *Nature* **389**:737
- Gunning P., Leavitt J., Muscat G., Ng S. Y., Kedes L. (1987): A human  $\beta$ -actin expression vector system directs high-level accumulation of antisense transcripts. *Proc Natl Acad Sci USA* **84**:4831
- Gupta S., Knowlton A. A. (2002): Cytosolic heat shock protein 60, hypoxia, and apoptosis. *Circulation* **106**:2727
- Gutterman J. U. (1994): Cytokine therapeutics: Lessons from interferon alpha. *Proc Natl Acad Sci USA* **91**:1198
- Habich C., Baumgart K., Kolb H., Burkart V. (2002): The receptor for heat shock protein 60 on macrophages is saturable, specific, and distinct from receptors for other heat shock proteins. *J Immunol* **168**:569
- Habich C., Kempe K., Burkart V., van der Zee R., Lillicrap M., Gaston H., Kolb H. (2004): Identification of the heat shock protein 60 epitope involved in receptor binding on macrophages. *FEBS letters* **568**:65
- Habich C., Kempe K., van der Zee, Burkart V., Kolb H. (2003): Different heat shock protein 60 species share pro-inflammatory activity but not binding sites on macrophages. *FEBS Letters* **533**:105
- Habich C., Kempe K., van der Zee R., R umenapf R., Akiyama H., Kolb H., Burkart V. (2005): Heat shock protein 60: specific binding of lipopolysaccharide. *J Immunol* **174**:1298
- Hacker H., Mischak H., Miethke T., Liptay S., Schmid R., Sparwasser T., Heeg K., Lipford G. B., Wagner H. (1998): CpG-DNA-specific activation of antigen-presenting cells requires stress kinase activity and is preceded by non-specific endocytosis and endosomal maturation. *EMBO J* **17**:6230
- Hacker, H., Vabulas, R. M., Takeuchi, O., Hoshino, K., Akira, S., Wagner, H. (2000): Immune cell activation by bacterial CpG-DNA through myeloid differentiation marker 88 and tumor necrosis factor receptor-associated factor (TRAF)6. *J Exp Med* **192**:595
- Hajjar A. M., O'Mahony D. X., Ozinsky A., Underhill D. M., Aderem A., Klebanoff S. J., Wilson C. B. (2001): Cutting edge: functional interactions between toll-like receptor (TLR) 2 and TLR1 or TLR6 in response to phenol-soluble modulin. *J Immunol* **166**:15
- Hanahan D. (1985): In: Glover D. M. (ed): DNA cloning: A practical approach. *IRI Press*, Oxford, p. 109-135
- Hara I., Sato N., Miyake H., Muramaki M., Hikosaka S., Kamidono S. (2004): Introduction of 65 kDa antigen of *Mycobacterium tuberculosis* to cancer cells enhances anti-tumor effect of BCG therapy. *Microbiol Immunol* **48**:289
- Harding C. V., Unanue E. R. (1990): Cellular mechanisms of antigen processing and the function of class I and II major histocompatibility complex molecules. *Cell Regul* **1**:499
- Hartl F. U. (1996): Molecular chaperones in cellular protein folding. *Nature* **381**:571
- Harty J. T., Tvinnereim A. R., White D. W. (2000): CD8<sup>+</sup> T cell effector mechanisms in resistance to infection. *Annu Rev Immunol* **18**:275
- Hathcock K. S., Laszlo G., Pucillo C., Linsley P., Hodes R. J. (1994): Comparative analysis of B7-1 and B7-2 costimulatory ligands: expression and function. *J Exp Med* **180**:631
- Hayashi, F. et al. (2001): The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll-like receptor-5. *Nature* **410**:1099

- Heerklotz H. (2002): Triton promotes domain formation in lipid raft mixtures. *Biophysical Journal* **83**:2693
- Hemmi, H. et al. (2002): Small antiviral compounds activate immune cells via TLR7 MyD88-dependent signalling pathway. *Nat Immunol* **3**:196
- Henderson R. A., Watkins S. C., Flynn J. L. (1997): Activation of human dendritic cells following infection with *Mycobacterium tuberculosis*. *J Immunol* **159**:635
- Hertz C. J., Kiertscher S. M., Godowski P. J., Bouis D. A., Norgard M. V., Roth M. D., Modlin R. L. (2001): Microbial lipopeptides stimulate dendritic cell maturation via Toll-like receptor-2. *J Immunol* **166**:2444
- Ho W. Y., Cooke M. P., Goodnow C. C., Davis M. M. (1994): Resting and anergic B cells are defective in CD28-dependent costimulation of naive CD4<sup>+</sup> T cells. *J Exp Med* **179**:1539
- Hogquist K. A., Jameson S. C., Heath W. R., Howard J. L., Bevan M. J., Carbone F. R. (1994): T cell receptor antagonist peptides induce positive selection. *Cell* **76**:17
- Hori S., Takahashi T., Sakaguchi S. (2003): Control of autoimmunity by naturally arising regulatory CD4<sup>+</sup> T cells. *Adv Immunol* **81**:331
- Hornung V., Rothenfusser S., Britsch S., Krug B., Jahrsdorfer B., Giese T., Endres S., Hartman G. (2002): Quantitative expression of Toll-like receptor 1-10 mRNA in cellular subsets of human peripheral blood mononuclear cells and sensitivity to CpG oligonucleotides. *J Immunol* **168**:4531
- Hoshino K., Takeuchi O., Kawai T., Sanjo H., Ogawa T., Takeda Y., Takeda K., Akira S. (1999): Toll-like receptor 4 (TLR4)-deficient mice are hyporesponsive to lipopolysaccharide: evidence for TLR4 as the Lps gene product. *J Immunol* **162**:3749
- Hosken N. A., Shibuya K., Heath A. W., Murphy K. M., O'Garra A. (1995): The effect of antigen dose on CD4<sup>+</sup> T helper cell phenotype development in a T cell receptor-alpha beta transgenic model. *J Exp Med* **182**:1579
- Imler J.-L., Hoffmann J. A. (2003): Toll-signaling: the TIREless quest for specificity. *Nature* **4**:105
- Inohara N., Oura y., Chen F. F., Muto A., Nunez G. (2001): Human NOD1 confers responsiveness to bacterial lipopolysaccharides. *J Biol Chem* **276**:2551
- Iwasaki A., Medzhitov R. (2004): Toll-like receptor control of the adaptive immune responses. *Nat Immunol* **5**:987
- Janeway C. A. Jr. (1992): The immune system evolved to discriminating infectious nonself from noninfectious nonself. *Immunology Today* **13**:11
- Janeway C. A. Jr., Medzhitov R. (2002): Innate immune recognition. *Annu Rev Immunol* **20**:197
- Janeway C. A., Travers P., Walport M., Shlomchik M. (2002): Immunologie. 5. Aufl., Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg
- Jefford M., Schnurr M., Toy T., Masterman K. A., Shin A., Beecroft T., Tai T. Y., Shortman K., Shackleton M., Davis I. D., Parente P., Luft T., Chen W., Cebon J., Maraskovsky E. (2003): Functional comparison of DCs generated *in vivo* with Flt3 ligand or *in vitro* from blood monocytes: differential regulation of function by specific classes of physiologic stimuli. *Blood* **102**:1753
- Kariko K., Ni H., Capodici J., Lamphier M., Weissman D. (2004): mRNA is an endogenous ligand for Toll-like receptor 3. *J Biol Chem* **279**:12542
- Kaufmann S. H. E., Schoel B., van Embden J. D. A., Koga T., Wand-Württenberger A., Munk M. E., Steinhoff U. (1991): Heat-shock protein 60: implication for pathogenesis and protection against bacterial infections. *Immunol Rev* **121**:67

- Kaufmann S. H. E., Vath U., Thole J. E. R., van Embden J. D. A., Emmrich F. (1987): Enumeration of T cells reactive with *Mycobacterium tuberculosis* organisms and specific for the recombinant mycobacterial 64 kilodalton protein. *Eur J Immunol* **17**:351
- Kawai, T., Adachi, O., Ogawa, T., Takeda, K. and Akira, S. (1999): Unresponsiveness of MyD88-deficient mice to endotoxin. *Immunity* **11**:115
- Kirschning C. I., Wesche H., Ayres T. M., Rothe M. (1998): Human toll-like receptor 2 confers responsiveness to bacterial lipopolysaccharide. *J Exp Med* **188**:2091
- Kol A., Bourcier T., Lichtman A. H., Libby P. (1999): Chlamydial and human heat shock protein 60s activate human vascular endothelium, smooth muscle cells, and macrophages. *J Clin Invest* **103**:571
- Kol A., Lichtman A. H., Finberg R. W., Libby P., Kurt-Jones E. A. (2000): Cutting edge: heat shock protein (HSP) 60 activates the innate immune response: CD14 is an essential receptor for HSP60 activation of mononuclear cells. *J Immunol* **164**:13
- Komai-Koma M., Jones L., Ogg G. S., Xu D., Liew F. Y. (2002): TLR2 is expressed on activated T cells as a costimulatory receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* **101**:3029
- Kopp E. B., Medzhitov R. (1999): The Toll-receptor family and control of the innate immunity. *Curr Opin Immunol* **11**:13
- Kraal G., van der Laan L. J. W., Elomaa O., Tryggvason K. (2000): The macrophage receptor MARCO. *Microbes and Infection* **2**:313
- Kupfer A., Kupfer H. (2003): Imaging immune cell interactions and functions: SMACs and the immunological synapse. *Semin Immunol* **15**:295
- Laemmli U. K. (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**:680
- Langrish C. L., McKenzie B. S., Wilson N. J., de Waal Malefyt R., Kastelein R. A., Cua D. J. (2004): IL-12 and IL-23: master regulators of innate and adaptive immunity. *Immunol Reviews* **202**:96-105
- Lenschow D. J., Walunas T. L., Bluestone J. A. (1996): CD28/B7 system of T cell costimulation. *Annu Rev Immunol* **14**:233
- Linsley P. S., Ledbetter J. A. (1993): The role of the CD28 receptor during T-cell responses to antigen. *Annu Rev Immunol* **11**:191
- Lohman B. L., Welsh R. M. (1998): Apoptotic regulation of T cells and absence of immune deficiency in virus-infected gamma interferon receptor knockout mice. *J Virol* **72**:7815
- London E., Brown D. A. (2000): Insolubility of lipids in Triton X-100: physical origin and relationship to sphingolipid/cholesterol membrane domains (rafts). *Biochem Biophys Acta* **182**:1508
- Lopata M. A., Cleveland D. W., Sollner-Webb B. (1984): High level transient expression of a chloramphenicol acetyl transferase gene by DEAE-dextran mediated DNA transfection coupled with a dimethyl sulfoxide or glycerol shock treatment. *Nucleic Acids Res* **12**:5707
- Ma X., Chow J. M., Gri G., Carra G., Gerosa F., Wolf S. F., Dzialo R., Trinchieri G. (1996): The interleukin 12p40 gene promoter is primed by interferon gamma in monocytic cells. *J Exp Med* **183**:147
- Macatonia S. E., Hosken N. A., Litton M., Vieira P., Hsieh C. S., Culpepper J. A., Wysocka M., Trinchieri G., Murphy K. M., O'Garra A. (1995): Dendritic cells produce IL-12 and direct the development of T<sub>H</sub>1 cells from naive CD4<sup>+</sup> T cells. *J Immunol* **154**:5071
- MacDonald A. J., Duffy M., Brady M. T., McKiernan S., Hall W., Hegarty J., Curry M., Mills K. H. (2002): CD4 T helper type I and regulatory T cells induced against the same epitopes on the core protein in hepatitis C virus-infected persons. *J Infect Dis* **186**:720

- Magram J., Connaughton S. E., Warriar R. R., Carvajal D. M., Wu C. Y., Ferrante J., Stewart C., Sarmiento U., Faherty D. A., Gately M. K. (1996): IL-12-deficient mice are defective in IFN gamma production and type I cytokine responses. *Immunity* **4**:471
- Malmgaard L. (2004): Induction and regulation of IFNs during viral infections. *J Interferon and Cytokine Res* **24**:439
- Manjili M. H., Wang X.-Y., MacDonald I. J., Arnouk H., Yang G. Y., Pritchard M. T., Subjeck J. R. (2004): Cancer immunotherapy and heat-shock proteins: promises and challenges. *Expert Opinion on Biological Therapy* **4**:363
- Manukyan M., Triantafilou K., Triantafilou M., Mackie A., Nilsen N., Espevik T., Wiesmüller K. H., Ulmer A., Heine H. (2005): Binding of lipopeptide to CD14 induces physical proximity of CD14, TLR2 and TLR1. *Eur J Immunol* **35**:911
- Mariott I., Inscho E. W., Bos K. L. (1999): Extracellular uridine nucleotides initiate cytokine production by murine dendritic cells. *Cell Immunol* **195**:147
- Marovich M. A., McDowell M. A., Thomas E. K., Nutman T. B. (2000): IL-12p70 production by *Leishmania major*-harboring human dendritic cells is a CD40/CD40-ligand-dependent process. *J Immunol* **164**:5858
- Massa C., Guiducci C., Arioli I., Parenza M., Colombo M. P., Melani C. (2004): Enhanced efficacy of tumor cell vaccines transfected with secretable hsp70. *Cancer Research* **64**:1502
- Matzinger P. (1994): Tolerance, danger and the extended family. *Annu Rev Immunol* **12**:991
- Matzinger P. (2001): The danger model in its historical context. *Scand J Immunol* **54**:4
- McGuirk P., Mills K. H. (2002): Pathogen-specific regulatory T cells provoke a shift in the T<sub>H</sub>1/T<sub>H</sub>2 paradigm in immunity to infectious diseases. *Trends Immunol* **23**:450
- Medzhitov R., Janeway C. A. Jr. (1997): Innate immunity: impact on the adaptive immune response. *Curr Opin Immunol* **31**:4907
- Medzhitov R. P., Preston-Hurlburt, Janeway C. A. (1997): A human homologue of the Drosophila Toll protein signals activation to the adaptive immunity. *Nature* **388**:394
- Michaelsson J., de Matos C. T., Achour A., Lanier L. L., Kärre K., Söderström K. (2002): A signal peptide derived from hsp60 binds HLA-E and interferes with CD94/NKG2A recognition. *J Exp Med* **196**:1403
- Millar D. G., Garza K. M., Odermatt B., Elford A. R., Ono N., Li Z., Ohashi P. S. (2003): Hsp70 promotes antigen-presenting cell function and converts T-cell tolerance to autoimmunity *in vivo*. *Nature Medicine* **9**:1469
- Mizushima S., Nagata S. (1990): pEF-BOS, a powerful mammalian expression vector. *Nucleic Acids Research* **18**:5322
- Montoya M., Schiavoni G., Mattei F., Gresser I., Belardelle F. (2002): Type I interferons produced by dendritic cells promote their phenotypic and functional activation. *Blood* **99**:3263
- Moré S. H., Breloer M., von Bonin A. (2001): Eukaryotic heat shock proteins as molecular links in innate and adaptive immune responses: Hsp60-mediated activation of cytotoxic T cells. *Int Immunol* **13**:1121
- Moré S. H. (2001): Hitzeschockprotein 60 und Lipopolysaccharid als Gefahrensignale im murinen und humanen Immunsystem. Dissertation im Fachbereich Biologie, Universität Hamburg
- Morelli A. E., Larregine A. T., Ganster R. W., Zahorchak A. F., Plowey J. M., Tadayama T., Logar A. J., Robbins P. D., Falo L. D., Thomson A. W. (2000): Recombinant adenovirus induces maturation of dendritic cells via an NF-kappa B-dependent pathway. *J Virol* **74**:9617

- Morimoto R. I., Tissieres A., Georgopoulos C. (1990): Stress proteins in biology and medicine. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York
- Moseley P. (2000): Review: Stress proteins and immune response. *Immunopharmacology* **48**:299
- Moser M., Murphy K. M. (2000): Dendritic cell regulation of T<sub>H</sub>1-T<sub>H</sub>2 development. *Nat Immunol* **1**:199
- Mosmann T. R., Sad S. (1996): The expanding universe of T-cell subsets: T<sub>H</sub>1, T<sub>H</sub>2 and more. *Immunol Today* **17**:138
- Mosmann T. R., Cherwinski H., Bond M. W., Giedlin M. A., Coffman R. L. (1986): Two types of murine helper T cell clones. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J Immunol* **136**:2348
- Mosmann T. R., Coffman R. L. (1989): T<sub>H</sub>1 and T<sub>H</sub>2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annu Rev Immunol* **7**:145
- Multhoff G., Mizzen L., Winchester C. C., Milner C. M., Wenk S., Eissner G., Kampinga H. H., Laumbacher B., Johnson J. (1999): Heat shock protein 70 (Hsp70) stimulates proliferation and cytolytic activity of natural killer cells. *Exp Hematology* **27**:1627
- Munk M. E., Shinnick T. M., Kaufmann S. H. (1990): Epitopes of mycobacterial heat shock protein 65 for human T cells comprise different structures. *Immunobiology* **180**:272
- Murphy C. A., Langrish C. L., Chen Y., Blumenschein W., McClanahan T., Kastelein R. A., Sedgwick J. D., Cua D. J. (2003): Divergent pro- and antiinflammatory roles for IL-23 and IL-12 in joint autoimmune inflammation. *J Exp Med* **198**:1951
- Murray P. J., Young R. A. (1992): Stress and immunological recognition in host-pathogen interactions. *J Bacteriol* **174**:4193
- Mutini C., Falzoni S., Ferrari D., Chiozzi P., Morelli A., Baricordi O. R., Collo G., Ricciardi-Castagnoli P., Di Virgilio F. (1999): Mouse dendritic cells express the p2X7 purinergic receptor: characterization and possible participation in antigen presentation. *J Immunol* **163**:1958
- Muzio M., Polentarutti N., Bosisio D., Prahlanan M., K., P., Mantovani A. (2000): Toll-like receptors: a growing family of immune receptors that are differentially expressed and regulated by leukocytes. *J Leukocyte Biol* **67**:450
- Neumann F., Schaefer-Ridder M., Wang Y., Hofschneider P. H. (1982): Gene transfer into mouse lymphoma cells by electroporation in high electric fields. *EMBO J* **1**:841
- Nishimura T., Nakui M., Sato M., Iwakabe K., Kitamura H., Sekimoto M., Ota A., Koda T., Nishimura S. (2000): The critical role of T<sub>H</sub>1-dominant immunity in tumor immunology. *Cancer Chemother Pharmacol* **46**:52
- Offtung F., Geluk A., Lundin K. E., Meloen R. H., Thole J. E., Mustafa A. S., Offenhoff T. H. (1994): Mapping of multiple HLA class-II restricted T cell epitopes of the mycobacterial 70-kilodalton heat shock protein. *Infect Immun* **62**:5411
- O'Garra A., Hosken N., Macatonia S., Wenner C. A., Murphy K. (1995): The role of macrophage- and dendritic cell-derived IL12 in Th1 phenotype development. *Res Immunol* **146**:466
- Ogura Y., Inohara N., Benito A., Chen F. F., Yamaoka S., Nunez G. (2001): NOD2, a NOD1/Apaf1 family member that is restricted to monocytes and activates NF-kappaB. *J Biol Chem* **276**:4812
- Ohashi K., Burkart V., Flohé S., Kolb H. (2000): Cutting Edge: Heat shock protein 60 is a putative endogenous ligand of the Toll-like receptor-4 complex. *J Immunol* **164**:558
- Oki Y., Younes A. (2004): Heat shock protein-based cancer vaccines. *Expert Rev Vaccines* **3**:403

- Oppmann B., Lesley R., Blom B., Timans J. C., Xu Y., Hunte B., Vega F., Yu N., Wang J., Singh K., Zonin F., Vaisberg E., Churakova T., Liu M., Gorman D., Wagner J., Zurawski S., Liu Y., Abrams J. S., Moore K. W., Rennick D., de Waal-Malefyt R., Hannum C., Bazan J. F., Kastelein R. A. (2000): Novel p19 protein engages IL-12p40 to form a cytokine, IL-23, with biological activities similar as well as distinct from IL-12. *Immunity* **13**:715
- Osterloh A. (2001): Immunmodulatorische Aktivität von verschiedenen eukaryontischen Hitzeschockprotein 60 (Hsp60)-Molekülen in *in vitro*-Testsystemen. Diplomarbeit im Fachbereich Biologie, Studiengang Biochemie/Molekularbiologie, Universität Hamburg
- Ozinsky A., Underhill D. M., Fontenot J. D., Hajjar A. M., Smith K. D., Wilson C. B., Schroeder L., Aderem A. (2000): The repertoire for pattern recognition of pathogens by the innate immune system is defined by cooperation between toll-like receptors. *Proc Natl Acad Sci USA* **97**:13766
- Panjwani N. N., Popova L., Srivastava P. K. (2000): Production of chemokines by hsp70 and gp96 stimulated antigen presenting cells. *Cell Stress Chaperones* **5**:392
- Patra S. K., Alonso A., Arrondo J. L. R., Goni F. M. (1999): Liposomes containing sphingomyelin and cholesterol: detergent solubilization and infrared spectroscopic studies. *J Liposome Res* **9**:247-260.
- Paul W. E., Seder R. A. (1994): Lymphocyte responses and cytokines. *Cell* **76**:241
- Pierre P., Turley S. J., Gatti E., Hull M., Meltzer J., Mirza A., Inaba K., Steinman R. M., Mellman I. (1997): Developmental regulation of MHC class II transport in mouse dendritic cells. *Nature* **388**:787
- Pennisi E. (1996): Teetering on the brink of danger. *Science* **271**:1665
- Pockley G. (2003): Review: Heat shock proteins as regulators of the immune response. *The Lancet* **362**:469
- Poljak R. J. (1991): Structure of antibodies and their complexes with antigen. *Mol Immunol* **28**:1341
- Poltorak A., He X., Smirnova I., Liu M. Y., van Huffel C., Du X., Birdwell D., Alejos E., Silva M., Galanos C., Freudenberg M., Riciardi-Castagnoli P., Layton B., Beutler B. (1998): Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene. *Science* **282**:2085
- Poltorak A., Ricciardi-Castagnoli P., Citterio S., Beutler B. (2000): Physical contact between lipopolysaccharide and Toll-like receptor 4 revealed by genetic complementation. *Proc Natl Acad Sci USA* **97**:2163
- Potter H. (1988): Electroporation in biology: methods, applications, and instrumentation. *Anal Biochem* **174**:361
- Qin Z., et al. (2003): A critical requirement of interferon gamma-mediated angiostasis for tumor rejection by CD8<sup>+</sup> T cells. *Cancer Res* **63**:4095
- Raabe T., Bukrinsky M., Currie R. A. (1998): Relative contribution of transcription and translation to the induction of tumor necrosis factor- $\alpha$  by lipopolysaccharide. *J Biol Chem* **273**:974
- Rammensee H. G. (1995): Chemistry of peptides associated with MHC class I and class II molecules. *Curr Opin Immunol* **7**:85
- Re F., Strominger J. L. (2001): Toll-like receptor 2 (TLR2) and TLR4 differentially activate human dendritic cells. *J Biol Chem* **276**:37692
- Reid S. D., Penn G., Adorini (2000): The control of T cell responses by dendritic cells subsets. *Curr Opin Immunol* **12**:114
- Reis e Sousa C., Stahl P. D., Austyn J. M. (1993): Phocytosis of antigens by Langerhans cells in vitro. *J Exp Med* **178**:509

- Reis e Sousa C., Hieny S., Schariton –Kersten T., Jankovic D., Charest H., Germain R. N., Sher A. (1997): *In vivo* microbial stimulation induces rapid CD40 ligand-independent production of interleukin 12 by dendritic cells and their redistribution to T cell areas. *J Exp Med* **186**:1819
- Ruddle N. H. (1992): Tumor necrosis factor (TNF- $\alpha$ ) and lymphotoxin (TNF- $\beta$ ). *Curr Opin Immunol* **4**:327
- Sabroe I., Read R. C., Whyte M. K. B., Dockrell D. H., Vogel S. N., Dower S. K. (2003): Toll-like receptors in health and disease: Complex questions remain. *J Immunol* **4**:105
- Sagerstrom C. G., Kerr E. M., Allison J. P., Davis M. M. (1993): Activation and differentiation requirements of primary T cells *in vitro*. *Proc Natl Acad Sci USA* **90**:8987
- Saiki R. K., Gelfand D. H., Stoffel S., Scharf S. J., Higuchi R., Horn G. T., Mullis K. B., Erlich H. A. (1988): Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* **239**:487
- Sakaguchi S. (2003): Control of immune responses by naturally arising CD4<sup>+</sup> regulatory T cells that express Toll-like receptors. *J Exp Med* **197**: 397
- Sakaguchi S., Sakaguchi N., Asano M., Itoh M., Toda M. (1995): Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J Immunol*. **155**:1151
- Sallusto F., Cella M., Daniell C., Lanzavecchia A. (1995): Dendritic cells use macropinocytosis and the mannose receptor to concentrate macromolecules in the major histocompatibility complex class II compartment: downregulation by cytokines and bacterial products. *J Exp Med* **182**:389
- Sanger F., Nicklen S., Coulson A. R. (1977): DNA-sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* **74**:5463
- Santiago-Raber M. L., Baccala R., Haraldsson K. M., Choubey D., Stewart T. A. (2003): Type-I interferon receptor deficiency reduces lupus-like disease in NZB mice. *J Exp Med* **197**:777
- Schild H., Arnold-Schild D., Lammert E., Rammensee H.-G. (1999): Stress proteins and immunity mediated by cytotoxic T lymphocytes. *Curr Opinion Immunol* **11**:109-113
- Schlaak J. F., Hilkens C. M., Costa-Pereira A. P., Strobl B., Aberger F., Frischauf A. M., Kerr I. M. (2002): Cell-type and donor-specific transcriptional responses to interferon- $\alpha$ . Use of customized gene arrays. *J Biol Chem* **277**:49428
- Schnare, M., Holt, A. C., Takeda, K., Akira, S., Medzhitov, R. (2000): Recognition of CpG DNA is mediated by signaling pathways dependent on the adaptor protein MyD88. *Curr Biol* **10**:1139
- Schnurr M., Then F., Galambos P., Scholz C., Siegmund B., Endres S., Eigler A. (2000): Extracellular ATP and TNF- $\alpha$  synergize in the activation and maturation of human dendritic cells. *J Biol Chem* **272**:24348
- Schorle H., Holtschke T., Hunig T., Schimpl T., Horak I. (1991): Development and function of T cells in mice rendered interleukin-2 deficient by gene targeting. *Nature* **352**:621
- Schroeder R., London E., Brown D. (1994): Interactions between saturated acyl chains confer detergent resistance on lipids and glycosylphosphatidylinositol (GPI)-anchored proteins: GPI- anchored proteins in liposomes and cells show similar behavior. *Proc Natl Acad Sci USA* **91**:12130-12134
- Schroeder R. J., Ahmed S. N., Zhu Y., London E., Brown D. A. (1998): Cholesterol and sphingolipid enhance the Triton X-100 insolubility of glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins by promoting the formation of detergent-insoluble ordered membrane domains. *J Biol Chem* **273**:1150-1157
- Schwalbe R. A., Dahlback B., Coe J. W., Nelsestuen G. L. (1992): Pentraxin family of proteins interact specifically with phosphorylcholine and/or phosphorylethanolamine. *Biochemistry* **31**:4907

- Schwartz R. H. (1990): A cell culture model for T lymphocyte clonal anergy. *Science* **248**:1349
- Seder R. A., Gazzinelli R., Sher A., Paul W. E. (1993): Interleukin 12 acts directly on CD4<sup>+</sup> T cells to enhance priming for interferon- $\gamma$  production and diminishes interleukin 4 inhibition of such priming. *Proc Natl Acad Sci USA* **90**:10188
- Shankaran V., Ikeda H., Bruce A. T., White J. M., Swanson P. E., Old L. J., Schreiber R. D. (2001): IFN $\gamma$  and lymphocytes prevent primary tumour development and shape tumour immunogenicity. *Nature* **410**:1107
- Sheibanie A. F., Tadmor J., Jing H., Vassiliou E., Ganea D. (2004): Prostaglandin E2 induces IL-23 production in bone marrow-derived dendritic cells. *FASEB J* **18**:1318
- Shevach E. M. (2000): Regulatory T cells in autoimmunity. *Annu Rev Immunol* **18**:423
- Singh-Jasuja H., Scherer H. U., Hilf N., Arnold-Schild D., Rammensee H. G., Toes R. E., Schild H. (2000): The heat shock protein gp96 induces maturation of dendritic cells and down-regulation of its receptor. *Eur J Immunol* **30**:2211
- Smith K. A. (1980): T-cell growth factor. *Immunol Rev* **51**:337
- Smith K. A. (1984): Interleukin 2. *Annu Rev Immunol* **2**:319
- Smits H. H., van Beelen A. J., Hessle C., Westland R., de Jong E., Soeteman E., Wold A., Wierenga E. A., Kapsenberg M. L. (2004): Commensal Gram-negative bacteria prime human dendritic cells for enhanced IL-23 and IL-27 expression and enhanced T<sub>H</sub>1 development. *Eur J Immunol* **34**:1371
- Smyth M. J., Cretney E., Kershaw M. H., Hayakawa Y. (2004): Cytokines in cancer immunity and immunotherapy. *Immunol Rev* **202**:275
- Squier M. K., Cohen J. J. (1994): Cell-mediated cytotoxic mechanisms. *Curr Opin Immunol* **6**:447
- Srivastava P., Menoret A., Basu S., Binder R. J., McQuade K. L. (1998): Heat shock proteins come of age: primitive functions acquire new roles in an adaptive world. *Immunity* **8**:657-665
- Strominger F. (2001): Toll-like receptor 2 (TLR2) and TLR4 differentially activate human dendritic cells. *J Biol Chem* **276**:37692
- Sukharev S. I., Klenchin V. A., Serov S. M., Chernomordik I. V., Chismadzhev Y. A. (1994): Electroporation and electrophoretic DNA transfer into cells. The effect of DNA interaction with electropores. *Biophys J* **63**:1320
- Suto R., Srivastava P. K. (1995): A mechanism for the specific immunogenicity of heat shock protein-chaperoned peptides. *Science* **269**:1585
- Suzuki H., Kurihara Y., Takeya M., Kamada N., Kataoka M., Jishage K., Ueda O., Sakaguchi H., Higashi T., Suzuki T., Takashim Y., Kawabe Y., Cynshi O., Wada Y., Honda M., Kurihara H., Aburatani H., Doi T., Matsumoto A., Azuma S., Noda T., Toyoda Y., Itakura H., Yzaki Y., Horiuchi S., Takahashi K., Kruijt J. K., van Berkel T. J. C., Steinbrecher U. P., Ishibashi S., Maeda N., Gordon S., Kodama T. (1997): A role for macrophage scavenger receptors in atherosclerosis and susceptibility to infection. *Nature* **386**:292
- Tada T., Ohzeki S., Utsumi K., Takiuchi H., Muramatsu M., Li X. F., Shimizu J., Fujiwara H., Hamaoka T. (1991): Transforming growth factor  $\beta$ -induced inhibition of T cell function. Susceptibility difference in T cells of various phenotypes and functions and its relevance to immunosuppression in the tumor-bearing stat. *J Immunol* **146**:1077
- Takahashi T., Tagami T., Yamazaki S., Uede T., Shimizu J., Sakaguchi N., Mak T. W., Sakaguchi S. (2000): Immunologic self-tolerance maintained by CD25<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> regulatory T cells constitutively expressing cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4. *J Exp Med* **192**: 303



- Takai T., Ohmori H. (1990): Transfection of mouse lymphoid cells by the combination of DEAE-dextran-mediated DNA uptake and osmotic shock procedure. *Biochem Biophys Acta* **1048**:105
- Takeda K., Kaisho T., Akira S. (2003): Toll-like receptors. *Annu Rev Immunol* **21**:335
- Takeuchi, O., Takeda, K., Hoshino, K., Adachi, O., Ogawa, T. and Akira, S. (2000): Cellular responses to bacterial cell wall components are mediated through MyD88-dependent signaling cascades. *Int Immunol* **12**:113
- Theofilopoulos A. N., Baccala R., Beutler B., Kono D. H. (2005): Type I interferons ( $\alpha/\beta$ ) in immunity and autoimmunity. *Annu Rev Immunol* **23**:307
- Thomas C. A., Li Y., Kodama T., Suzuki A., Silverstein S. C., El Khoury J. (2000): Protection from lethal gram-positive infection by macrophage scavenger receptor-dependent phagocytosis. *J Exp Med* **191**:147
- Trinchieri G. (2003): Interleukin-12 and the regulation of innate resistance and adaptive immunity. *Nat Rev Immunol* **3**:133
- Tsan M. F., Gao B. (2004): Review: Cytokine function of heat shock proteins. *Am J Physiol Cell Physiol* **286**:C739
- Tsan M. F., Gao B. (2004): Endogenous ligands of Toll-like receptors. *J Leukocyte Biol* **76**:514
- Ueda G., Tamura Y., Hirai I., Kamiguchi K., Ichimiya S., Torigoe T., Hiratsuka H., Sunakawa H., Sato N. (2004): Tumor-derived heat shock protein 70-pulsed dendritic cells elicit tumor-specific cytotoxic T lymphocytes (CTL) and tumor immunity. *Cancer Sci* **95**:248
- Ueki K., Tabeta K., Yoshie H., Yamazaki K. (2002): Self-heat shock protein 60 induces tumor necrosis factor- $\alpha$  in monocyte-derived macrophages: possible role in chronic inflammatory periodontal disease. *Clin Exp Immunol* **127**:72
- Ulevitch R. J., Tobias P. S. (1995): Receptor-dependent mechanisms of cell stimulation by bacterial endotoxin. *Annu Rev Immunol* **13**:437
- Underhill D. M. (2003): Mini-review: Toll-like receptors: network for success. *Eur J Immunol* **33**:1767
- Vabulas R. M., Ahmad-Nejad P., da Costa C., Miethke T., Kirschning C. J., Hacker H., Wagner H. (2001): Endocytosed HSP60s use toll-like receptor 2 (TLR2) and TLR4 to activate the toll/interleukin-1 receptor signaling pathway in innate immune cells. *J Biol Chem* **276**:31332
- Velupillai P., Harn D. A. (1994): Oligosaccharide-specific induction of interleukin 10 production by B220<sup>+</sup> cells from schistosome-infected mice: a mechanism for regulation of CD4<sup>+</sup> T-cell subsets. *Proc Natl Acad Sci USA* **91**:18
- Vieira P. L., de Jong E. C., Wierenga E. A., Kapsenberg M. L., Kalinski P. (2000): Development of T<sub>H</sub>1-inducing capacity in myeloid dendritic cells requires environmental instruction. *J Immunol* **164**:4507
- Vilcek J., Lee T. H. (1991): Tumor necrosis factor: new insights into the molecular mechanisms of its multiple actions. *J Biol Chem* **266**:7313
- Wallin R. P., Lundqvist A., Moré S. H., von Bonin A., Kiessling R., Ljunggren H. G. (2002). Heat-shock proteins as activators of the innate immune system. *Trends Immunol* **23**:130
- Wang M. H., Grossmann M. E., Young C. Y. F. (2004): Forced expression of heat-shock protein 70 increases the secretion of Hsp70 and provides protection against tumour growth. *Brit J Cancer* **90**:926
- Wang Y., Kelly C. G., Karttunen J. T., Whittall T., Lehner P. J., Duncan L., MacAry P., Younson J. S., Singh M., Oehlmann W., Cheng G., Bergmeier L., Lehner T. (2001): CD40 is a cellular receptor mediating mycobacterial heat shock protein 70 stimulation of CC-chemokines. *Immunity* **15**:971
- Waterhouse P., Marengere L. E., Mittrucker H. W., Mak T. W. (1996): CTLA-4, a negative regulator of T-lymphocyte activation. *Immunol Rev* **153**:183

- 
- Weiss A., Littman D. R. (1994): Signal transduction by lymphocyte antigen receptors. *Cell* **76**:263
- Weiss W. R., Berzowsky J. A., Houghton R. A., Sedegah M., Hollindale M., Hoffman S. L. (1992): A T cell clone directed at the circumsporozoite protein which protects mice against *Plasmodium yoelii* and *Plasmodium berghei*. *J Immunol* **149**:2103
- Wick G., Knoflach M., Xu Q. (2004): Autoimmune and inflammatory mechanisms in atherosclerosis. *Annu Rev Immunol* **22**:361
- Williams B. R. (1999): PKR: a sentinel kinase for cellular stress. *Oncogene* **18**:6112
- Yang R. B., Mark M. R., Gray A., Huang A., Xi M. H., Zhang M., Goddard A., Wood W. I., Gurney A. L., Godowski P. J. (1998): Toll-like receptor-2 mediates lipopolysaccharide-induced cellular signalling. *Nature* **395**:284
- Young R. A. (1990): Stress proteins and immunology. *Annu Rev Immunol* **8**:401
- Young R. A., Elliot T. J. (1990): Stress proteins, infection, and immune surveillance. *Cell* **59**:5
- Zanin-Zhorov A., Bruck R., Tal G., Oren S., Aeed H., Hershkoviz R., Cohen I. R., Lider O. (2005): Heat shock protein 60 inhibits Th1-mediated hepatitis model via innate regulation of Th1/Th2 transcription factors and cytokines. *J Immunol* **174**:3227
- Zanin-Zhorov A., Nussbaum G., Franitza S., Cohen I. R., Lider O. (2003): T cells respond to heat shock protein 60 via TLR2: activation of adhesion and inhibition of chemokine receptors. *FASEB J.* **11**:1567
- Zheng H., Dai J., Stoilova D., Li Z. (2001): Cell surface targeting of heat shock protein pg96 induces dendritic cell maturation and antitumor immunity. *J Immunol* **167**:6731