

**HITZESCHOCKPROTEINE:  
INTERAKTION MIT HLA-DR-MOLEKÜLEN UND  
EINFLUSS AUF DIE  
MHC II-VERMITTELTE T-ZELLANTWORT**

**DISSERTATION**

**der Fakultät für Chemie und Pharmazie  
der Eberhard-Karls-Universität Tübingen  
zur Erlangung des Grades eines Doktors  
der Naturwissenschaften**

**2005**

**vorgelegt von**

**MARKUS HAUG**

Tag der mündlichen Prüfung: 02. August 2005

Dekan: Prof. Dr. S. Laufer

1. Berichterstatter: Prof. Dr. H.-G. Rammensee

2. Berichterstatter: Prof. Dr. G. E. Dannecker

## DANKSAGUNGEN

Sehr herzlichen bedanken möchte ich mich bei allen, die zum Entstehen dieser Arbeit beigetragen haben.

Mein besonderer Dank gilt:

Herrn Professor Dr. Günther Dannecker für die Überlassung des Themas und des Arbeitsplatzes sowie die wissenschaftlich und menschlich hervorragende Betreuung. Sein ständiges, persönliches Interesse an dieser Arbeit und seine jederzeit gewährte Unterstützung, auch nach seinem Wechsel an das Olgahospital Stuttgart, haben entscheidenden Anteil am Gelingen dieser Arbeit.

Herrn Professor Dr. Hans-Georg Rammensee für die naturwissenschaftliche Betreuung dieser Arbeit, die Möglichkeit zur Diskussion der Ergebnisse im „Heat-shock-Club“, sowie für seine wertvollen Hinweise bei der Diskussion von Ergebnissen und Publikationen.

Frau Dr. Ursula Holzer, die das Projekt seit dem Weggang von Herrn Dannecker leitet. Besonders für die Proliferationsexperimente war ihr während ihrer post-doc Zeit in Seattle erworbenes T-Zellwissen von großer Bedeutung. Ihrem Einsatz ist es zu verdanken, dass eine zukünftige Weiterführung des Projektes mit neuen Fragestellungen gesichert werden konnte.

Dr. Jan Maier, der mich für die Thematik der Interaktion von Hitzeschockproteinen mit HLA-DR-Peptidfragmenten begeistert hat. Er hat die Methode der Bindung an Fractogel-gebundene Peptide etabliert und Versuche mit DnaK durchgeführt. Diese Ergebnisse bilden den Ausgangspunkt dieser Arbeit und sind in seiner Dissertation nachzulesen (Maier 2004). Für die hier vorgestellte Arbeit wurden die Ergebnisse mit DnaK reproduziert und Versuche mit weiteren Hitzeschockproteinen durchgeführt. Diese Ergebnisse wurden in Maier *et al.* (2002) veröffentlicht. Die hier gezeigten Abbildungen stammen dabei ausschließlich von mir.

Herrn Dr. Hubert Kalbacher und seiner Arbeitsgruppe für die Synthese der verwendeten Peptide, sowie die Möglichkeit an der Synthese und Reinigung der Peptide aktiv mitwirken zu können. Unterstützung erhielt ich auch bei der Aufreinigung der HLA-DR-Moleküle aus Zelllinien, die im Labor von Dr. Kalbacher durchgeführt wurde.

Den Professoren William W. Kwok, Gerald T. Nepom und Jane H. Buckner vom Benaroya Research Institute (BRI) at Virginia Mason, Seattle, USA. Durch einen Forschungsaufenthalt am BRI habe ich wesentliche Impulse für die T-Zellproliferationsexperimente erhalten. Im Rahmen einer Kooperation wurden von William W. Kwok die rekombinanten HLA-DR-Moleküle zur Herstellung der in dieser Arbeit verwendeten HLA-DR-Tetramere zur Verfügung gestellt. Fragen bei der Etablierung der Methode wurden immer umgehend beantwortet, die gewonnenen Ergebnisse diskutiert und neue Ideen, auch für zukünftige Fragestellungen eingebracht.

Frau Prof. Dr. Dorothee Wernet, Transfusionsmedizin Tübingen für die HLA-DR-Typisierung der Donoren und Zelllinien sowie die Überlassung von Buffy-Coats.

Dr. Stefan Stevanovic und Dr. Steffen Walter, Interfakultäres Institut für Zellbiologie, für das zur Verfügung stellen der Zelllinie AL10 und den Erhalt des rekombinanten HLA-A\*0201-Moleküls.

Frau Luciana Dannecker für das Erlernen vieler Methoden, ihre Mithilfe bei der T-Zellisolierung und Durchführung der Proliferationsexperimente, sowie für ihre Freundschaft und Unterstützung in allen Lebenslagen, auch außerhalb des Labors.

Des Weiteren möchte ich mich bei allen Mitarbeitern im Labor bedanken. Dabei gilt mein ganz besonderer Dank Herrn Dipl. Biochem. Carsten Schepp für die gute Zusammenarbeit und Diskussion der Ergebnisse, Dr. Thomas Volz für die Unterstützung beim Erlernen der Methode der HLA-DR-Aufreinigung und Cand. med. Nicoleta Hesse für die Weiterführung der Bindungsversuche mit HLA-Peptidfragmenten.

Schließlich möchte ich mich ganz besonders bei meinen Freunden und bei meiner Familie bedanken, deren geduldige und liebevolle Unterstützung diese Arbeit erst möglich gemacht haben.

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft (SFB 510 Stammzellbiologie und Antigenprozessierung, Teilprojekt D3) danke ich für die finanzielle Unterstützung dieser Dissertation.

# INHALTSVERZEICHNIS

<b>1 EINLEITUNG</b> .....	<b>1</b>
1.1 Das Immunsystem des Menschen .....	1
1.2 Autoimmunerkrankungen .....	2
1.3 Rheumatoide Arthritis .....	3
1.3.1 Genetische Assoziation der RA mit HLA-Klasse II-Molekülen, „Shared-Epitope“-Hypothese und RA-Protektionshypothese .....	4
1.4 MHC-Moleküle .....	6
1.4.1 HLA-DR-Moleküle .....	8
1.4.2 Prozessierung und Präsentation antigener Peptide durch HLA-Moleküle.....	10
1.4.3 Antigenerkennung durch T-Zellen .....	12
1.5 Hitzeschockproteine .....	13
1.6 HSP70-Moleküle .....	15
1.7 HSPs und Antigenpräsentation .....	18
1.7.1 HSPs und MHC I.....	18
1.7.2 HSPs und MHC II.....	19
1.8 Ausgangspunkt und Ziel der Arbeit: .....	19
<b>2 MATERIALIEN</b> .....	<b>22</b>
2.1 Geräte .....	22
2.2 Chemikalien, Reagenzien und Kits.....	22
2.3 Proteine und Antikörper.....	24
2.4 Zelllinien .....	25
2.5 Verbrauchsmaterialien .....	25
2.6 Puffer und Lösungen .....	26
<b>3 METHODEN</b> .....	<b>27</b>
3.1 Fractogel-Säulen .....	27
3.2 Peptidsynthese.....	28
3.2.1 Synthese der nicht Fractogel-gebundenen Peptide: .....	28
3.2.2 Synthese der Fractogel-gebundenen Peptide:.....	29
3.3 Fractogel-Bindungsversuche:.....	29
3.4 SDS-PAGE.....	30
3.5 Europium-Fluoreszenz-Assay .....	30

3.5.1	Europium-Fluoreszenz-Assay mit HLA-DR-Peptidfragmenten.....	31
3.5.2	Europium-Fluoreszenz-Assay mit löslichen HLA-DR-Molekülen.....	32
3.6	Isolierung und Biotin-markierung von HLA-DR-Molekülen aus Zelllinien ...	33
3.6.1	Isolierung von HLA-DR-Molekülen aus Zelllinien .....	33
3.6.2	Biotin-Markierung der isolierten HLA-DR-Moleküle .....	34
3.7	Bestimmung der Proteinkonzentration .....	35
3.8	Zellbiologische Methoden.....	35
3.8.1	Zellkultur immortalisierter B-Zelllinien zur HLA-DR-Isolierung.....	35
3.8.2	Kultur humaner T-Zellen für T-Zellstimulationsexperimente.....	35
3.8.3	Gewinnung von humanem Serum für die T-Zellkultur .....	36
3.8.4	Isolierung mononukleärer Zellen aus peripherem Blut .....	36
3.8.5	Isolierung von CD4 <sup>+</sup> T-Zellen .....	37
3.9	CFSE-Färbung .....	37
3.10	T-Zellproliferationsexperimente .....	38
3.11	Herstellung der Hsp70:Peptid-Komplexe .....	39
3.12	rekombinante HLA-DR-Moleküle und HLA-DR-Tetramere.....	40
3.12.1	rekombinante HLA-DR-Moleküle.....	40
3.12.2	HLA-DR-Tetramere .....	41
3.13	Färbung von Zellen mit Antikörpern und HLA-DR-Tetrameren .....	43
3.13.1	Färbung mit Antikörpern.....	43
3.13.2	Färbung mit HLA-DR-Tetrameren .....	44
3.14	Durchflusszytometrie .....	44
<b>4</b>	<b>ERGEBNISSE.....</b>	<b>46</b>
4.1	Qualitative Bindungsuntersuchungen mit HSP70 und Fractogel-gebundenen HLA-DR-Peptidfragmenten .....	46
4.1.1	Interaktion von HSP70-Molekülen mit 5 AS langen Peptidsequenzen aus der HV3-Region von HLA-DR: Nichtbindung nur für das Peptid mit der Sequenz <sup>70</sup> DERAA <sup>74</sup> .....	46
4.1.2	Interaktion von HSP70-Molekülen mit 15 AS langen Fractogel- gebundenen Peptidsequenzen: Bestätigung der Ergebnisse mit den 5 AS langen Peptiden.....	48
4.1.3	„Asparaginsäure-Scan“: Negativ geladene Seitenketten an Position 71 und 72 verhindern die HSP70:Peptid-Interaktion.....	50

4.1.4	Im murinen Arthritis-Modell protektive Sequenzen zeigen ebenfalls keine Interaktion mit HSP70 .....	51
4.2	Quantitative Bindungsuntersuchungen mit HSP70 und HLA-DR-Peptidfragmenten im Europium-Fluoreszenz-Assay .....	52
4.2.1	Methodische Ergebnisse: Optimierung des Europium-Fluoreszenz-Assays .....	52
4.2.2	Quantitative Bindungsuntersuchungen mit DnaK und einem HLA-DRB1*0801-Peptidfragment: gefundener $K_d$ -Wert von 30 $\mu$ M.....	54
4.2.3	Kompetitionsversuche mit unmarkierten Peptidfragmenten aus der HV3-Region von HLA-DR. Bestätigung des Bindungsmusters aus den Fractogel-Versuchen .....	55
4.2.4	Bindungsversuche mit humanem Hsp70: geringere Affinität der Peptide, differentielles Bindungsmuster weniger stark ausgeprägt .....	57
4.3	Bindungsuntersuchungen mit HSP70 und intakten, aus Zelllinien aufgereinigten HLA-DR-Molekülen .....	58
4.3.1	Methodische Ergebnisse: Optimierung des Europium-Fluoreszenz-Assays für Bindungsuntersuchungen mit intakten HLA-DR-Molekülen	58
4.3.2	Interaktion ganzer HLA-DR-Moleküle mit verschiedenen HSP70-Molekülen: starke Interaktion mit humanem Hsp70.....	59
4.3.3	Intakte, nicht aber denaturierte HLA-DR-Moleküle interagieren spezifisch mit HSP70-Molekülen .....	60
4.3.4	Die Hsp70-HLA-DR-Interaktion besitzt einen gefundenen $K_d$ -Wert von ca. 100 nM.....	62
4.3.5	Kompetition durch unmarkierte HLA-DR-Moleküle: keine signifikanten Unterschiede zwischen den verschiedenen HLA-DR-Varianten.....	63
4.3.6	Die Interaktion zwischen HLA-DR und HSP70 kann nicht durch Peptidfragmente aus der HV3-Region von HLA-DR kompetitiert werden. ....	64
4.3.7	Die Hsp70-Interaktion der HLA-DR-Peptidfragmente ist ATP-abhängig, die Interaktion der ganzen HLA-DR-Moleküle wird durch ATP nicht beeinflusst. ....	65
4.3.8	Versuche mit rekombinanten HLA-DR-Molekülen: Hsp70-Affinität ohne signifikantes allelspezifisches Bindungsmuster .....	66

4.4	T-Zellproliferationsversuche: Beeinflusst Hsp70 die Proliferation antigenspezifischer CD4 <sup>+</sup> T-Zellen? .....	69
4.4.1	Methodische Ergebnisse: Optimierung der T-Zellkultur .....	70
4.4.2	Donoren .....	71
4.4.3	Verwendete antigene Peptide und deren Hsp70-Affinität.....	71
4.4.4	Messung der CD4 <sup>+</sup> T-Zellproliferation mittels Verdünnung des Farbstoffes CFSE .....	73
4.4.5	Test der Peptidreaktivität der Donoren.....	74
4.4.7	Hsp70 verstärkt die CD4 <sup>+</sup> T-Zellproliferation .....	76
4.4.8	Hsp70-Konzentration beeinflusst die CD4 <sup>+</sup> T-Zellproliferation .....	80
4.4.9	Die Anzahl der eingesetzten APZs beeinflusst den Hsp70-Effekt .....	82
4.4.10	Komplexierung der Peptide an Hsp70 ist Voraussetzung für die Proliferationsverstärkung .....	84
4.4.11	Mit Hsp70:Peptid-Komplexen generierte T-Zellen sind .....	
	antigenspezifisch.....	85
4.4.12	Kontrollproteine verstärken die Proliferation antigenspezifischer Zellen nicht.....	91
<b>5</b>	<b>DISKUSSION.....</b>	<b>93</b>
5.1	Ergebnisse mit HSP70 und Fractogel-gebundenen .....	
	HLA-DR-Peptidfragmenten .....	94
5.2	Quantitative Ergebnisse mit HLA-DR-Peptidfragmenten.....	98
5.3	Versuche mit intakten HLA-DR-Molekülen .....	102
5.4	Experimente zur T-Zellproliferation .....	107
<b>6</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>118</b>
<b>7</b>	<b>LITERATUR .....</b>	<b>120</b>



### **Besondere Hinweise**

Fehlerbalken in den Abbildungen geben den 95 %-Vertrauensbereich des Mittelwertes an.

Gesetzlich geschützte Warenzeichen werden ohne besondere Kennzeichnung verwendet.

Für Hitzeschockproteine wird in dieser Arbeit folgende Nomenklatur verwendet: die Schreibweise in Großbuchstaben (z. B. HSP70) bezeichnet die gesamte Klasse von HSP-Molekülen mit diesem Molekulargewicht, wird nur der Anfangsbuchstabe groß geschrieben, so wird ein bestimmtes Protein dieser Klasse bezeichnet (z. B. Hsp70, Hsc70).

## ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Abb.	Abbildung
ADP	Adenosin-diphosphat
Ak	Antikörper
APC	Allophycocyanin
APZ	antigenpräsentierende Zelle
AS	Aminosäure
ATP	Adenosin-triphosphat
B-LCL	Humane B-Lymphoblastoid-Zelllinie ( <i>B-lymphoblastoid cell line</i> )
BSA	Rinderserumalbumin ( <i>bovine serum albumine</i> )
CD	<i>Cluster of differentiation</i>
CFSE	5(6)-Carboxyfluorescein di-acetate N-succinimidyl ester
CIA	Collagen-induzierte Arthritis
CLIP	class II associated invariant chain peptide
cps	<i>counts per second</i>
DELFA	Europium-Fluoreszenz-Assay ( <i>dissociation-enhanced lanthanide fluoro-immuno assay</i> )
DMF	N,N-Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTT	1,4-Dithiothreitol
<i>E.coli</i>	Escherichia coli
EBV	Eppstein-Barr-Virus
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
ER	endoplasmatisches Retikulum
ESI-MS	Elektrosprayionisations-Massenspektrometrie
FACS	<i>fluorescence activated cell sorting/scanning</i>
FCS	Fötales Kälberserum
Fmoc	9-Fluorenyl-methoxycarbonyl
FSC	Vorwärtsstreulicht ( <i>forward scatter</i> )
HA	Hämagglutinin
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonsäure

HLA	<i>human leukocyte antigen</i>
HSA	Humanes Serumalbumin
Hsc70	konstitutiv exprimiertes, zytosolisches HSP70-Molekül, = Hsc73
Hsc70-ATPf	ATPase-Fragment von Hsc70
HSP	Hitzeschockprotein
HSP70	70 kDa HSP-Familie
Hsp70	stress-induzierbares, zytosolisches HSP70-Molekül, = Hsp72
HV3	Hypervariable Region 3
IHW	<i>International Histocompatibility Workshop</i>
IL	Interleukin
JIA	Juvenile Idiopathische Arthritis
kDa	Kilodalton
li	Invariante Kette ( <i>invariant chain</i> )
LPS	Lipopolysaccharid
M	Molar
MACS	<i>magnetic cell sorting</i>
mAk	monoklonaler Antikörper
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex ( <i>major histocompatibility complex</i> )
MIIC	MHC Klasse II-Beladungskompartiment
MOPS	3-(N-morpholino)propansulfonsäure
PBMC	mononukleäre Zelle des peripheren Blutes ( <i>peripheral blood mononuclear cells</i> )
PBS	Phosphat-gepufferte Saline ( <i>phosphate-buffered saline</i> )
PE	Phycoerythrin
PHA	Phytohämagglutinin
PHS	gepooltes humanes Serum ( <i>pooled human serum</i> )
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
RA	Rheumatoide Arthritis
RAP	RA-Protektionshypothese
RP-HPLC	Umkehrphasen-Hochdruckflüssigkeitschromatographie
rpm	<i>rotations per minute</i>

RT	Raumtemperatur
s.	siehe
SA	Streptavidin
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
SE	shared epitope
SEB	Staphylokokken Enterotoxin B
SSC	Seitwärtsstreulicht ( <i>side scatter</i> )
TAP	<i>transporter associated with antigen processing</i>
TBTU	2-(1H-benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium-tetrafluoroborat
Th-Zellen	T-Helferzelle
TLR	“Toll-like“-Rezeptor
T <sub>reg</sub>	CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>high</sup> T-Regulationszelle
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
TT	Tetanus-Toxin
TZR	T-Zell-Rezeptor

## DER EINBUCHSTABENCODER DER AMINOSÄUREN

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

# 1 EINLEITUNG

## 1.1 Das Immunsystem des Menschen

Das Immunsystem ist ein komplexes System bestehend aus Organen, Zellen und Eiweißkörpern, deren Funktion in der Abwehr körperfremder Substanzen und Krankheitserregern wie Bakterien, Viren, Parasiten oder Pilzen besteht. Voraussetzung dafür ist, dass das Immunsystem zwischen körpereigenen und körperfremden Strukturen unterscheiden kann, so dass im Normalfall keine Immunreaktion gegen den eigenen, gesunden Körper erfolgt ("immunologische Selbsttoleranz"). Durch ein komplexes Zusammenwirken der verschiedenen Komponenten ist das Immunsystem in der Lage, das Gleichgewicht zwischen Selbsttoleranz und Abwehr zu gewährleisten. Werden körpereigene Strukturen vom Immunsystem angegriffen, kann dies zur Entstehung von Autoimmunerkrankungen führen, umgekehrt kann eine zu große Toleranz dazu führen, dass krankhafte körpereigene Zellen wie Tumorzellen nicht erkannt werden.

Das Immunsystem besteht aus der angeborenen und der erworbenen Immunität. Zum angeborenen Immunsystem zählen unter anderem das Komplementsystem, antimikrobielle Enzyme und zelluläre Komponenten wie Granulozyten, Makrophagensystem und natürliche Killerzellen. Das angeborene Immunsystem ist der entwicklungsgeschichtlich ältere Teil des Immunsystems und bildet die erste, sehr schnelle Abwehr des Körpers gegen eingedrungene Erreger. Die Zellen des angeborenen Immunsystems erkennen über Rezeptoren wie die „Toll-like“-Rezeptoren spezifisch verschiedene Strukturmerkmale, die bei bakteriellen oder viralen Pathogenen häufig vorkommen und können damit effizient zwischen körpereigenen und körperfremden Strukturen unterscheiden.

Das erworbene Immunsystem stellt ein hochspezialisiertes System dar, dessen Grundlage die B- und T-Lymphozyten, sowie die antigenpräsentierenden Zellen (APZs) bilden. B-Lymphozyten reifen im Knochenmark und vermitteln die humorale Immunantwort. Über den B-Zellrezeptor können sie spezifisch Antigene binden, aufnehmen, prozessieren und die Peptidfragmente als APZs an T-Zellen präsentieren. Nach Interaktion mit einer T-Zelle kommt es zur klonalen Expansion und zur Differenzierung in antikörpersezernierende Plasmazellen oder Gedächtniszellen. T-Zellen reifen im Thymus, besitzen den T-Zell-Rezeptor (TZR)

und werden aufgrund zweier Oberflächenstrukturen in CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen unterteilt. CD4<sup>+</sup> T-Zellen werden auch als T-Helferzellen bezeichnet (Th-Zellen), CD8<sup>+</sup> T-Zellen sind für die zytotoxische T-Zellantwort verantwortlich und spielen bei der Bekämpfung virusinfizierter und entarteter Körperzellen eine wichtige Rolle.

Zu den professionellen APZs gehören neben den B-Zellen vor allem die dendritische Zellen und Makrophagen. Zu ihren Funktionen gehört es, antigene Strukturen aufzunehmen und über MHC-Moleküle (major histocompatibility complex, im humanen System auch als human leucocyte antigen, HLA, bezeichnet, s. 1.4) an Lymphozyten zu präsentieren, sowie kostimulatorische Signale auszusenden.

## 1.2 Autoimmunerkrankungen

Etwa fünf Prozent der Bevölkerung in westlichen Ländern sind von Autoimmunerkrankungen betroffen. Die häufigsten sind die autoimmune Thyreoiditis, die Rheumatoide Arthritis (RA) und Typ I Diabetes. Bekannt ist, dass Autoimmunerkrankungen wie die Juvenile Idiopathische Arthritis (JIA) bei Kindern oder die Rheumatoide Arthritis bei Erwachsenen T-Zell-vermittelte Erkrankungen sind, deren Entstehung eng mit definierten MHC Klasse II-Allelen assoziiert ist. Bei der RA werden beispielsweise prädisponierende Allele (z. B. HLA-DRB1\*0401) von protektiven Allelen (z. B. HLA-DRB1\*0402) unterschieden (s. 1.3). Die genauen Mechanismen, die der Auslösung dieser Erkrankungen und der HLA-Assoziation zugrunde liegen, sind jedoch bis heute unklar. Eine Hypothese geht davon aus, dass am Beginn einer Autoimmunerkrankung die Reaktion auf ein einzelnes autoantigenes Peptid steht, allerdings ist über diese krankheitsauslösenden Peptide mit wenigen Ausnahmen noch sehr wenig bekannt. Eine wichtige Rolle spielt sicher, dass die verschiedenen allelischen Varianten der MHC II-Moleküle verschiedene Affinitäten für antigene Peptide besitzen und dadurch stark unterschiedliche Peptide an CD4<sup>+</sup> T-Zellen präsentieren können.

Normalerweise werden autoreaktive T-Zellen bei der Reifung im Thymus negativ selektiert (Sebzda *et al.* 1994), dennoch können einige autoreaktive T-Zellen trotzdem in die Peripherie gelangen. Dabei wird vermutet, dass diese autoreaktiven T-Zellen nur eine schwache Avidität zum autoantigenen Peptid besitzen und damit der negativen T-Zell-Selektion entkommen können (Lee *et al.* 1999). Neben dieser

Deletion im Thymus besitzt das Immunsystem noch einen weiteren Mechanismus, um die Toleranz gegenüber autoreaktiven T-Zellen zu gewährleisten: CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>-Regulationszellen (T<sub>reg</sub>) unterdrücken die Aktivierung autoreaktiver T-Zellen (Sakaguchi *et al.* 1995). Entfernt man diese Regulationszellen, können auch im peripheren Blut der meisten gesunden Spender autoreaktive CD4<sup>+</sup> T-Zellen mit mittlerer und sogar hoher Avidität nachgewiesen werden (Danke *et al.* 2004).

### 1.3 Rheumatoide Arthritis

Die Rheumatoide Arthritis (RA) tritt mit einer Prävalenz von etwa 1% in der Bevölkerung auf, wobei Frauen häufiger betroffen sind als Männer (Feldmann *et al.* 1996). Bei der RA handelt es sich um eine chronische, entzündliche Multisystemerkrankung, die sich vor allem in den Gelenken manifestiert. Es kommt zu einer Infiltration der Synovialmembran und Synovialflüssigkeit mit aktivierten mononukleären Blutzellen wie Gedächtnis-Th-Zellen, Makrophagen und Plasmazellen, Zytokine werden produziert, Blutgefäße gebildet. Fortschreitende Zerstörung von Knorpel und Knochen sind die Folge, es kommt zu einer systemischen Entzündung mit erhöhten Entzündungsparametern (z. B. Akut-Phasen-Proteine), in besonders schweren Fällen sind auch Blutgefäße und weitere Organe betroffen.

Die in den Gelenken gefundenen T-Zellen besitzen typische Oberflächenantigene aktivierter T-Zellen wie Interleukin(IL-)-2R (= CD25), VLA-1, ICAM-1, CD45-RO und verstärkte Expression von MHC II (Übersicht z. B. bei Feldman *et al.* 1996). Dies wird als Hinweis für eine Beteiligung von T-Zellen an der Pathogenese der RA gedeutet. Vermutet wird, dass es zur Aktivierung autoreaktiver T-Zellen in den Gelenken der Patienten kommt. Über die Mechanismen dieser T-Zell-Aktivierung und die Peptide, die zur Aktivierung der T-Zellen führen, ist bisher noch sehr wenig bekannt.



### 1.3.1 Genetische Assoziation der RA mit HLA-Klasse II-Molekülen, „Shared-Epitope“-Hypothese und RA-Protektionshypothese

Die T-Zell-Hypothese wird durch die genetische Assoziation der Erkrankung mit der Expression bestimmter MHC-Klasse II-Moleküle unterstützt, da die einzig bekannte Funktion von MHC II-Molekülen die Präsentation antigener Peptide an CD4<sup>+</sup> T-Zellen ist. Mehr als 80% aller kaukasischen RA-Patienten exprimieren beispielsweise HLA-DR1- und HLA-DR4-Subtypen (Stastny 1978). Mehrere besonders stark mit RA-Prädisposition assoziierte HLA-DR-Moleküle besitzen eine auffällig ähnliche Aminosäuresequenz in der dritten hypervariablen Region (HV3-Region) der  $\beta$ 1-Kette. Diese Region umfasst die Aminosäuren von Position  $\beta$ 70-74 und bildet eine  $\alpha$ -helikale Struktur am Rande der Bindungsgrube, die an der Auswahl und Bindung des antigenen Peptides beteiligt ist (Brown *et al.* 1993; Davenport *et al.* 1997; Dessen *et al.* 1997; Hammer *et al.* 1995) (s. 1.4). Die meisten RA-prädisponierenden HLA-DR-Subtypen besitzen in der HV3-Region entweder die AS Sequenz <sup>70</sup>QKRAA<sup>74</sup>, <sup>70</sup>QRRAA<sup>74</sup> oder <sup>70</sup>RRRAA<sup>74</sup>, die sich in ihren chemischen Eigenschaften nur geringfügig unterscheiden (Albani und Roudier 1992). Die Vermutung, dass die Expression dieses „gemeinsamen Epitopes“ von entscheidender Bedeutung für die RA-Anfälligkeit einer Person ist, wird als „shared-epitope“(SE)-Hypothese bezeichnet (Gregersen *et al.* 1987).

Allerdings ist die SE-Hypothese nicht unumstritten: Sie erklärt beispielsweise nicht die wesentlich schwächere RA-Assoziation von DRB1\*0101 (<sup>70</sup>QRRAA<sup>74</sup>) im Vergleich zu DRB1\*0401 (<sup>70</sup>QKRAA<sup>74</sup>). Andere Allele wie DRB1\*1406 (<sup>70</sup>QRRAA<sup>74</sup>) sind nicht mit RA assoziiert, obwohl sie das SE besitzen und wieder andere haben einen additiven Effekt auf die RA-Prädisposition, obwohl ihnen das SE fehlt (z. B. DRB1\*0403 und DRB1\*0901).

Alternativ zur SE-Hypothese wurde die RA-Protektions (RAP)-Hypothese postuliert (Zanelli *et al.* 1995). Diese Hypothese stützt sich auf Daten aus dem Tiermodell der Collagen-Induzierten-Arthritis (CIA) und auf epidemiologische Studien vom Mensch (Gonzalez *et al.* 1996; Zanelli *et al.* 1996; Zanelli *et al.* 1997). Die RAP-Hypothese geht davon aus, dass nicht nur HLA-DR, sondern der gesamte HLA-DR- und HLA-DQ-Haplotyp zur RA-Prädisposition beiträgt. HLA-DQ-Moleküle vermitteln in diesem Modell die RA-Prädisposition, den HLA-DR-Molekülen kommt eine modulierende Funktion zu. Einige HLA-DR-Allele sind dabei mit einer starken Protektion vor RA

assoziiert. Auch hierbei wird von einer Schlüsselrolle der HV3-Region der  $\beta$ 1-Kette ausgegangen. Alle HLA-DR-Allele, die als protektiv gelten, kodieren die Sequenz <sup>70</sup>DERAA<sup>74</sup> in der HV3-Region (z. B. DRB1\*0402, DRB1\*0103 und DRB1\*1302).

Keines der beiden Modelle kann alle gefundenen Assoziationen erklären, aber sie schließen sich auch nicht gegenseitig aus. In beiden Hypothesen kommt der HV3-Region eine entscheidende Rolle zu, entweder in Form von Prädisposition oder in Form von Protektion. Tab. 1.1 zeigt einige HLA-DR-Allele, ihre RA-Assoziation und die Sequenz ihrer HV3-Region. Eine Übersicht über die HLA-DR-Assoziationen mit RA kann bei Zanelli *et al.* (2000a) gefunden werden.

HLA-DRB1	HV3-Region (AS $\beta$ 70-74)	SE	RA-Assoziation
*0401	QKRAA	+	ja, oft schwerer Verlauf
*0404	QRRAA	+	ja, additiver Effekt
*0405	QRRAA	+	ja
*0408	QRRAA	+	ja, additiver Effekt
*0101	QRRAA	+	schwach
*1001	RRRAA	+	schwach
*0403/06/07	QRRAE	-	schwach, additiver Effekt
*0901	RRRAE	-	schwach assoziiert
*0103	DERAA	-	nein, wahrscheinlich protektiv (seltenes Allel)
*1301/02	DERAA	-	nein, protektiv
*0402	DERAA	-	nein, protektiv

**Tab. 1.1**

Übersicht über die beschriebenen Assoziationen von SE-positiven und SE-negativen HLA-DR-Molekülen mit RA und Peptidsequenzen der HV3-Region (Zusammengesfasst aus Zanelli *et al.* 2000a).

## 1.4 MHC-Moleküle

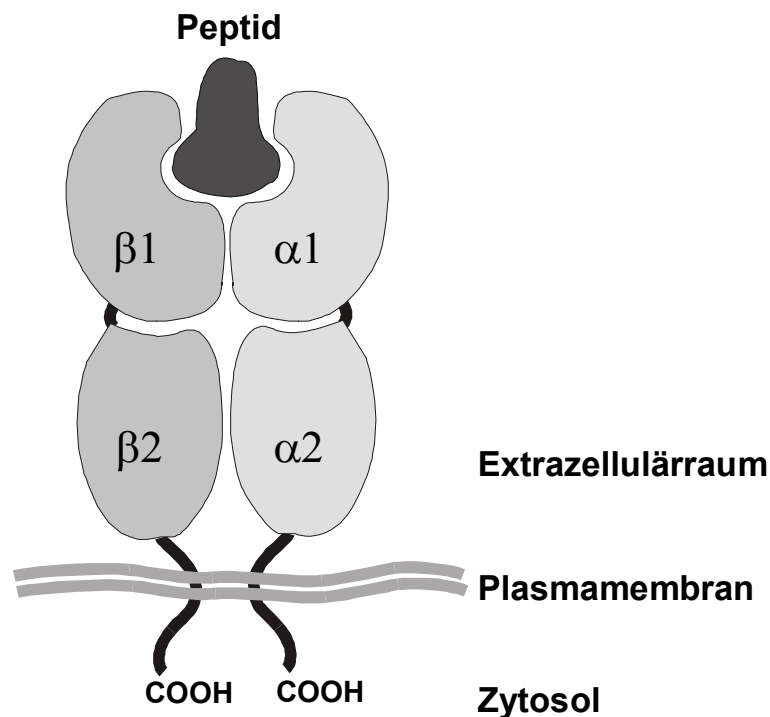
Die Gene des Haupthistokompatibilitätskomplexes (MHC) liegen beim Menschen auf Chromosom 6. Beim Menschen werden die MHC-Moleküle auch als HLA-Moleküle bezeichnet. Neben den Genen für die MHC I und MHC II-Moleküle befinden sich in diesem Komplex noch weitere Gene, die für Zytokine, Hitzeschockproteine, Komponenten des Komplementsystems, Proteasen und Peptidtransportproteine kodieren (Trowsdale *et al.* 1991). Viele der hier kodierten Moleküle sind an der Antigenprozessierung und –präsentation beteiligt. Aufgabe der HLA-Moleküle ist die Bindung antigenen Peptide in der Antigen-Bindungsspalte und deren Präsentation an T-Zellen.

Obwohl die dreidimensionale Struktur von HLA-Klasse I- und HLA Klasse II-Molekülen sehr ähnlich ist, bestehen doch wichtige Unterschiede in der Interaktion mit antigenen Peptiden:

Bei HLA-Klasse I- Molekülen sind die Enden des Peptides in der Spalte versteckt, die Bindung erfolgt hauptsächlich durch Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Peptidenden und Bindungstaschen an den Enden der Antigen-Bindungsspalte. Da die HLA-Klasse I-gebundenen Peptide hauptsächlich an ihren Enden gehalten werden, ist ihre Länge auf 8-10 AS begrenzt.

HLA-Klasse II-Molekülen besitzen eine Peptidbindungsstelle, die es antigenen Peptiden erlaubt, an beiden Enden aus der Spalte herauszuhängen. Das antigene Peptid wird dabei durch die Ausbildung von Wasserstoffbrücken an verschiedenen Stellen entlang der Bindungsspalte gebunden. Durch die offenen Enden der Bindungsspalte und die mittige Bindung der Peptide können HLA-Klasse II-Moleküle auch deutlich längere Peptide binden. Meist sind HLA-Klasse II-gebundene Peptide 12-24 AS lang.

HLA-Klasse II-Moleküle sind heterodimere Glykoproteine, die aus einer  $\alpha$ -Kette (33 - 35 kDa) und einer  $\beta$ -Kette (26 - 28 kDa) bestehen. Jede Kette besteht wiederum aus zwei Domänen ( $\alpha 1$  und  $\alpha 2$ ,  $\beta 1$  und  $\beta 2$ ). Die Domänen  $\alpha 2$  und  $\beta 2$  sind hochkonserviert, sie enthalten jeweils eine hydrophobe Transmembran-Domäne und ein kurzes zytoplasmatisches Segment (s. Abb. 1.1).



**Abb. 1.1**

Schematische Darstellung eines HLA Klasse II-Moleküls mit gebundenem antigenen Peptid. Die  $\alpha$ - und  $\beta$ -Ketten bestehen jeweils aus zwei extrazellulären Domänen, einer Transmembran-Domäne und einem kurzen zytosomatischen Segment. Die  $\alpha$ 1- und  $\beta$ 1-Domänen sind an der Ausbildung der Peptidbindungsspalte beteiligt.

Die  $\beta$ -Kette besitzt eine Glykosylierungsstelle in der  $\beta$ 1-Domäne und je eine Disulfidbrücke in jeder Domäne. Die  $\alpha$ -Kette besitzt in beiden Domänen eine Glykosylierungsstelle und nur in der  $\alpha$ 2-Domäne eine Disulfidbrücke.

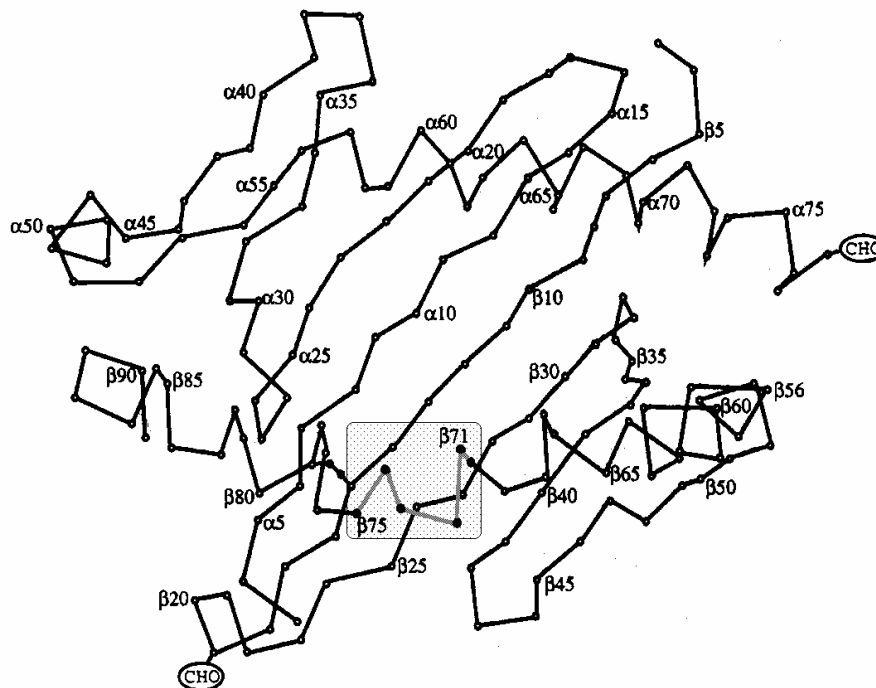
Es existieren fünf Isotypen von HLA-Klasse II-Molekülen: HLA-DM, HLA-DO, HLA-DP, HLA-DQ und HLA-DR. Alle Gene für diese Moleküle befinden sich in der HLA-Klasse II-Region. Die Gene, die für die  $\alpha$ -Kette kodieren, werden mit A bezeichnet (z. B. DQA, DRA), die für die  $\beta$ -Kette mit B (z. B. DQB, DRB).

### 1.4.1 HLA-DR-Moleküle

Die HLA-DR-Subregion ist komplexer als die Regionen für die anderen HLA-Klasse II-Moleküle. Bis heute kennt man für die  $\beta$ -Kette neun verschiedene Gene (DRB1 – DRB9), die z. T. Pseudogene sind (DRB2, 6, 7, 8, 9), z. T. aber auch funktionell (DRB3, 4, 5). Die Gene für DRB3, 4 und 5 sind nicht bei allen Menschen vorhanden, aber alle Menschen besitzen ein Gen für HLA-DRB1 am 5' Ende und ein Gen für HLA-DRA am 3' Ende der HLA-DR-Genregion. Dazwischen befindet sich eine unterschiedliche Anzahl weiterer HLA-DRB-Gene.

Die Gene für die HLA-Moleküle sind hochpolymorph, d. h. es existieren viele verschiedene Allele, die für diese Proteine kodieren. Bei den HLA-DR-Molekülen kommt dieser Polymorphismus ausschließlich durch die  $\beta$ -Kette zustande, da für die  $\alpha$ -Kette nur zwei nicht polymorphe Allele existieren. Für die Gene der  $\beta$ -Kette sind bis heute über 320 verschiedene Allele bekannt (Bodmer *et al.* 1999; Marsh 1998). Ein Vergleich der Sequenzen der verschiedenen Allele zeigt, dass sich die Nukleotidsubstitutionen hauptsächlich auf wenige Bereiche der Exons für die  $\beta$ 1-Domäne beschränken, die bereits erwähnten hypervariablen Regionen. Es werden hauptsächlich AS ausgetauscht, die direkt mit dem antigenen Peptid oder dem TZR interagieren. In röntgenkristallographischen Untersuchungen wurden fünf Subregionen (Bindungstaschen P1 bis P5) in der HLA-DR-Bindungsspalte entdeckt, die die Bindung der antigenen Peptide entscheidend beeinflussen (Stern *et al.* 1994). Die Struktur dieser Bindungstaschen wird entscheidend durch die AS-Reste dieser variablen Regionen geprägt. Durch diesen Polymorphismus im Bereich der antigenbindenden Strukturen können die einzelnen HLA-DR-Moleküle verschiedene Peptide mit unterschiedlichen Affinitäten binden. Es lassen sich allelspezifische Bindungsmotive bestimmen (Rammensee 1995) und die Bindungseigenschaften von Peptidsequenzen können mittels Algorithmen vorhergesagt werden (z. B. [www.syfpeithi.de](http://www.syfpeithi.de), (Rammensee *et al.* 1999)). Die hypervariablen Regionen sind in den Bereichen von AS-Position 9–14, 25–38 und 67–74 lokalisiert (Schenning *et al.* 1984). Die beiden erstgenannten befinden sich im Bereich der  $\beta$ -Faltblattstruktur des Bodens der antigenbindenden Spalte, während die HV3-Region Bestandteil der  $\alpha$ -helikalen Struktur am Rande der Spalte ist (s. Abb. 1.2). Röntgenkristallographische Untersuchungen ergaben eine besondere Bedeutung der AS-Positionen 70, 71, 74 und 29 der  $\beta$ 1-Kette für die Peptidbindungseigenschaften der HLA-DR-Moleküle

(Brown *et al.* 1993), diese tragen zur Bildung der P4-Bindungstasche bei. Ergebnisse aus Peptidbindungsversuchen legen nahe, dass vor allem die Ladung des AS-Restes  $\beta 71$  die Peptidbindungseigenschaften des HLA-DR-Moleküls stark beeinflusst (Davenport *et al.* 1997; Hammer *et al.* 1995), was durch die Kristallstruktur eines HLA-DRA1\*0101/DRB1\*0401-Moleküls mit einem Kollagenpeptid belegt werden konnte (Dessen *et al.* 1997).



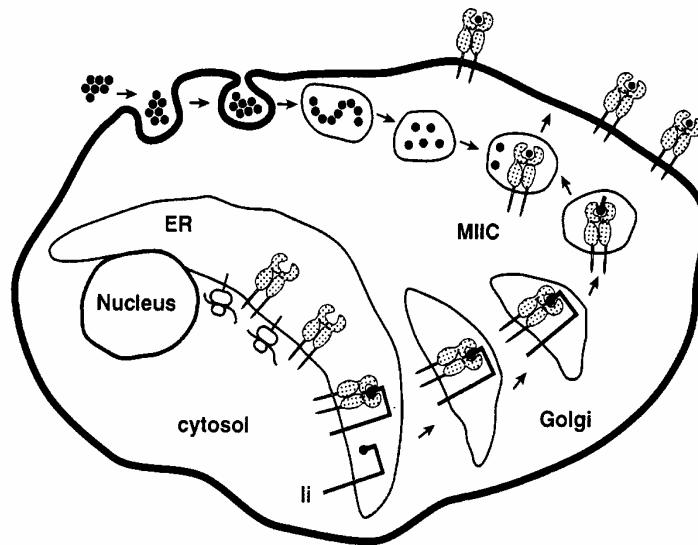
**Abb. 1.2**

Schematische Ansicht von oben auf die Bindungsspalte eines HLA-DR-Moleküls. Die  $\beta$ -Faltblattstruktur der  $\alpha 1$ - und  $\beta 1$ -Domäne bilden den Boden, die  $\alpha$ -helikalen Strukturen den Rand der antigenbindenden Spalte. Die AS-Positionen  $\beta 70$  –  $\beta 74$  der HV3-Region sind hervorgehoben (Abbildung modifiziert aus Marsh *et al.* 2000).

### 1.4.2 Prozessierung und Präsentation antigener Peptide durch HLA-Moleküle

Sowohl die HLA-Klasse I als auch die HLA-Klasse II-Moleküle werden von Ribosomen des rauen endoplasmatischen Retikulums (ER) synthetisiert und dann in dessen Lumen sezerniert. Die schweren Ketten der HLA-Klasse I-Moleküle assoziieren hier mit dem  $\beta$ 2-Mikroglobulin und binden ein antigenes Peptid. Die meisten HLA-Klasse I-präsentierten Peptide werden im Zytosol durch proteasomalen Abbau von Polypeptiden prozessiert und vom TAP-Molekül (transporter associated with antigen processing) ins Lumen des ER transportiert. Erst wenn die schwere Kette der Klasse I-Moleküle einen stabilen Komplex mit  $\beta$ 2-Mikroglobulin und einem Peptid gebildet hat, kann sie das Lumen des ER verlassen und über den Golgi-Apparat an die Zelloberfläche gelangen.

Die  $\alpha$ - und  $\beta$ -Ketten der HLA-Klasse II-Moleküle assoziieren ebenfalls im Lumen des ER, aber statt antigener Peptide binden sie an ein drittes Polypeptid, die invariante Kette (Ii). Dadurch werden die Klasse II-Moleküle stabilisiert und die Bindung antigener Peptide verhindert. Die invariante Kette bildet mit Hilfe von Calnexin und Calreticulin ein Trimer, wobei jedes der drei Moleküle eine HLA-Klasse II  $\alpha$ - und  $\beta$ -Kette gebunden hat. Nach der Assoziation werden diese Komplexe durch den trans-Golgi-Apparat in spezialisierte Kompartimente des endozytischen Prozessierungsweges transportiert, die MHC Klasse II-Beladungskompartimente (MIIC) (Neefjes 1999). Diese Kompartimente mit leicht erniedrigtem pH (ca. 5,5) entstehen durch Verschmelzung von endozytierten Vesikeln mit den Vesikeln des trans-Golgi-Apparates, die die HLA-Klasse II-Moleküle enthalten. In den MIIC wird durch Proteasen Ii bis auf ein Fragment, das sogenannte CLIP-Peptid abgebaut (class II associated invariant chain peptide), das in der Spalte der Klasse II-Moleküle gebunden bleibt. Anschließend wird CLIP gegen ein Peptid aus dem Abbau von endosomalem oder lysosomalem Material ausgetauscht. Dabei katalysiert HLA-DM die Freisetzung des CLIP-Peptides und stabilisiert die Klasse II-Moleküle während der Peptidbeladung (Denzin und Cresswell 1995). Die mit antigenen Peptiden beladenen (und auch einige noch mit CLIP beladene) HLA-Klasse II-Moleküle gelangen dann an die Zelloberfläche, wo sie die gebundenen Peptide an  $CD4^+$  T-Zellen präsentieren. Abb. 1.3 zeigt schematisch die Synthese von HLA-Klasse II-Molekülen in einer APZ, sowie die Beladung und Präsentation von antigenen Peptiden.



**Abb. 1.3**

Schematische Ansicht einer Zelle, die extrazelluläre Antigene aufnimmt und über HLA-Klasse II-Moleküle präsentiert.

Extrazelluläre Proteine werden in die Zelle aufgenommen, degradiert und gelangen dann in die MIIC, wo sie auf HLA Klasse II-Moleküle treffen. Diese werden an Ribosomen synthetisiert, gelangen ins Lumen des ER, von wo sie als Trimer mit Ii über den Golgi-Apparat in die MIIC transportiert werden. Die peptidbeladenen HLA-Klasse II-Moleküle gelangen an die Zelloberfläche. (Abbildung aus Marsh *et al.* 2000).

Normalerweise werden über HLA-Klasse I-Moleküle hauptsächlich Fremdanigene präsentiert, die von intrazellulären Infektionen z. B. durch Viren stammen. Da alle kernhaltigen Zellen von Viren befallen werden können, exprimieren fast alle Zelltypen konstitutiv HLA-Klasse I-Moleküle. Allerdings können durch Aufnahme extrazellulärer Peptide in die Zellen (z. B. HSP:Peptid-Komplexe, die über Rezeptoren internalisiert werden, s. 1.7.1) auch extrazelluläre Antigene in den MHC Klasse I Präsentationsweg gelangen (Singh-Jasuja *et al.* 2000b), dieser Vorgang wird als „cross-presentation“ (s. 1.7.1) bezeichnet. Es kommt zu einer zytotoxischen CD8<sup>+</sup> T-Zellantwort (ZTL), bei der die betroffenen Zellen zerstört werden.

Die Fremdanigene, die von MHC-Klasse II-Molekülen präsentiert werden, stammen meist von Pathogenen aus dem Extrazellulärraum, z. B. Bakterien. Die präsentierten



Antigene stimulieren dann eine  $CD4^+$  T-Zellantwort, die vor allem dazu dient, andere Immunzellen wie B-Zellen und Makrophagen zu aktivieren. Da diese Aufgabe nur von spezialisierten Zellen übernommen wird, werden HLA-Klasse II-Moleküle hauptsächlich von den sogenannten professionellen APZs (s. 1.1) exprimiert. Die Expression der HLA-Klasse II-Moleküle wird sehr komplex reguliert (Benoist und Mathis 1990), bei den meisten Zelltypen hat Interferon- $\gamma$  einen Einfluss, nach Aktivierung wird die Expression verstärkt (HLA-Expression dient als Aktivierungsmarker).

### 1.4.3 Antigenerkennung durch T-Zellen

Die meisten T-Zellen tragen einen TZR, der sich aus  $\alpha$ - und  $\beta$ -Kette zusammensetzt und immunglobulinähnliche Strukturen aufweist. Im Zuge der T-Zelldifferenzierung kann auf somatischer Ebene eine Diversität von bis zu  $10^{15}$  verschiedenen TZRs erreicht werden (Davis und Bjorkman 1988), wodurch eine spezifische Reaktion auf nahezu jedes Antigen möglich wird. Die Erkennung eines Antigens durch T-Zellen erfolgt ausschließlich im Zusammenhang mit MHC-Molekülen.  $CD8^+$  T-Zellen erkennen MHC I:Peptidkomplexe,  $CD4^+$  T-Zellen MHC II:Peptidkomplexe. CD4 und CD8 dienen dabei als Co-Rezeptoren während der Antigenerkennung und binden an konservierte Stellen der MHC-Moleküle abseits der antigen-bindenden Spalte. Um aktiviert werden zu können, müssen T-Zellen ein passendes Antigen im Kontext mit einem MHC-Molekül erkennen und zusätzlich kostimulatorische Signale erhalten, die nur von professionellen APZ (vor allem reifen dendritischen Zellen) gegeben werden können, z. B. über B7.1 (CD80) oder B7.2 (CD86). Nach Aktivierung erfolgt bei  $CD4^+$  T-Zellen die Differenzierung in Th1- oder Th2-Zellen, die sich in ihrer Zytokinproduktion und damit in ihrer Effektor-Funktion unterscheiden. Die Entscheidung, ob Th1- oder Th2-Zellen entstehen hängt von verschiedenen Faktoren während der Aktivierung und klonalen Expansion der  $CD4^+$  T-Zellen ab und ist bis heute nur unvollständig geklärt.

## 1.5 Hitzeschockproteine

*Quae medicamenta non sanant, ferrum sanat; quae ferrum non sanat, ignis sanat; quae vero ignis non sanat, insanabilia reputari oportet.*

Hippokrates

(Was Arzneien nicht heilen, heilt das Messer; was das Messer nicht heilt, heilt das Brennen; was aber Brennen nicht heilt, das muss als unheilbar betrachtet werden.)

Bereits 1962 wurden Hitzeschockproteine (HSPs) zum ersten Mal beschrieben, als festgestellt wurde, dass in den Riesenchromosomen der Speicheldrüsen von *Drosophila hydei* bei erhöhter Temperatur bestimmte Genloki verstärkte Aktivität zeigen (Ritossa 1962). Es wurde gefunden, dass diese Genloki für Hitzeschockproteine kodieren, die universell in allen Organismen vom Prokaryont über die Pflanze bis zum Säugetier exprimiert werden. Dabei gibt es keine andere Gruppe von Proteinen, die einen ähnlich hohen Grad an evolutionärer Konservierung aufweist. Die Expression von HSPs wird nicht nur durch Stress in Form von Hitze induziert, sondern auch durch andere zelluläre Stress-Faktoren wie Glukosemangel, Ischämie oder Stoffwechselfgifte (z. B. Ethanol). Die Regulation der Expression erfolgt durch sog. Hitzeschocktranskriptionsfaktoren (HSFs), die in den Zellen vorhanden sind und bei Stress aktiviert werden. Neben den induzierbaren HSPs, die nur bei zellulärem Stress exprimiert werden, gibt es auch konstitutive HSPs, die auch bei Normalbedingungen exprimiert werden (zusammengefasst in Lindquist 1986). Außer im Zytosol kommen HSPs auch in anderen Organellen wie ER, Mitochondrien, Chloroplasten und Nuklei vor. Man unterteilt HSPs nach ihrem Molekulargewicht in verschiedene Klassen. Die kleinen HSPs mit einer Größe von 15 – 30 kDa kommen meist im Nukleus vor, daneben gibt es HSPs unter anderem mit einer Größe von 40, 60, 70, 90 und 110 kDa.

Im Laufe der Jahre wurden mannigfaltige Funktionen für die HSPs beschrieben: Ihre Hauptaufgabe ist der Schutz der Zelle in Stress-Situationen. HSPs falten und entfalten andere Proteine und verhindern unspezifische Proteinaggregationen, sie agieren also als Wächter und werden daher auch als „Chaperone“ bezeichnet. Dabei können HSPs nicht-native Proteinstrukturen (z. B. nur partiell gefaltete Proteine oder in Folge von Stress „entartete“) erkennen und dann entweder an deren Rückfaltung

beteiligt sein oder diese der Proteolyse zuführen (zusammengefasst in Ang *et al.* 1991; Gething und Sambrook 1992; McClellan und Frydman 2001). Außerdem können HSPs auch an „normale“ und neu gebildete Proteine binden und z. B. an deren Transport über Membrangrenzen in andere Kompartimente (z. B. ER, Mitochondrien) beteiligt sein.

Neben dieser Rolle bei Faltung, Transport und Abbau von Proteinen spielen HSPs über verschiedene Mechanismen auch eine wichtige Rolle in der angeborenen und adaptiven Immunität (z. B. Schild *et al.* 1999; Wells und Malkovsky 2000). Zum einen können HSP-Moleküle verschiedene Zellen des Immunsystems wie natürliche Killer-Zellen und professionelle APZs direkt aktivieren: Gp96 aktiviert dendritische Zellen und induziert deren Reifung, kostimulatorische Moleküle werden hochreguliert und pro-inflammatorische Zytokine sezerniert (Singh-Jasuja *et al.* 2000a). Ähnliches wurde für die Aktivierung von Monozyten durch HSP70 gezeigt (Asea *et al.* 2000). Daneben können HSP-komplexierte Peptide von APZs rezeptor-vermittelt aufgenommen werden und wirken dann äußerst immunogen (s. 1.7). Schließlich wird der Immunantwort gegen HSPs selbst eine Rolle, z. B. in der Pathogenese von Autoimmunerkrankungen, zugeschrieben

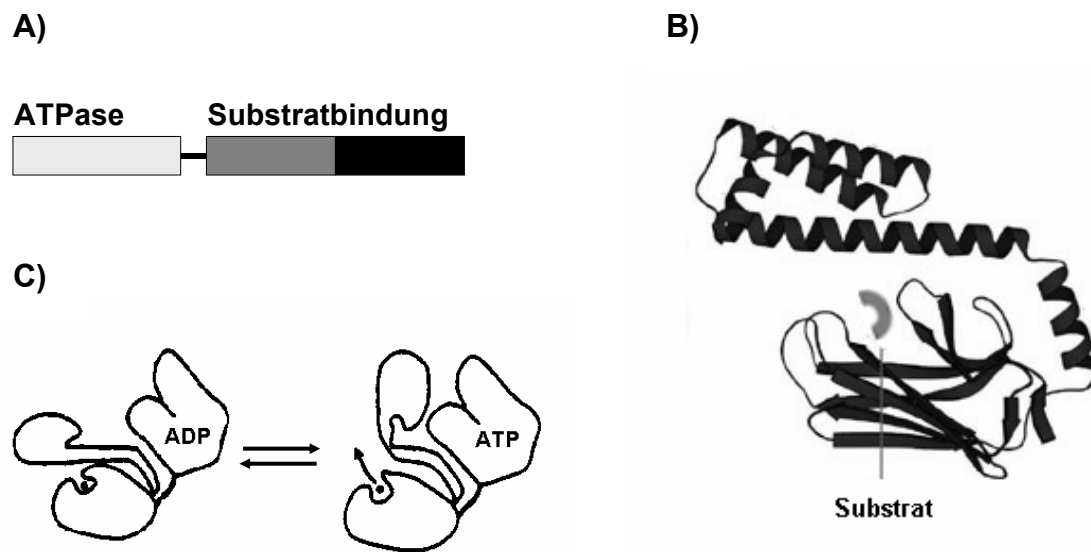
Eine Verbindung von HSP-Molekülen mit Autoimmunerkrankungen wurde zuerst von van Eden *et al.* (1985) vermutet, als gefunden wurde, dass ein reaktiver T-Zellklon auf mykobakterielles Hsp60 in Ratten Arthritis übertragen konnte. Als ein möglicher Mechanismus wurde eine Kreuzreaktivität zwischen bakteriellem und Ratten-Hsp60 („molekulare Mimikry“) diskutiert (Cohen und Young 1991). Allerdings wurde gefunden, dass der T-Zellklon ein Epitop erkannte, das zwischen bakteriellem und Ratten-Hsp60 nicht konserviert war (van Eden *et al.* 1988). Immunisierungen mit HSP-Molekülen, Peptidfragmenten aus HSP-Molekülen und DNA, die HSPs kodiert konnten im Tiermodell vor Arthritis schützen (Kingston *et al.* 1996; Ragno *et al.* 1997; Wendling *et al.* 2000). In RA-Patienten wurden T-Zellen gefunden, die auf humanes aber nicht mykobakterielles Hsp60 reaktiv waren (van-Roon *et al.* 1997), bei Kindern mit JIA geht eine Reaktivität auf humanes Hsp60 mit einem mildereren klinischen Verlauf einher (de Graeff-Meeder *et al.* 1995). Insgesamt sind die Daten zu Autoimmunerkrankungen und dem Zusammenhang mit einer Reaktivität von T-Zellen auf Epitope aus HSP-Molekülen aber nicht eindeutig. Die für diese Arbeit relevanten

HSPs gehören zur 70 kDa Klasse, daher wird im Folgenden hauptsächlich auf diese Moleküle eingegangen.

## 1.6 HSP70-Moleküle

Von allen HSPs besitzen HSP70-Moleküle den höchsten Grad an evolutionärer Konservierung mit mindestens 50 % Homologie zwischen den verschiedenen Spezies. Während das HSP70-System von *E.coli* nur aus dem Protein DnaK besteht, besitzt die HSP70-Familie beim Menschen 11 und bei *Saccharomyces cerevisiae* sogar 14 bekannte Mitglieder (James *et al.* 1997). Beim Menschen befinden sich drei Gene für HSP70-Moleküle im HLA-Komplex auf Chromosom 6 (s. 1.4), das Gen für das konstitutiv exprimierte Hsc70 befindet sich auf Chromosom 1 (Tavaria *et al.* 1995). Alle HSP70-Moleküle bestehen aus einer N-terminalen Domäne von etwa 44 kDa mit schwacher ATPase-Aktivität und der C-terminalen Substratbindungsdomäne, die weiter unterteilt werden kann in eine Subdomäne mit  $\beta$ -Faltblatt-Struktur, die das Substrat bindet und eine  $\alpha$ -helikale Subdomäne, die eine Art „Deckel“ über der Substratbindungsstelle bildet, der ATP/ADP-abhängig seine Konformation ändert (s. Abb. 1.4).

Einen besonders hohen Grad an evolutionärer Konservierung weist die ATPase-Domäne auf, ihre räumliche Struktur ist trotz Sequenzunterschieden zwischen den Spezies immer sehr ähnlich. Kristallstrukturen sind für die ATPase-Domänen von DnaK aus *E.coli* (Harrison *et al.* 1997) und für bovines Hsc70 (Flaherty *et al.* 1990), sowie für die Substratbindungsdomäne von DnaK (Zhu *et al.* 1996) bekannt. Abb. 1.4 B zeigt die Kristallstruktur der Substratbindungsdomäne von DnaK als Ribbon-Diagramm. HSP70-Moleküle liegen in der Regel als Monomere vor und sind auch in dieser Form aktiv, Di- und Trimere können konzentrationsabhängig gebildet werden (Palleros *et al.* 1993).

**Abb. 1.4**

**A)** Lineare Ansicht eines HSP70-Moleküls bestehend aus ATPase-Domäne (ca. 185 AS), einem kurzen Linker-Segment und der Substratbindungsdomäne mit  $\beta$ -Faltblatt (ca. 150 AS, grau) und  $\alpha$ -helikaler (ca. 100 AS, schwarz) Subdomäne.

**B)** Kristallstruktur der Substratbindungsdomäne von DnaK mit  $\beta$ -Faltblatt und  $\alpha$ -helikaler Subdomäne (Ribbon-Diagramm). DnaK ist im Komplex mit einem Substrat dargestellt.

**C)** Schematische Ansicht eines kompletten DnaK-Moleküls: der Austausch von ADP gegen ATP führt zu einer Konformationsänderung des Moleküls, gebundenes Substrat kann abdissoziieren.

Abb. B) und C) modifiziert aus Zhu *et al.* (1996).

Die Interaktion von HSP70 mit Substrat, ATP und Ko-Faktoren ist bei allen HSP70-Molekülen ähnlich, am besten untersucht ist sie für DnaK (Überblick in Hartl 1996; Rudiger *et al.* 1997a). Die Substratbindungsdomäne von HSP70-Molekülen interagiert kurzzeitig mit linearen Peptidsegmenten z. B. von ungefalteten Proteinen. Dabei werden meist hydrophobe AS-Sequenzen bevorzugt, die normalerweise im Inneren von nativen Proteinen verborgen sind. Das Bindungsmotiv von DnaK besteht beispielsweise aus einer Kernsequenz von vier bis fünf hydrophoben AS, die an beiden Enden von Sequenzen mit einem hohem Anteil an basischen AS flankiert werden; Sequenzen mit negativ geladenen AS-Resten sind von der Bindung ausgeschlossen (Rudiger *et al.* 1997a; Rudiger *et al.* 1997b). Im Durchschnitt wird in

Proteinen alle 36 AS eine Sequenz gefunden, die mit DnaK interagieren kann (Rudiger *et al.* 1997b). Ähnliche Bindungsmotive wurden für zytosolisches Hsp70 und Hsc70 beschrieben (Gething *et al.* 1995). Hsc70 zeigte eine besondere Affinität zu Sequenzen mit positiv geladenen AS-Resten wie KK, KR und RR (Gragerov und Gottesman 1994; Takenaka *et al.* 1995).

Die Affinität von HSP70 zum Substrat wird von ATP und weiteren Ko-Faktoren, den sogenannten Ko-Chaperonen reguliert. Ko-Chaperone von DnaK sind DnaJ, ein 40 kDa HSP und GrpE (Liberek *et al.* 1991). Bei Eukaryonten gibt es neben Hip (HSP70-interacting protein), Hop (HSP70-HSP90-organizing protein) und CHIP (carboxy terminus of HSP70 interacting protein) vermutlich noch weitere Ko-Faktoren (Übersicht bei McClellan und Frydman 2001). Die Bindung eines Substrates an DnaK führt zu einer Hydrolyse von ATP zu ADP, dabei schließt sich der  $\alpha$ -helikale Deckel der Substratbindungsdomäne durch eine Konformationsänderung (s. Abb. 1.4 C, linker Teil). Der entstandene DnaK/Peptid/ADP-Komplex ist dann relativ stabil. Ein Austausch von ADP durch ATP bewirkt eine Öffnung des  $\alpha$ -helikalen Deckels der Substratbindungsdomäne, gebundenes Substrat kann abgegeben und neues gebunden werden (s. Abb. 1.4 C, rechter Teil). Der Austausch von ADP gegen ATP wird von GrpE katalysiert. Die genaue Bedeutung von DnaJ in diesem Zyklus ist noch nicht geklärt. Bekannt ist, dass DnaJ mindestens an zwei Stellen mit DnaK interagiert: Zum einen in der Spalte zwischen den beiden Domänen und zum anderen in der Nähe der Substratbindungsstelle. DnaJ verstärkt die ATPase-Aktivität von DnaK, allerdings nur wenn DnaK ein Substrat gebunden hat. Es wird vermutet, dass DnaJ zuerst mit dem Substrat interagiert („Scanner“-Funktion) und dieses dann zu DnaK bringt („Carrier“-Funktion) (Rudiger *et al.* 2001). HSP70-Moleküle können aber auch in Abwesenheit von ADP, ATP und Ko-Faktoren Peptide binden und abgeben, selbst modifizierte HSP70-Moleküle, denen die ATPase-Domäne fehlt, können mit Peptiden interagieren (Zhu *et al.* 1996).

## 1.7 HSPs und Antigenpräsentation

### 1.7.1 HSPs und MHC I

Das extrem immunogene Potential von HSP:Peptid-Komplexen wurde zuerst von Srivastava *et al.* beschrieben (Zusammengefasst in Srivastava *et al.* 1998). Aus Tumorzellen aufgereinigtes gp96 (HSP90 aus dem ER) konnte Mäuse gegen diesen Tumor immunisieren, aus Leberzellen aufgereinigtes gp96 und gp96, dem das Peptid mittels ATP entfernt wurde, hatten keinen Effekt (Udono und Srivastava 1993). Dieser Effekt wurde auch für weitere HSPs wie das konstitutiv exprimierte Hsc70 und das stress-induzierbare Hsp70 nachgewiesen. Peptide aus HSP:Peptid-Komplexen wurden über MHC I an CD8<sup>+</sup> T-Zellen präsentiert und es wurde eine zytotoxische T-Zellantwort ausgelöst. Die HSP:Peptid-Komplexe wurden zuvor von professionellen APZs (aber beispielsweise nicht von T-Zellen) rezeptorvermittelt internalisiert und auf MHC I-Moleküle transferiert, unspezifische Endozytose führte zu keiner T-Zellantwort (Arnold *et al.* 1999; Castellino *et al.* 2000; Singh-Jasuja *et al.* 2000b; Suto und Srivastava 1995). Diese Re-Präsentation exogener antigener Peptide wird als „cross-presentation“ bezeichnet und beschreibt einen Mechanismus, durch den auch exogene Antigene in den MHC Klasse I-Stoffwechselweg gelangen können.

Normalerweise kommt kaum freies HSP im Extrazellulärraum vor, allerdings können exogene HSP:Peptid-Komplexe in Gebieten mit großem Zelluntergang durch Nekrose entstehen, beispielsweise bei Verletzungen, Entzündungen oder Tumoren (Basu *et al.* 2000). Als erster Rezeptor für HSP70-Moleküle wurde CD91 (auch bekannt als  $\alpha_2$ -Makrogobulin bzw. low-density lipoprotein receptor related protein) beschrieben (Basu *et al.* 2001; Binder *et al.* 2000).

### 1.7.2 HSPs und MHC II

Auch für die MHC II-vermittelte Antigenpräsentation wird eine Beteiligung von HSP70-Molekülen an der Antigenprozessierung und –präsentation diskutiert (De Nagel und Pierce 1992; Srivastava 2002a). Dies wird durch die Beobachtung unterstützt, dass eine Überexpression von Hsc70 in einer Makrophagen-Zelllinie zu einer verstärkten Präsentation von exogenem Antigen über MHC II führt (Panjwani *et al.* 1999). Außerdem konnte gezeigt werden, dass das *E.coli* 70 kDa HSP DnaK die effiziente Prozessierung und Präsentation von Antigenen über MHC II verstärkt. Eine Zugabe von DnaK zu antigenem Protein und APZs führte zu einer gesteigerten Proliferation von CD4<sup>+</sup> T-Zellen (Roth *et al.* 2002).

## 1.8 Ausgangspunkt und Ziel der Arbeit:

Neben den Funktionen bei Faltung, Transport und Abbau von Proteinen sowie in der angeborenen und erworbenen Immunität wurde von Auger *et al.* (1996) gezeigt, dass HSP70-Moleküle mit Peptidfragmenten aus RA-prädisponierenden HLA-DR-Molekülen interagieren können: Es wurde beschrieben, dass DnaK (HSP70 aus *E.coli* 70) an HLA-DR-Peptidfragmente findet, die die SE-Sequenzen <sup>70</sup>QKRAA<sup>74</sup> oder <sup>70</sup>QRRAA<sup>74</sup> enthalten, nicht aber an Peptidfragmente aus anderen HLA-DR-Molekülen. Die AS-Sequenz <sup>70</sup>QKRAA<sup>74</sup> taucht in Peptidbibliotheken überdurchschnittlich häufig auf, was als Indiz für eine biologische Funktion dieser Sequenz gedeutet wird. Unter anderem wird die Sequenz auch in DnaJ, dem 40 kDa Ko-Chaperone von DnaK, gefunden. Die Interaktion von DnaK mit DnaJ konnte durch SE-Peptide inhibiert werden (Auger und Roudier 1997). Es wurde vermutet, dass diese auffällige Interaktion von HSP70-Molekülen nur mit SE-positiven HLA-DR-Molekülen eine wichtige Rolle in der Pathogenese und HLA-Assoziation der RA spielen könnte (Ollier 1996).

Die von Auger *et al.* (1996) beschriebenen Ergebnisse mit DnaK und HLA-DR-Peptidfragmenten wurden in unserem Labor wiederholt. Dazu wurde von Jan Maier die sehr sensitive Methode der Bindungsmessung mit Fractogel-gebundenen Peptiden und anschließender Silberfärbung benutzt. Mit dieser Methode wurde ein von der Literatur abweichendes Peptidbindungsmuster an DnaK gefunden: lediglich



Peptidsequenzen aus RA-protectiven HLA-DR-Molekülen zeigten keine Affinität zu DnaK.

Ausgangspunkt dieser Arbeit war, das mit DnaK und Fractogel-gebundenen Peptiden gefundene und von Auger *et al.* abweichende Bindungsmuster in weiteren Experimenten zu bestätigen. Daran anschließend sollte in weiteren Bindungsversuchen untersucht werden, ob neben DnaK auch andere HSP70-Moleküle (stress-induzierbares humanes Hsp70 und konstitutiv exprimiertes Hsc70) mit Peptidfragmenten aus HLA-DR-Molekülen interagieren können und ob hierbei ein mit DnaK vergleichbares Bindungsmuster existiert.

Bei den Versuchen mit Fractogel-gebundenen Peptiden handelt es sich um ein qualitatives Verfahren. Daher sollte ein weiteres Verfahren etabliert werden, mit dem auch quantitative Messungen der Affinitäten von HLA-DR-Peptidfragmenten an HSP70-Moleküle ermöglicht werden. Zusätzlich können dadurch die mit Fractogel-gebundenen Peptiden erhaltenen Ergebnisse in einem zweiten Verfahren verifiziert werden.

Ein weiterer wichtiger Punkt ist die Frage, ob die zwischen HLA-DR und HSP70 gefundene Interaktion nur für die HLA-DR-Peptidfragmente besteht, oder ob auch die korrespondierenden intakten HLA-DR-Moleküle mit HSP70 interagieren können. Besonders interessant ist dabei die Frage, ob auch für ganze HLA-DR-Moleküle HSP70-Bindungsunterschiede zwischen RA-protectiven und RA-prädisponierenden HLA-DR-Molekülen bestehen. Auger *et al.* (1996) haben zwar in Präzipitationsexperimenten eine gemeinsame Präzipitation von SE-positiven HLA-DR-Molekülen mit konstitutiv exprimiertem Hsc70 in Zelllinien gefunden, allerdings sind diese Ergebnisse nicht unumstritten: Rich *et al.* (1998) fanden in Zelllysaten eine unspezifische Ko-Präzipitation von Hsc70 mit verschiedenen HLA-Klasse I- und Klasse II-Molekülen. Daher sollten in dieser Arbeit weitere Experimente zur Interaktion von HSP70 mit intakten HLA-DR-Molekülen durchgeführt werden. Es sollte ein Verfahren gewählt werden, mit dem eine direkte Interaktion zwischen HSP70 und ganzen HLA-DR-Molekülen möglichst quantitativ gemessen werden kann. Dazu war geplant, aus im Labor vorhandenen homozygoten Zelllinien lösliche HLA-DR-Moleküle zu isolieren. Die Aufreinigung von HLA-Molekülen aus Zelllysaten ist im Labor von H. Kalbacher etabliert und kann dort durchgeführt werden

Eine direkte Interaktion von HSP70 mit bestimmten HLA-DR-Peptidfragmenten und / oder ganzen HLA-DR-Molekülen könnte die Auswahl und Präsentation antigener Peptide über MHC II-Moleküle und damit die CD4<sup>+</sup> T-Zellantwort beeinflussen. In dieser Hypothese könnte eine differentielle Interaktion von HSP70 mit verschiedenen HLA-DR-Molekülen ein weiteres Teil im Puzzle zum Verständnis der Entstehung von Autoimmunerkrankungen und deren HLA-Assoziation darstellen. HSP70-Moleküle könnten dabei die (auto-) antigenen Peptide auswählen und auf MHC II-Moleküle übertragen. Für MHC I-Moleküle ist eine verstärkte T-Zellaktivierung durch extrazellulär zugeführte HSP:Peptid-Komplexe gut untersucht, für MHC II-Moleküle ist darüber bisher noch wenig bekannt (s. 1.7). Ein möglicher Einfluss von HSP70-gebundenen Peptiden auf die MHC II-vermittelte Antigenpräsentation und die CD4<sup>+</sup> T-Zellaktivierung sollte daher in dieser Arbeit untersucht werden. Dazu waren Untersuchungen zur CD4<sup>+</sup> T-Zellproliferation in Abhängigkeit von HSP70-Molekülen in einem humanen, antigenspezifischen System mit Donoren verschiedenen HLA-DR-Haplotyps geplant.

## 2 MATERIALIEN

### 2.1 Geräte

Bestrahlungsgerät Gammacell 1000 Elite	MDS Nordion
Durchflusszytometer FACS-Calibur	Becton Dickinson
Electrophoresis unit Mini-Protean II	BIO-RAD
Lyophilisator ALPHA	Christ
Magnet-Rührkammer zur Proteinaufkonzentrierung	Amicon
Microplate Reader Tecan SpectraFluor	Tecan
Multilabel Counter Viktor 1420	Wallac Oy (PerkinElmer)
Multipler Peptidsynthesizer SyRo	MultiSyntech
Schüttler Heidolph Polymax 1040	Heidolph
Überkopfmischer Heidolph Reax 2	Heidolph
Ultrazentrifuge Beckmann L8-70M + Rotor TI 60	Beckmann
Umkehrmikroskop LM Olympus IX50	Olympus, Hamburg
Vario MACS Separator	Miltenyi Biotec
X-Cell SureLock II Mini-Cell	Invitrogen
Zellzählgerät COBAS MICROS	Roche Diagnostics

### 2.2 Chemikalien, Reagenzien und Kits

ADP	Sigma
ATP	Sigma
Biocoll separating solution	Biochrom
Biotin-N-hydroxysuccinimidester	Sigma
CFSE	Molecular Probes
Coomassie Brilliant-Blue R250	Sigma
DELFLIA	PerkinElmer
Wash Concentrate, Assay-Buffer, Europium-labelled Streptavidin, Enhancement Solution	
DMSO	Merck
DTT	Merck

---

EDTA	Roth
Essigsäure p.a.	Merck
FACSFlow	Becton Dickinson
FCS	Biochrom
Fmoc-AS	Alexis, Novabiochem
Glutaraldehyd	Sigma
Glycin	Roth
HEPES (1M)	Biochrom
L-Glutamin (200 mM)	Biochrom
LPS <i>E.coli</i> Stamm 026:B6	Sigma
MACS CD4 <sup>+</sup> T Cell Isolation Kit II, human	Miltenyi Biotec
MOPS-Puffer	Invitrogen
NaN <sub>3</sub>	Roth
Octyl-β-D-glucopyranosid	Sigma
PBS ohne Ca <sup>2+</sup> , Mg <sup>2+</sup>	Biochrom
Pefabloc SC	Roche Molecular Biochemicals
Penicillin/Streptomycin (10000 IE / 10000 µg/ml)	Biochrom
PHA	Sigma
Propidiumiodid	BD Biosciences
Protease-Inhibitor-Cocktail Tablets Complete Min	Roche Molecular Biochemicals
Rainbow-Marker	Amersham Biosciences
Roti-Nanoquant	Roth
RPMI 1640 mit 2 g/l NaHCO <sub>3</sub>	Biochrom
SEB	Sigma
Silver Stain Plus Kit	BIO-RAD
Streptavidin-APC	BD Biosciences
Tris/HCl	Roth
Triton X-100	Sigma
Trypanblau	Roth
Tween-20	Roth
Zwittergent 3-12	Calbiochem

### 2.3 Proteine und Antikörper

BSA, Fraktion V, mind. 98 %, Protease-frei		Sigma
<i>Fluoreszenzmarkierte monoklonale Antikörper</i>		BD Biosciences
	Fluoreszenz	Klon
anti-CD3	FITC	SK7
anti-CD4	PE, APC	RPA-T4
anti-CD8	PerCP	SK1
anti-CD14	APC	MΦP9
anti-CD19	FITC	HIB19
anti-CD25	PE	M-A251
anti-HLA-DR	PE	L-243 (=G46-6)
<i>Hitzeschockproteine (rekombinant)</i>		StressGen
bovines Hsc70		
DnaK		
Grp78 (BiP)		
humanes Hsp70		
humanes Hsp70 low endotoxin		
Hsc70-ATPf		
Humanalbumin-Lösung 20 % (HSA)		Deutsches Rotes Kreuz
<i>monoklonale anti-HSP Ak (unmarkiert)</i>		StressGen
anti-DnaK (Klon 8E2/2)		
anti-Hsp70 (Klon C92F3A-5)		
anti-Hsc70 (Klon 1B5)		
monoklonaler anti-HLA-DR-Ak (L-243, unmarkiert)		BD Biosciences
Ovalbumin, grade V, mind. 98 %		Sigma
$\gamma_1/\gamma_{2a}$ -Simultest Kontrolle (enthält mouse IgG <sub>1</sub> -FITC und IgG <sub>2a</sub> -PE monoklonale Kontroll-Ak)		BD Biosciences

## 2.4 Zelllinien

Bei den verwendeten B-Lymphoblastoid-Zelllinien (B-LCLs) handelt es sich um durch EBV-Transfektion immortalisierte B-Zelllinien humanen Ursprungs. Es wurden B-LCLs ausgewählt, die jeweils ein bestimmtes HLA-DRB1-Allel homozygot exprimieren. Die weiteren Angaben zu HLA-Klassifizierung und Ursprung finden sich bei der ECACC (European Collection of Cell Culture; [www.ecacc.org.uk](http://www.ecacc.org.uk)). Die Zelllinien wurden vom 12th International Histocompatibility Workshop (IHW) Cell Panel bezogen, die Zelllinie AL10 wurde von Dr. S. Stevanovic zur Verfügung gestellt. Die Überprüfung der HLA-DR-Haplotypen erfolgte durch Frau Prof. Dr. D. Wernet. Folgende Zelllinien wurden kultiviert (in Klammern IHW-Bezeichnung und exprimiertes HLA-DRB1-Allel):

<b>Bezeichnung</b>	<b>exprimiertes HLA-DRB1</b>	<b>Sequenz HV3-Region</b>
AL10	HLA-DRB1*0402	<sup>70</sup> DERAA <sup>74</sup>
BM 9 (IHW 9068)	HLA-DRB1*0801	<sup>70</sup> DRRAL <sup>74</sup>
HOR (IHW 9053)	HLA-DRB1*1302	<sup>70</sup> DERAA <sup>74</sup>
JO 528239 (IHW 9041)	HLA-DRB1*1104	<sup>70</sup> DRRAA <sup>74</sup>
PITOUT (IHW 9051)	HLA-DRB1*0701	<sup>70</sup> DRRGQ <sup>74</sup>
SAVC (IHW 9034)	HLA-DRB1*0401	<sup>70</sup> QKRAA <sup>74</sup>

## 2.5 Verbrauchsmaterialien

96-well Costar Flachboden-Zellkulturplatten	Corning
96-well FluoroNunc Maxisorp Platten	Nunc
CH-Sepharose 4B	Amersham Biosciences
Fmoc-Harze	Rapp Polymere GmbH
Fractogel EMD	Merck
MACS LS-Säulen	Miltenyi Biotec
Membran (20 kDa) für Magnetrührkammer	Sartorius
NuPAGE 10 % Bis-Tris Fertiggel	Invitrogen
PD-Sephadex G-25 M Säule	Amersham Biosciences

## 2.6 Puffer und Lösungen

### *Fractogel-Versuche*

Fractogel-Puffer 1	0,1 M NaHCO <sub>3</sub> , 0,5 M NaCl, pH8
Fractogel-Puffer 2	25 mM Tris/HCl, 5 mM NaCl, 0,5 % Triton X-100 (V/V), pH 7,5
Fractogel-Puffer 3	0,5 M CH <sub>3</sub> COO <sup>-</sup> Na <sup>+</sup> , pH4
Fractogel-Elutionspuffer	0,2 M Glycin, pH2

### *HLA-DR-Isolierung*

Lysepuffer	10 mM Tris/HCl, 140 mM NaCl, pH 8
Waschpuffer	50 mM Na-Phosphat, 150 mM NaCl, 0,1 % (m/V) Zwittergent 3-12, pH 8
Elutionspuffer pH 8	100 mM Na-Phosphat, 0,1 % (m/V) Zwittergent 3-12, pH 8
Elutionspuffer pH 11,2	100 mM Na-Phosphat, 0,1 % (m/V) Zwittergent 3-12, pH 11,2

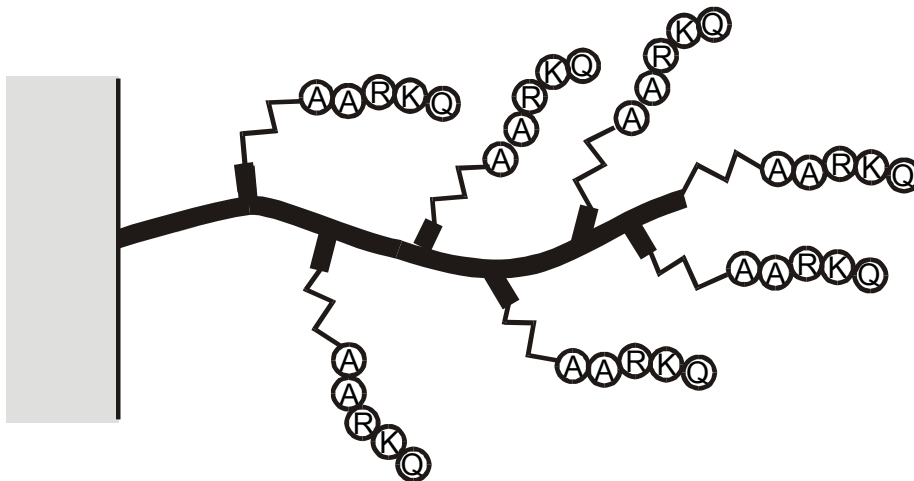
### *Europium-Fluoreszenz-Assay*

Blockierungspuffer	2 % (m/V) BSA in PBS
Peptid-Bindungspuffer	PBS + 0,02 % NaN <sub>3</sub> (m/V)
HLA-DR-Bindungspuffer	PBS + 0,02 % NaN <sub>3</sub> (m/V)+ 0,05 % Tween-20 (V/V)

## 3 METHODEN

### 3.1 Fractogel-Säulen

Das Ausgangsmaterial für die Fractogel EMD-Säulen wurden freundlicherweise von der Fa. Merck zur Verfügung gestellt. Fractogel EMD ist eine Polyacrylamid-Matrix mit einer hydrophilen Oberfläche auf die durch Ko-Polymerisation tentakelartige Polyelektrolyt-Ketten synthetisiert wurden (s. Abb. 3.1). Die einzelnen Harz-Partikel besitzen eine Größe von 20-40µm. Durch Fmoc-ε-Aminocapronsäure wird das Harz aktiviert und ε-Aminocapronsäure als „spacer“ an die Tentakelenden eingeführt. An diesen „spacer“ werden dann die Peptide synthetisiert.



**Abb. 3.1**

Schematische Darstellung der Oberfläche eines Fractogel-Partikels mit Tentakeln. An die Tentakel-Enden wurden nach dem Einfügen eines „spacers“ Peptide mit der Sequenz QKRAA synthetisiert.

Fractogel-gebundene Peptide haben gegenüber herkömmlichen Sepharose-gebundenen Peptiden einige entscheidende Vorteile (Kalbacher und Beck 1999):

- Die an das hydrophile Harz gebundenen Peptide können direkt und ohne vorherige Abspaltung in einem wässrigen System für Bindungsmessungen eingesetzt werden.



- Im Gegensatz zu Sepharose-gebundenen Peptiden ist dadurch sichergestellt, dass alle Peptide spezifisch und in der selben Orientierung an das Harz gebunden sind, da der Kupplungsschritt an die Sepharose entfällt. Eine unkoordinierte Bindung durch funktionelle Seitenketten bestimmter Aminosäuren wird ebenfalls verhindert.
- Durch den  $\epsilon$ -Aminocapronsäure-„spacer“ haben die Peptide einen ausreichenden Abstand zur Oberfläche und es ist gewährleistet, dass die Peptide sehr flexibel und für Proteine frei zugänglich sind.
- Durch die Tentakelstruktur eine außergewöhnlich hohe Beladung des Harzes mit Peptiden möglich, da an jedes Tentakelende jeweils ein Peptid synthetisiert werden kann. Dadurch werden sehr sensitive Bindungsmessungen ermöglicht.

## 3.2 Peptidsynthese

### 3.2.1 Synthese der nicht Fractogel-gebundenen Peptide:

Die in dieser Arbeit verwendeten Peptide wurden durch Festphasenpeptidsynthese nach der klassischen Fmoc/TBTU-Methode im Batch-Verfahren mittels eines modifizierten multiplen Peptidsynthesizers synthetisiert (Fields und Noble 1990). Es wurden Fmoc-Harze verwendet, zur Fmoc-Abspaltung wurde 20% (V/V) Piperidin in DMF eingesetzt, die Fmoc-AS und das Kupplungsreagenz TBTU wurden in 4-8-fachem molarem Überschuss relativ zur Harzbeladung eingesetzt. Abspaltung vom Harz und Entfernung von Schutzgruppen funktioneller Aminosäurereste erfolgte durch Inkubation mit 90% Trifluoressigsäure, 2,5% 1,2-Ethandithiol, 2,5 % H<sub>2</sub>O, 2,5% Phenol (alles V/V) für 3-4 h bei RT.

Anschließend wurden die Peptide in eiskaltem Diethylether ausgefällt, abzentrifugiert, noch zwei Mal mit Ether gewaschen und schließlich in tertButanol/Wasser (4:1) aufgenommen und lyophilisiert. Die Peptide wurden mit präparativer RP-HPLC (Umkehrphasen-Hochdruckflüssigkeitschromatographie, Säule: RP18-, 250 x 8 mm; 2 ml/min Fluss) auf über 95% Reinheit gereinigt und mittels ESI-MS (Elektrosprayionisations-Massenspektrometrie) überprüft.

### 3.2.2 Synthese der Fractogel-gebundenen Peptide:

Die Synthese erfolgte analog zur Synthese der nicht Fractogel-gebundenen Peptide, Fractogel EMD wurde als Harz verwendet. Nach Abspaltung der Schutzgruppen blieben die Peptide an das Harz gebunden, wurden mehrmals extensiv mit Dichlormethan und Isopropanol gewaschen und unter Vakuum getrocknet. Eine Kupplung der Peptide an die Gelmatrix von 0,3 mmol/g konnte nachgewiesen werden. Nach der Synthese und Abspaltung der Schutzgruppen wurden die Fractogele lyophilisiert. Um die Qualität der Synthese zu kontrollieren, wurden bei jeder multiplen Peptidsynthese einige der Peptidsequenzen über einen später abzuspaltenden „Rink-amide linker“ auf die Fractogel-Matrix synthetisiert. Nach der Synthese wurden durch Abspaltung mittels Trifluoressigsäure freie Peptide erhalten. Die Prüfung auf Identität und Reinheit der Peptide erfolgte mittels RP-HPLC und ESI-MS und ergab eine Reinheit von mehr als 90%.

### 3.3 Fractogel-Bindungsversuche:

#### *Vorbereitung der Fractogel-Säulen:*

Die nach der Synthese getrockneten, Fractogel-gebundenen Peptide wurden in PBS resuspendiert, einmal mit Fractogel-Puffer 1 gewaschen und anschließend mit 0,2 M Glycin-Lösung (pH8) über Nacht bei 4 °C inkubiert. Für die Bindungsversuche wurden die gequollenen Fractogele in Eppendorf-Cups (0,5 ml) überführt.

#### *Durchführung der Bindungsversuche:*

Die Fractogel-Säulen wurden vor jedem Bindungsversuch jeweils drei Mal in jedem der folgenden Puffer (s. 2.6) gewaschen: 1. Fractogel-Puffer 1 (pH8), 2. Fractogel-puffer 2 (Waschpuffer), 3. Fractogel-Puffer 3 (pH4). Dazu wurden die Fractogele vorsichtig im entsprechenden Puffer resuspendiert und anschließend für 10 min bei 3000 rpm abzentrifugiert. Zum Schluss wurden die Fractogele in 0,5 ml PBS resuspendiert und 5 – 10 µg des entsprechenden HSPs zupipettiert.

HSP und Fractogel wurden über Nacht bei 4 °C im Überkopfschüttler inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit Fractogel-Puffer 2 (Waschpuffer) bei 4 °C wurde dann das gebundene HSP bei pH2 eluiert (Fractogel-Elutionspuffer, pH2, 10 min. RT). Das Fractogel wurde abzentrifugiert, der Überstand abgenommen, lyophilisiert und schließlich mittels SDS-PAGE (s. 3.4) analysiert.

### 3.4 SDS-PAGE

Mittels der SDS-PAGE (Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese) lassen sich Proteingemische nach ihrer Molekularmasse auftrennen und anschließend sichtbar machen. Es wurde ein modifiziertes Verfahren nach Laemmli angewendet (Laemmli 1970). Bei dieser Methode wandern Proteine in einem Polyacrylamidgel im elektrischen Feld, die Mobilität der Proteine ist umgekehrt proportional zum Logarithmus ihrer Molekularmasse.

Zum einen kamen 10 % BisTris-Fertiggele zum Einsatz, die in MOPS-Puffer (3-(N-morpholino)propansulfonsäure) 50 min bei 200 V entwickelt wurden (Stromstärke ca. 120 mA am Anfang der Trennung, sinkend auf ca. 70 mA zum Ende der Elektrophorese). Zum anderen wurden 10 % Minigel mit einem 6 % Sammelgel nach einem Standardprotokoll (Current Protocols in Immunology, Kapitel 8.4) selbst gegossen. Die lyophilisierten Fractogel-Eluate wurden in 5 µl reduzierendem Probenpuffer (6-fach Probenpuffer mit Dithiothreitol (DTT), Current Protocols in Immunology, Kapitel 8.4) aufgenommen, mit 2 N NaOH neutralisiert und mit Wasser verdünnt. Die Proben wurden dann 5 min. auf 95 °C erhitzt und 15 µl der Proben in die Taschen des Geles pipettiert. Zur Größenbestimmung erfolgte die Auftrennung eines Markergemisches (Rainbow-Marker) in einer der äußeren Bahnen des Geles. Die selbst gegossenen Gele wurden mit Elektrodenpuffer (25 mM Tris, 192 mM Glycin, 0,1 % (m/V) SDS) bei einer konstanten Spannung von 200V bei RT entwickelt.

Anschließend wurden die Proteine mittels Silberfärbung sichtbar gemacht (Silver-staining-Kit, Durchführung laut Protokoll). Silberfärbung hat gegenüber der herkömmlichen Färbung mit Coomassie-Lösung den Vorteil, dass bereits deutlich geringere Proteinmengen detektiert werden können.

### 3.5 Europium-Fluoreszenz-Assay

Quantitative Bindungs- und Kompetitionsversuche mit HLA-DR-Peptidfragmenten und ganzen HLA-DR-Molekülen wurden mit einem Europium-Fluoreszenz-Assay durchgeführt (Tompkins *et al.* 1993), der auch als DELFIA (dissociation-enhanced lanthanide fluorescent immunoassay) bezeichnet wird. Diese Methode funktioniert ähnlich einem Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), erlaubt aber lineare

Messungen über einen größeren Bereich, ist sensitiver und führt zu niedrigeren Hintergrund-Werten (Smith *et al.* 2001). Dabei wird ausgenutzt, dass Lanthaniden-Elemente wie Europium bei erniedrigtem pH-Wert langlebige Chelatkomplexe bilden. Diese haben ein sehr eng begrenztes Emissionsspektrum mit einem starken Wellenlängen-Unterschied zwischen absorbierter und emittierter Strahlung (Stokes-Shift). Es wird die „time-resolved fluorescence“ gemessen (Kurze Verzögerung zwischen Anregungspuls und Messung der emittierten Strahlung). Falls nicht anders angegeben, wurden in den Experimenten Dreifachwerte bestimmt. Die Auswertung der Ergebnisse des Europium-Fluoreszenz-Assays erfolgte meist mit dem Programm GraphPad Prism 4.0, z. T. auch mit Origin 6.1.

### 3.5.1 Europium-Fluoreszenz-Assay mit HLA-DR-Peptidfragmenten

Peptide, die die HV3-Region von verschiedenen HLA-DRB1-Molekülen abdecken, wurden wie in 3.2 beschrieben synthetisiert und z. T. N-terminal biotinyliert.

Die Peptide wurden in nicht-kompetitiven (verschiedene Konzentrationen Biotin-markiertes Peptid) und kompetitiven Experimenten (feste Konzentration an Biotin-markiertem Indikatorpeptid +/- verschiedene Überschüsse unmarkierter Kompetitorpeptide) eingesetzt. Alle Konzentrationsangaben bei der Durchführung des Europium-Fluoreszenz-Assays beschreiben m/V.

Transparente 96-well FluoroNunc-Platten wurden da zu über Nacht bei 4°C mit 0,5 µg/well monoklonalem Antikörper (mAk) gegen das gewünschte HSP inkubiert (anti-DnaK bzw. anti-HSP70, 10 µg/ml in PBS gelöst, 50 µl/well). Parallel hierzu wurde das zu untersuchende HSP (Hsp70 bzw. DnaK) in einer Konzentration von 0,5 µg/well (50 µl Endvolumen/well, für jede Probe wurde ein 1,3-facher Ansatz gemacht) 18h bei 37°C in PBS mit den zu untersuchenden Peptiden komplexiert.

Nach ca. 18h wurde die Antikörper-beschichtete Platte ausgeschüttet, 1 x mit PBS (200 µl/well) gewaschen und nicht von Antikörper besetzte Bindungsstellen durch eine einstündige Inkubation mit Blockierungspuffer (s. 2.6) blockiert. Es folgten drei Waschschrte mit 200 µl/well DELFIA washing-buffer und ein Wachschrte mit PBS. Anschließend wurde die vorinkubierte HSP:Peptid-Lösung (50 µl/well) auf die Platte übertragen und 1h bei RT inkubiert (Schüttler), damit die HSP:Peptid-Komplexe an den Antikörper binden können. Ungebundenes Protein und Peptid wurde anschließend durch dreimaliges waschen mit DELFIA washing-buffer entfernt. Um

auszuschließen, dass das Biotin-markierte Peptid selbst an den mAk oder das Blockierungsreagenz BSA bindet, wurden in jedem Versuch mehrere wells mit Biotin-Peptid ohne Zugabe von HSP inkubiert. Wurde das HLA-DRB1\*0801-Biotin-Peptid als Indikatorpeptid benutzt, folgte auf Grund der sehr niedrigen Messwerte eine Fixierung der gebundenen Peptide mittels Glutaraldehyd: 50 µl einer 0,1 %igen Glutaraldehydlösung (in PBS) wurde für 8 min zugegeben, dann abgeschüttet und 150 µl 1M Glycin in PBS für 2 min addiert (um restliches Glutaraldehyd abzusättigen), gefolgt von weiteren Waschschritten. Bei Versuchen mit Biotin-CLIP wurde auf die Fixierung verzichtet, da auch ohne Fixierung ausreichend hohe Messwerte erzielt wurden.

Im Anschluss erfolgte die Zugabe von 50 µl Europium-Streptavidin-Lösung, die zuvor 1:500 in DELFIA assay-buffer verdünnt wurde (Endkonzentration Europium-Streptavidin 0,2 µg/ml, 1h RT). Nach einem weiteren Waschschriff wurde 100 µl DELFIA „enhancement solution“ zugegeben. Im sauren pH dieser Lösung wird an Streptavidin gebundenes Europium freigesetzt ( $\text{Eu}^{3+}$ ) und zu einem fluoreszierenden Chelatkomplex gebunden. Nach 10 min im Dunkeln bei RT (Schüttler) wurde mit dem Wallac Victor Multilabel Counter die resultierende Fluoreszenz der Chelatkomplexe bei 615 nm gemessen.

### 3.5.2 Europium-Fluoreszenz-Assay mit löslichen HLA-DR-Molekülen

Die Durchführung der quantitativen Bindungsexperimente mit isolierten, ganzen HLA-DR-Molekülen (Isolierung s. 3.6) war den Bindungsmessungen mit HLA-DR-Peptidfragmenten sehr ähnlich.

Anstatt anti-HSP mAk wurde für diese Versuche das zu untersuchende HSP direkt auf die Platte „gecoatet“ (5 µg/ml in PBS, 50 µl/well, 18h). Dabei wurden bessere Ergebnisse erzielt, wenn das „Coating“ bei 37°C erfolgte und nicht bei 4°C (bessere HSP-Bindung an die Mikrotiter-Platte). Waschen und Blockieren nicht besetzter Bindungsstellen erfolgte wie in 3.5.1 beschrieben.

Anschließend wurden die HLA-DR-Moleküle in der gewünschten Konzentration zugegeben (50 µl/well). In nicht-kompetitiven Experimenten (Sättigungsexperimente) wurden unterschiedliche Konzentrationen Biotin-markierter HLA-DR-Moleküle auf die HSP-beschichteten Mikrotiter-Platten gegeben. In kompetitiven Experimenten wurde eine festgelegte Konzentration eines Biotin-markierten HLA-DR-Moleküls mit oder

ohne verschiedene Überschüsse an unmarkierten HLA-DR-Molekülen oder anderen Proteinen auf die Platten gegeben. Die Inkubation erfolgte für 60 min bei 37 °C in HLA-DR-Bindungspuffer (s. 2.6). Nach der Inkubation wurden nicht-gebundene HLA-DR-Moleküle durch 5-maliges Waschen mit DELFIA washing-buffer entfernt, eine Fixierung gebundener Moleküle erfolgte nicht. Weiteres Vorgehen s. 3.5.1. Die Experimente mit rekombinant hergestellten Biotin-markierten HLA-DR-Molekülen wurden analog zu den Versuchen mit aus Zelllinien isolierten HLA-DR-Molekülen durchgeführt.

## **3.6 Isolierung und Biotin-markierung von HLA-DR-Molekülen aus Zelllinien**

### **3.6.1 Isolierung von HLA-DR-Molekülen aus Zelllinien**

Die Isolierung der HLA-DR-Moleküle erfolgte mittels Immunaffinitätschromatographie (Gorga *et al.* 1987). Dazu wurden die tiefgefrorenen Zellpellets der B-LCL-Zelllinien (s. 3.8.1) gewogen und mit der vierfachen Menge Lysepuffer (Puffer zur HLA-DR-Isolierung s. 2.6) versetzt. In 10 ml Lysat wurde eine Tablette des Protease-Inhibitor-Cocktails Complete Mini gelöst, um bei der Lyse freigesetzte Proteasen weitgehend zu inaktivieren. Anschließend wurden 2% (m/m) Triton X-100 zugegeben und die Zellen im Becherglas unter Rühren für 2 h bei 4°C langsam lysiert. Mit 1 M Tris/HCl pH 8,5 wurde das Zelllysate auf pH 7,8 eingestellt. Um grobe Zellfragmente abzutrennen, wurde das Lysat für 10 min bei 2.300 rpm und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde anschließend ultrazentrifugiert (25.000 rpm, 30 min, 4°C), um weitere unlösliche Bestandteile sowie flottierende Lipide abzutrennen. Sowohl das Pellet aus der Vorzentrifugation als auch das Ultrazentrifugationspellet wurden über Nacht erneut lysiert und anschließend wie oben beschrieben durch Zentrifugation geklärt.

Alle nachfolgenden Schritte wurden bei 4°C im Kühlraum durchgeführt. Die für die Immunaffinitätschromatographie verwendeten Säulen wurden zunächst mit dem vier- bis fünffachen Säulenvolumen Waschpuffer vorbereitet. Das geklärte Zelllysate wurde über Nacht mit einer Flussrate von ca. 2 ml/min über einen Zyklus bestehend aus einer Vorsäule (CH-Sepharose 4B) und zwei Sepharose-Säulen, die mit dem anti-HLA-DR mAk L-243 gekoppelt waren, der ein nicht-polymorphes Epitop intakter HLA-

DR-Moleküle erkennt (Klohe *et al.* 1988). Anschließend wurden die Säulen einzeln vom Zyklus entkoppelt und das Lysat durch Spülen mit dem zwei- bis dreifachen Säulenvolumen Lysepuffer mit 0,5% Triton X-100 (m/V) entfernt. Mit Waschpuffer wurde unter UV-Detektion gewaschen, bis die UV-Absorption bei 278 nm auf ein konstantes Niveau gesunken war (vollständige Entfernung von Triton X-100, das bei Wellenlängen <300 nm eine starke UV-Absorption zeigt).

Die nun auf Waschpuffer umgepufferten Säulen wurden anschließend mit Elutionspuffer pH 8 gewaschen. Danach erfolgte die alkalische Elution der HLA-DR-Moleküle unter UV-Detektion bei 278 nm mit Elutionspuffer pH 11,2. Es wurde bis zum Wiedererreichen einer Basislinie eluiert. Die Säule wurde anschließend mit Waschpuffer neutralisiert. Das Eluat wurde in vorgelegtem 1 M Tris/HCl pH 8,0 aufgefangen, damit eine sofortige Neutralisierung des Eluats erfolgte. Alle Eluate wurden vereinigt und auf Waschpuffer (+0,05% (m/V)  $\text{NaN}_3$ ) umgepuffert. Mittels Ultrafiltration über eine 20 kDa Ausschluss-Membran in der Magnetrührzelle wurden sie auf ca. 0,5 ml aufkonzentriert. Die aufkonzentrierten Isolate wurden mit Protease-Inhibitoren und EDTA (Ethyldiamintetraacetat) versetzt und bei 4°C aufbewahrt. Die Reinheit der HLA-DR-Isolation wurde mittels SDS-PAGE überprüft, die Proteinkonzentration wie in 3.7 beschrieben ermittelt.

### 3.6.2 Biotin-Markierung der isolierten HLA-DR-Moleküle

Mit Biotin-Succinimidestern erfolgt eine Kupplung von Biotin an freie Aminogruppen von Proteinen. Die HLA-DR-Proteinlösung wurde vor der Biotinylierung über eine 20 kDa-Membran (Magnetrührzelle) in 0,1 M Boratpuffer pH 8,4 umgepuffert. Die Lösung wurde dann mit Biotin-N-Hydroxysuccinimidester (Stammlösung 2 mg/ml in DMF) im molaren Verhältnis 3:1 (Biotin:Protein) versetzt und 2 h bei RT unter leichtem Schütteln inkubiert. Anschließend wurde 1 M Glycin-Lösung zugegeben, um freie Biotin-ester zu Binden und 1 h weiter inkubiert. Mittels Gelfiltration (PD-10 Sephadex G-25 M Säule) wurde Protein von ungebundenem Biotin abgetrennt, die Protein enthaltenden Fraktionen spektrometrisch bestimmt (UV-Spektrometer, Absorption bei 280 nm). Anschließend wurden Protease-Inhibitoren zugegeben und der genaue Proteingehalt ermittelt (s. 3.7).

### 3.7 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Bestimmung der Proteinkonzentration von Lösungen erfolgte mit Roti-Nanoquant-Lösung. Dabei wird in einer modifizierten Methode nach Bradford (Bradford 1976) die Bindung eines Farbstoffes an Proteine gemessen. Die Methode gewährleistet eine lineare Konzentrationsmessung auch bei großen Konzentrationsunterschieden.

Für die Messung wird die Roti-Nanoquant-Stammlösung 1:5 mit Aqua dest. verdünnt. Von dieser Arbeitslösung werden 200 µl in eine 96-Loch Mikrotiterplatte pipettiert und 50 µl Probe zugegeben. Die Proben wurden zuvor 1:5 bzw. 1:10 mit Aqua dest. verdünnt. Anschließend wird im ELISA-Reader die Absorption bei 450 und 620 nm bestimmt. Die Proteinkonzentration errechnet sich aus dem Quotient der Absorption bei 620 nm und der Absorption bei 450 nm, sowie der Steigung und dem Achsenabschnitt aus der mit BSA ermittelten Eichgerade.

### 3.8 Zellbiologische Methoden

#### 3.8.1 Zellkultur immortalisierter B-Zelllinien zur HLA-DR-Isolierung

Für die Aufreinigung von HLA-DR-Molekülen wurden B-LCLs kultiviert, die jeweils homozygot ein bestimmtes HLA-DR-Molekül exprimieren (s. 2.4). Alle Zellen wurden im Brutschrank bei 37°C und unter 5% CO<sub>2</sub>-Begasung kultiviert.

Die B-LCLs wurden als Suspensionszellen in RPMI 1640 Medium kultiviert, das mit 10% (V/V) fötalem Kälberserum (FCS), sowie Glutamin (2 mM), Penicillin (0.06 mg/ml), Streptomycin (0.1 mg/ml) und HEPES (4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonsäure -Puffer (5 mM) supplementiert war. Die Zellen wurden in 162 cm<sup>2</sup> Zellkulturflaschen expandiert, bei Bedarf mit frischem Medium versetzt oder geteilt und schließlich das Zellpellet nach Abzentrifugation bei -80 °C tiefgefroren.

#### 3.8.2 Kultur humaner T-Zellen für T-Zellstimulationsexperimente

Für die Experimente zum Einfluss von Hsp70 auf die CD4<sup>+</sup> T-Zellproliferation wurden PBMCs bzw. CD4<sup>+</sup> T-Zellen von gesunden Donoren mit bekanntem HLA-DR-Haplotyp isoliert (s. 3.8.4. und 3.8.5) und mit Peptiden oder Hsp70:Peptid-Komplexen stimuliert.



Die PBMCs wurden nach ihrer Isolation in RPMI 1640 kultiviert, das mit 10% gepooltem humanem Serum (PHS, Gewinnung s. 3.8.3), Glutamin (2 mM), Penicillin (0.06 mg/ml), Streptomycin (0.1 mg/ml) und HEPES-Puffer (5 mM) supplementiert war (37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>).

### **3.8.3 Gewinnung von humanem Serum für die T-Zellkultur**

T-Zellen wurden in Medium kultiviert, das mit 10 % gepooltem humanem Serum (PHS) supplementiert war. Dazu wurde von 8 LabormitarbeiterInnen (4 weiblich, 4 männlich) jeweils 120 ml peripheres Blut ohne Zugabe gerinnungshemmender Zusätze abgenommen, sofort in 50 ml Röhrchen überführt und 1 h bei 37 °C inkubiert. Das geronnene Blut wurde 10 min bei 3250 rpm zentrifugiert und anschließend das Serum mit einer Pipette abgenommen. Das Serum von allen Spendern wurde gepoolt und nach Hitzeinaktivierung (30 min bei 56 °C im Wasserbad) aliquotiert und bei –20 °C tiefgefroren.

### **3.8.4 Isolierung mononukleärer Zellen aus peripherem Blut**

B-Zellen, T-Zellen und Monozyten gehören zu den peripheren mononukleären Blutzellen (PBMCs). Sie können aus dem Blut gesunder Donoren mittels diskontinuierlicher Dichtegradientenzentrifugation isoliert werden.

Dazu wurde Blut gesunder Donoren bekannten HLA-DR-Haplotyps mit PBS im Verhältnis 1:2 verdünnt. In einem 50 ml Röhrchen wurden 15 ml Ficoll-Trennlösung (Biocoll separation solution) vorgelegt, mit 30 ml verdünntem Blut überschichtet und 20 min bei 2020 rpm ohne Bremse zentrifugiert. Bei dieser Zentrifugation durchqueren Erythrozyten und Granulozyten aufgrund ihrer hohen Dichte die Ficoll-Schicht, während die PBMCs sich als dünne Schicht an der Phasengrenze zwischen Ficoll und verdünntem Blutplasma anreichern. Die PBMCs wurden mit einer Pipette vorsichtig aus dieser Interphase entfernt, 1 x mit PBS (10 min, 2020 rpm) und anschließend mehrmals mit PBS 2% FCS gewaschen (4 min, 1300 rpm). Danach wurden die PBMCs gezählt und in Medium aufgenommen.

### 3.8.5 Isolierung von CD4<sup>+</sup> T-Zellen

Aus den PBMCs wurden CD4<sup>+</sup> T-Zellen mittels des MACS (magnetic cell sorting) CD4<sup>+</sup> T-Zell-Isolations-Kits nach der dem Kit beiliegenden Anleitung isoliert. Dieser Kit bietet den Vorteil, dass „unberührte“ CD4<sup>+</sup> T-Zellen gewonnen werden können, d. h. die Zellen sind nach der Isolation nicht mit Antikörpern markiert, die negativen Einfluss auf den weiteren Versuch haben könnten. Bei diesem Verfahren wurden die PBMCs zuerst mit einem Cocktail Biotin-markierter mAk (gegen CD8, CD14, CD16, CD19, CD36, CD56, CD123, TZR<sub>γδ</sub> und Glycophorin A) inkubiert. Dadurch blieben die CD4<sup>+</sup> T-Zellen unmarkiert, während die restlichen in den PBMCs enthaltenen Zelltypen mit biotinylierten Antikörpern markiert wurden. Nach Zugabe anti-Biotin-konjugierter MicroBeads wurden die markierten Zellen mittels der MACS-Technologie (VarioMACS Separator, LS-Säule) von den unmarkierten CD4<sup>+</sup> T-Zellen separiert. Dabei werden die mit den ferromagnetischen MicroBeads markierten „Nicht-CD4<sup>+</sup> T-Zellen“ im Magnetfeld des Separators zurückgehalten, während die unmarkierten CD4<sup>+</sup> T-Zellen die Säule ungehindert passieren. Die Säule wurde mehrmals mit Puffer gespült und die CD4<sup>+</sup> T-Zellen in einem Röhrchen aufgefangen.

Die Säule wurde aus dem Magnetfeld genommen und die „Nicht-CD4<sup>+</sup> T-Zellen“ unter Druck eluiert. Diese Zellen wurden später als APZs verwendet. Beide Zellfraktionen wurden einmal gewaschen, anschließend gezählt und in Medium aufgenommen. Nach jeder Isolierung wurden die Zellen durchflusszytometrisch (s. 3.14) charakterisiert. Der Anteil lebender CD4<sup>+</sup> T-Zellen in der CD4<sup>+</sup>-Fraktion wurde durch Färbung mit anti-CD4, anti-CD3 und Propidium-Iodid (s. 3.13.1) bestimmt. Der Gehalt an CD4<sup>+</sup> T-Zellen war dabei in der Regel > 90 %. Die CD4<sup>+</sup> T-Zellfraktion enthielt meist < 0,3% Verunreinigungen einzelner anderen Zelltypen, was durch Färbung mit anti-CD8, anti-CD14 und anti-CD19 untersucht wurde. Des Weiteren wurde meist die Expression von HLA-DR und CD25 bestimmt. Für die Fraktion der „Nicht-CD4<sup>+</sup> T-Zellen“ wurden die selben Parameter bestimmt.

## 3.9 CFSE-Färbung

Für T-Zellproliferationsexperimente wurden die Zellen mit dem Fluoreszenzfarbstoff CFSE (5(6)-Carboxyfluorescein di-acetate N-succinimidylester) gefärbt, der sich bei jeder Teilung der Zellen zu gleichen Teilen in der Mutter- und Tochterzelle verteilt.

Diese Methode besitzt gegenüber dem herkömmlichen  $^3\text{H}$ -Thymidineinbau den Vorteil, durch zusätzliches Anfärben der Zellen mit anti-CD4 mAk und / oder Peptid-beladenen MHC II-Tetrameren die Auswertung ausschließlich auf  $\text{CD4}^+$  T-Zellen oder antigenspezifische T-Zellen zu beschränken. Mittels der Durchflusszytometrie wurde nach 6 Tagen die Verdünnung des Farbstoffes in proliferierten T-Zellen bestimmt.

Die Zellen wurden 10 min bei  $37^\circ\text{C}$  in 2 ml PBS mit  $0,8 \mu\text{M}$  CFSE gefärbt. Die Färbung wurde durch Zugabe von 4 ml reinem FCS gestoppt (2 min, RT), das überschüssigen Farbstoff bindet. Nach Zugabe von 6 ml serumfreiem Medium (RPMI 1640, Biochrom) wurden die Zellen abzentrifugiert, in wenig 10 % PHS-Medium aufgenommen, gezählt und auf die gewünschte Zellzahl verdünnt.

### 3.10 T-Zellproliferationsexperimente

Die mit CFSE markierten Zellen wurden mit autologen APZs in Kultur genommen. Als APZs wurde die Fraktion der „Nicht- $\text{CD4}^+$  T-Zellen“ ( $\text{CD4}^+$  Isolierung, s. 3.8.4) verwendet. Die Zellen wurden vor ihrer Verwendung als APZs mit einer Strahlungs-dosis von 30 Gy bestrahlt, um die DNA der Zellen so stark zu schädigen, dass eine Proliferation der APZs verhindert wird.

Die gewünschte Zahl an APZs (unterschiedlich in den verschiedenen Experimenten) wurde für 2 h bei  $37^\circ\text{C}$  mit der gewünschten Konzentration vorinkubierter antigener Peptide bzw. Protein:Peptid-Komplexen (s. 3.11) inkubiert. Danach wurden die APZs zusammen mit  $2 \times 10^5$   $\text{CD4}^+$  T-Zellen in 200  $\mu\text{l}$  Kulturmedium in 96-Loch Flachbodenplatten für 6 Tage im Brutschrank kultiviert (s. 3.8.2). An Tag 6 wurden die Zellen aus der Platte entnommen und in FACS-Röhrchen überführt. Es folgte die Färbung mit fluoreszenz-markiertem anti-CD4 mAk bzw. HLA-DR-Tetrameren (s. 3.13) um zu zeigen, dass nur  $\text{CD4}^+$  T-Zellen proliferieren, bzw. um den Anteil der T-Zellen zu ermitteln, die spezifisch auf das verwendete Antigen reagieren. Die Verdünnung des CFSE-Farbstoffes in proliferierten Zellen und die Bindung von anti-CD4 und HLA-DR-Tetrameren wurde mittels der Durchflusszytometrie (s. 3.11) analysiert. Meist wurden Dreifachwerte bestimmt, d. h. T-Zellen in drei verschiedenen Löchern wurden jeweils mit derselben Antigenkonzentration stimuliert.

Als Negativkontrollen dienten dabei stets unstimulierte Proben bzw. mit Hsp70 oder anderen Proteinen stimulierte Proben ohne antigene Peptide. Als Positivkontrolle diente in den meisten Experimenten eine mit 2 µg/ml SEB (Staphylococcal Enterotoxin B) stimulierte Probe, in manchen Experimenten wurde auch PHA (Phytohämagglutinin) verwendet. SEB ist ein Superantigen aus *S.aureus*, das einen großen Teil der T-Zellen unabhängig von ihrer Antigenpezifität stimulieren kann. Bei der durchflusszytometrischen Analyse SEB-stimulierter und CFSE-gefärbter T-Zellen wird ein Histogramm mit definierten Peaks erhalten, aus denen die Anzahl der stattgefundenen Zellteilungen ermittelt werden kann (s. Abb. 4.25).

### 3.11 Herstellung der Hsp70:Peptid-Komplexe

Für die Komplexierung der antigenen Peptide mit den verwendeten Proteinen wurden Peptide und Proteine über Nacht bei 37°C vorinkubiert. Die Affinität der verwendeten antigenen Peptide zu Hsp70 wurde im Europium-Fluoreszenz-Assay untersucht (s. 4.4.3). Peptide und Proteine für die Stimulation von 1 ml Zellsuspension wurden in einem Volumen von 50 µl vorinkubiert (d. h. 5 µl der vorinkubierten Lösung ergibt in einem Volumen von 100 µl Zellsuspension die gewünschte Antigenkonzentration für das Experiment). Als Bindungspuffer wurde PBS verwendet, dem wenn angegeben 2 mM ADP zugesetzt wurde, um eine Bindung der Peptide an Hsp70 zu erleichtern.

Technisch ist eine Abtrennung der ungebundenen Peptide (z. B. durch Filtration über eine Membran) und anschließende genaue Bestimmung der Hsp70-gebundenen Peptidmenge sehr schwierig. Daher wurden ungebundene Peptide nicht von der Hsp70:Peptid-Mixtur abgetrennt. Mit steigenden Peptidkonzentrationen liegt dann ein Teil der Peptide an Hsp70 komplexiert vor, aber auch ein immer größerer Anteil an freiem Peptid. Um zu zeigen, dass die Hsp70-Komplexierung eine verstärkte Proliferation bewirkt, wurden Versuche unter „Grenzbedingungen“ durchgeführt, d. h. es wurde die Stimulation mit Peptid und Hsp70:Peptid-Komplexen unter Bedingungen verglichen, bei denen das Peptid alleine nicht imstande ist, eine T-Zellantwort auszulösen (z. B. sehr niedrige Konzentrationen an antigenem Peptid oder erniedrigte Zahl an APZs). Es wurden molare Hsp70:Peptid-Verhältnisse von etwa 10:1 bis 1:100 untersucht.

Hsp70:Peptidkomplexe, Peptid alleine und Peptide + Kontrollproteine wurden alle unter den selben Bedingungen vorinkubiert. In vielen Versuchen wurde zusätzlich freies Peptid ohne Vorinkubation eingesetzt, um zu zeigen, dass die Vorinkubation keinen Effekt auf das Peptid hat (z. B. Zersetzung oder Adsorption an das Reaktionsgefäß). Als weitere Kontrolle wurden die antigenen Peptide mit Kontrollproteinen vorinkubiert, z. B. mit humanem Serumalbumin (HSA), das ebenfalls an viele Moleküle reversibel binden kann oder Hsc70-ATPase-Fragment (Hsc70-ATPf), das ähnlich hergestellt wird wie rekombinantes Hsp70, aber keine Peptidbindungsdomäne besitzt. Um einen Effekt durch mikrobielle Verunreinigungen der Hsp70-Präparation auszuschließen wurden Versuche mit Lipopolysaccharid (LPS) durchgeführt, einem Bestandteil der Zellmembran gramnegativer Bakterien.

## 3.12 rekombinante HLA-DR-Moleküle und HLA-DR-Tetramere

### 3.12.1 rekombinante HLA-DR-Moleküle

Rekombinante HLA-DR-Moleküle wurden im Rahmen einer Kooperation von William W. Kwok erhalten. Die Herstellung, Reinigung und Biotinylierung erfolgte am BRI wie in der Literatur beschrieben (Novak *et al.* 1999). Die verwendeten rekombinanten HLA-DR-Moleküle bestehen aus den extrazellulären Domänen der Klasse II  $\alpha$ - und  $\beta$ -Ketten, einer Biotinylierungssequenz (nur in der  $\beta$ -Kette), sowie einer N-terminalen Leucin-Sequenz an beiden Ketten, die die Transmembran-Domäne ersetzt (s. Abb. 3.2 A, linker Teil). Diese Leucin-Sequenz hält die Moleküle wie ein Reißverschluss zusammen („leucine zipper“) und sorgt für Löslichkeit und Stabilität der Moleküle. Die cDNA-Konstrukte für die  $\alpha$ - und  $\beta$ -Kette wurden in getrennte Expressionsvektoren kloniert und diese stabil in *Drosophila*-Zellen transfiziert. Transfizierte Zellen wurden selektiert, expandiert und die HLA-DR-Expression mit  $\text{CuSO}_4$  induziert. Die HLA-DR-Moleküle wurden mit dem mAk L-243 mittels Immunaффinitätschromatographie isoliert (vgl. 3.6.1). Nach Aufkonzentrierung wurden die HLA-DR-Moleküle mit dem Enzym BirA biotinyliert. Bei diesem Herstellungsverfahren entstehen stabile HLA-DR-Dimere, die zum überwiegenden Teil kein Peptid gebunden haben (mündliche Auskunft W. W. Kwok) und erst nach der Isolierung mit Peptiden beladen werden. Dies hat den Vorteil, dass die HLA-DR-Moleküle mit einer großen Anzahl unterschiedlicher Peptide beladen werden können, im Gegensatz zur Methode der

Expression fixer MHC:Peptid-Konstrukte, die meist für die Herstellung von MHC Klasse I-Tetrameren verwendet wird.

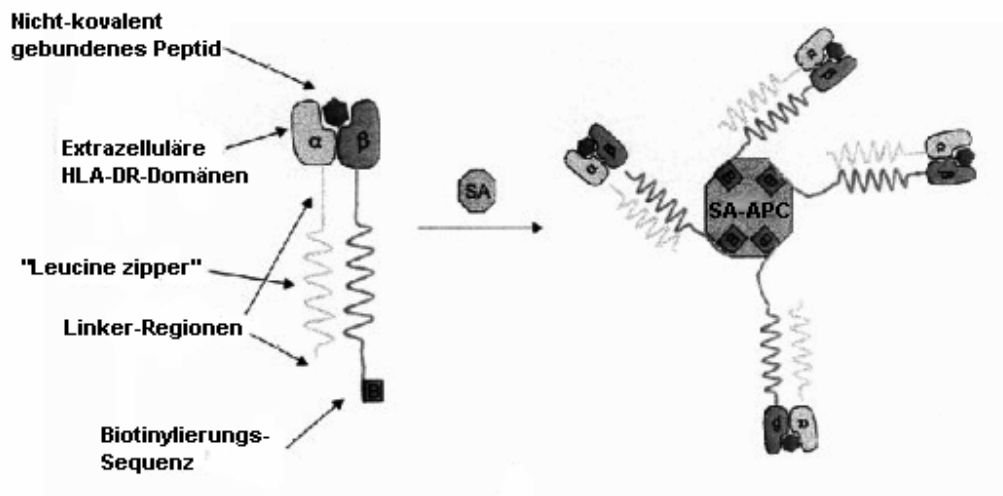
Die rekombinanten HLA-DR-Moleküle wurden im Europium-Fluoreszenz-Assay (mit und ohne Biotin-markierung, s. 3.5.2) und zur Herstellung von HLA-DR-Tetrameren (s. 3.12.2) eingesetzt.

### 3.12.2 HLA-DR-Tetramere

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

Diese humanen MHC II-Tetramere bestehen aus den rekombinanten HLA-DR-Molekülen (s. 3.12.1), die mit verschiedenen antigenen Peptiden beladen werden können. Anschließend können durch Inkubation dieser biotinylierten MHC II-Peptid-Komplexe mit Streptavidin-gekoppelten Farbstoffen die fluoreszierenden MHC II-Tetramere gewonnen werden. Diese peptidbeladenen MHC II-Tetramere können mit bis zu vier T-Zellrezeptoren humaner CD4<sup>+</sup> T-Zellen interagieren, die das antigene Peptid im Kontext mit dem verwendeten HLA-DR-Molekül erkennen (Antigenspezifische T-Zellen). Die Zellen können mit der Durchflusszytometrie analysiert bzw. sortiert und isoliert werden. Abb. 3.2 A zeigt schematisch den Aufbau der rekombinanten HLA-DR-Monomere und die Tetramerisierung mit Streptavidin-APC (SA-APC), Abb. 3.2 B zeigt ein molekulares Modell der kompletten Tetramere.

A)



B)



Abb. 3.2

HLA-Klasse II-Tetramere

**A)** Schematische Ansicht der löslichen, rekombinanten MHC II-  $\alpha/\beta$ -Dimere mit „leucine zipper“, Linkersequenz, Biotinylierungsstelle und nicht-kovalent gebundenem Peptid. Die Tetramerisierung erfolgt durch die Interaktion mit fluoreszenz-markiertem Streptavidin (SA-APC).

**B)** Dreidimensionales Modell eines fertigen Tetramer-Moleküls mit zentralem SA, flexiblen Armen aus Linkern und „leucine-zipper“ und den vier MHC:Peptid-Komplexen.

Abbildungen modifiziert aus Nepom *et al.* (2002).

Die Beladung der rekombinanten HLA-DR-Moleküle mit antigenen Peptiden und die anschließende Tetramerisierung wurde in unserem Labor durchgeführt. Die Peptid-Beladung der Biotin-markierten HLA-DR-Monomere (die bessere Bezeichnung wäre Dimere, da sie aus  $\alpha$ - und  $\beta$ -Kette bestehen) erfolgte dabei wie in der Literatur beschrieben (Novak *et al.* 1999): Die HLA-DR-Monomere (1  $\mu\text{g/ml}$ ) wurden 1:1 mit 2-fach Phosphatpuffer (200 mM, pH 5,9) gemischt, dem 5 mg/ml n-Octyl  $\beta$ -D-Glucopyranosid als Detergenz zugesetzt war. Zu dieser Lösung wurde 500  $\mu\text{g/ml}$  antigenes Peptid (Stammlösung 50 mg/ml in DMSO) sowie 1 mg/ml des Proteaseinhibitors Pefabloc SC addiert. Es folgte eine Inkubationsperiode von 72 h bei 37 °C in einem Eppendorf-Tube, um die Monomere mit dem antigenen Peptid zu beladen. Zu den peptidbeladenen Monomeren wurde 1/5 des Gesamtvolumens an Streptavidin-Allophycocyanin (SA-APC) zugegeben, was etwa einem molaren Streptavidin:Monomer-Verhältnis von 1:8 entspricht. Es erfolgte über Nacht eine Inkubation bei RT im Dunkeln. Die fertigen Tetramere wurden bis zur Verwendung bei 4 °C aufbewahrt.

Das Peptid HA<sub>307-319</sub> wurde benutzt, um DRB1\*0401/HA<sub>307-319</sub> Tetramere herzustellen, mit dem Peptid TT<sub>947-966</sub> wurden DRB1\*1101/TT<sub>947-966</sub> Tetramere hergestellt. Als Kontroll-Tetramere wurden leere DRB1\*0401 Tetramere benutzt, sowie DRB1\*1101 Tetramere, die mit dem nicht zur Stimulation verwendeten Peptid TT<sub>830-844</sub> beladen wurden.

### **3.13 Färbung von Zellen mit Antikörpern und HLA-DR-Tetrameren**

#### **3.13.1 Färbung mit Antikörpern**

Die zu färbenden Zellen wurden in FACS-Röhrchen überführt und jeweils mit 2 ml PBS 2 % FCS gewaschen und abzentrifugiert (1300 rpm, 4 min). Der Überstand wurde schwungvoll abgeschüttelt, die Zellen in der verbliebenen Flüssigkeit resuspendiert (ca. 50 – 100  $\mu\text{l}$ ). 1 – 10  $\mu\text{l}$  der gewünschten fluoreszenz-markierten mAk (s. 2.3) wurden addiert und die Zellen 10 – 30 min auf Eis im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit 3 ml PBS 2 % FCS gewaschen, zentrifugiert, abgeschüttelt, resuspendiert und mittels FACS analysiert. Eventuell erfolgte unmittelbar vor der Analyse die Zugabe von 1  $\mu\text{l}$  Propidium-Iodid, um tote Zellen von der Analyse ausschließen zu können.



### 3.13.2 Färbung mit HLA-DR-Tetrameren

Die Zellen wurden in ein FACS-Röhrchen überführt, mit 10 % PHS-Medium gewaschen, abzentrifugiert und der Überstand vollständig abgenommen. Anschließend wurden die Zellen in 50 µl 10 % PHS-Medium resuspendiert und 0,5 µl des gewünschten HLA-DR-Tetramers zugegeben, was einer Tetramer-Konzentration von ca. 4 µg/ml entspricht. Die Zellen wurden 3 h bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurde anti-CD4-PE (Phycoerythrin) addiert und die Zellen weitere 10 min auf Eis im Dunkeln weiter inkubiert. Die Zellen wurden in FACS-Röhrchen überführt und mit 3 ml PBS 2 % FCS gewaschen. Unmittelbar vor der Analyse mittels FACS wurde 1 µl Propidium-Iodid zu jeder Probe gegeben.

### 3.14 Durchflusszytometrie

Die mittels CFSE und fluoreszenzgekoppelten Antikörpern und / oder HLA-DR-Tetrameren gefärbten Zellen (s. 3.9, 3.13.1 und 3.13.2) wurden mit einem Durchflusszytometer (FACS) analysiert. Die Durchflusszytometrie erlaubt Aussagen über Größe, Granularität und spezifische Fluoreszenzen der analysierten Zellen. Die Messung beruht darauf, dass die fluoreszenz-markierten Zellen in einem laminaren Probenstrom einzeln mit einem Laserstrahl (Argon- und Helium-Neon-Laser) erfasst werden. Die Farbstoffe werden zur Emission eines Fluoreszenzlichts bestimmter Wellenlänge angeregt, das durch ein komplexes System von Spiegeln und Filtern gebündelt und zerlegt wird. Mit Hilfe spezifischer Detektoren können dann die Streulicht- und Fluoreszenzsignale einzelner Zellen gemessen werden. Mit dem in dieser Arbeit verwendeten Gerät konnten gleichzeitig vier Fluoreszenzfarbstoffe mit unterschiedlichen Emissionsspektren gemessen werden.

Unabhängig von den verwendeten Fluoreszenzfarbstoffen lassen sich auch Aussagen über die Größe der analysierten Zellen und deren Granularität treffen. Die Streulichtparameter enthalten das Vorwärtsstreulicht (Streuung in Verlängerung der Laserstrahlrichtung) und das Seitwärtsstreulicht (Streuung an Zellstrukturen um 90° zum Laserstrahl). Das Vorwärtsstreulicht (FSC) definiert Zellpopulationen aufgrund ihrer Größe. Das Seitwärtsstreulicht (SSC) stellt ein relatives Maß für die intrazelluläre Granulation der Zellen dar.

Als Fluoreszenz-Farbstoffe wurden in dieser Arbeit Fluoreszeinisothiocyanat (FITC), CFSE, PE, Peridinin-chlorophyll-protein complex (PerCP), Propidium-Iodid und APC verwendet. Überlappungen der einzelnen Emissionsspektren wurden vor der Messung kompensiert. Die Quantifizierung der Fluoreszenz- und Streulichtemissionen von 10.000 bis 50.000 Zellen je Probe wurden gespeichert. Die Daten wurden anschließend mit Hilfe von Computerprogrammen (WinMDI und Cell Quest) ausgewertet.

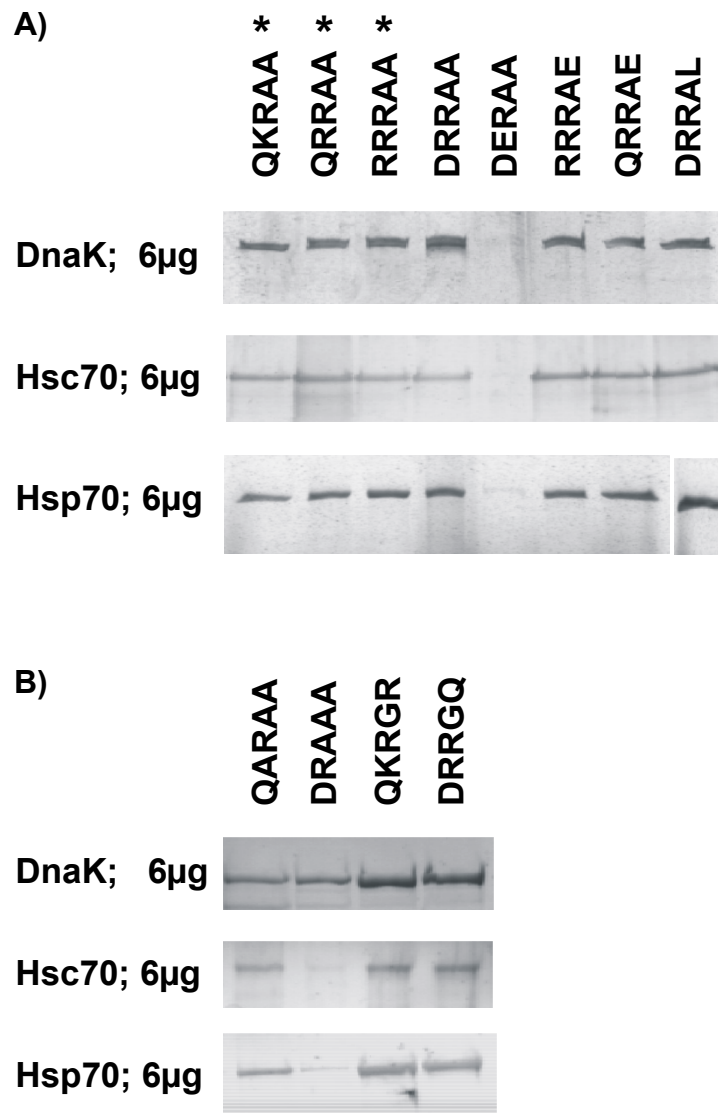
## 4 ERGEBNISSE

### 4.1 Qualitative Bindungsuntersuchungen mit HSP70 und Fractogel-gebundenen HLA-DR-Peptidfragmenten

Grundlage für die Bindungsuntersuchungen mit HSP70-Molekülen und HLA-DR-Peptidfragmenten bildete die von Auger *et al.* (1996) beschriebene Interaktion von Peptiden aus der HV3-Region von RA-assoziierten HLA-DR-Molekülen mit DnaK, dem HSP70-Molekül des *E.coli* Bakteriums. Die Methode der Fractogel-gebundenen Peptide wurde gewählt, da mit der von Auger *et al.* beschriebenen Methode der HSP70-Bindung an Sepharose-gebundene Peptide und anschließender Detektion gebundenen Proteins mittels SDS-PAGE und Coomassie-Färbung keine ausreichende HSP-Bindung erreicht wurde. Durch die tentakelartige Oberfläche, das Einfügen eines "spacers" und die direkte Synthese der Peptide auf die Matrix wird bei Fractogel-gebundenen Peptiden eine sehr hohe Dichte korrekt ausgerichteter und sehr beweglicher Peptide erreicht (s. 3.1). An die Peptide gebundenes HSP70 wurde eluiert und nach Auftrennung mittels SDS-PAGE durch Silberfärbung detektiert (s. 3.3).

#### 4.1.1 Interaktion von HSP70-Molekülen mit 5 AS langen Peptidsequenzen aus der HV3-Region von HLA-DR: Nichtbindung nur für das Peptid mit der Sequenz <sup>70</sup>DERAA<sup>74</sup>

Für diese Experimente wurde die Interaktion von Peptidsequenzen aus der HV3-Region von HLA-DRB1-Molekülen mit HSP70-Molekülen untersucht. Die Fractogel-gebundenen Peptide repräsentierten jeweils die AS-Sequenz der Position 70 bis 74 aus der  $\beta$ -Kette eines HLA-DR-Moleküls. Alle natürlicherweise in HLA-DR-Molekülen vorkommenden HV3-Sequenzen wurden auf ihre HSP70-Affinität getestet. Die Bindungsexperimente wurden mit drei verschiedenen HSP70-Molekülen durchgeführt: mit DnaK, dem auch von Auger *et al.* (1996) verwendeten HSP70-Molekül aus *E.coli*, sowie dem humanen, stress-induzierbaren Hsp70 und dem konstitutiv exprimierten Hsc70. Abb. 4.1 zeigt die Interaktion von DnaK, Hsc70 und Hsp70 mit den in der HV3-Region von HLA-DRB1 vorkommenden Peptidsequenzen.

**Abb. 4.1:**

Bindung von drei verschiedenen HSP70-Molekülen (DnaK, Hsc70 und Hsp70) an 5 AS lange Fractogel-gebundene Peptidfragmente aus der HV3-Region von HLA-DR-Molekülen. Die Fractogel-Säulen wurden mit 6 µg DnaK, Hsc70 oder Hsp70 über Nacht bei 4 °C in PBS inkubiert. Nach dem Waschen wurde gebundenes HSP bei pH2 eluiert. Das Eluat wurde lyophilisiert, durch Gelelektrophorese aufgetrennt und das HSP mittels Silberfärbung detektiert.

Sequenzen der Peptidfragmente, jeweils mit einem Beispiel für ein korrespondierendes HLA-DR-Molekül (Marsh 1998):

**A)** QKRAA (DRB1\*0401), QRRAA (DRB1\*0101), RRRAA (DRB1\*1001), DRRAA (DRB1\*1601), DERAA (DRB1\*0402), RRRAE (DRB1\*0901), QRRAE (DRB1\*0403), DRRAL (DRB1\*0801).

Peptidsequenzen, die das SE enthalten sind in der Abb. mit \* markiert.

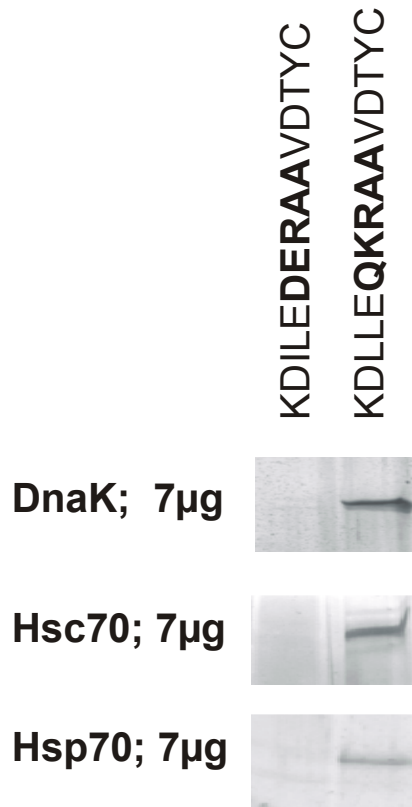
**B)** QARAA (DRB1\*1501), DRAAA (DRB1\*1603), QKRGR (DRB1\*0422), DRRGQ (DRB1\*0701).

Eine Bande auf dem Gel bedeutet dabei, dass das HSP70-Molekül an das Peptid auf dem Fractogel gebunden hat und nach Elution und Gelelektrophorese mit anschließender Silberfärbung detektiert werden konnte. Für alle drei getesteten HSP70-Proteine wurde ein weitgehend übereinstimmendes Bindungsmuster an die HLA-DR-Peptidfragmente gefunden. Dieses Muster wich von der Literatur (Auger *et al.* 1996) ab, in der nur für HLA-DR-Peptidfragmente aus RA-assoziierten HLA-DR-Molekülen, die das SE enthalten, eine Affinität an DnaK beschrieben wurde. Mit der hier verwendeten Methode konnte neben den SE-Peptidsequenzen auch für die meisten anderen Peptidsequenzen aus der HV3-Region von HLA-DRB1-Molekülen eine HSP70-Bindung gezeigt werden. Einzig für das Peptid mit der Sequenz <sup>70</sup>DERAA<sup>74</sup> wurde keine HSP70-Affinität gefunden. Interessanterweise wird die Sequenz <sup>70</sup>DERAA<sup>74</sup> ausschließlich in der HV3-Region von HLA-DRB1-Molekülen gefunden, für die eine Protektion vor RA beschrieben wurde (z. B. DRB1\*0402, 1301, 1302, s. 1.3.1). Wiederholte Experimente, auch mit neu synthetisierten Fractogel-Säulen, zeigten niemals eine Affinität des <sup>70</sup>DERAA<sup>74</sup>-Peptides an eines der drei untersuchten HSP70-Moleküle. Daneben wurde nur für die Peptidsequenz <sup>70</sup>DRAAA<sup>74</sup> aus HLA-DRB1\*1603, einem Allel mit nur geringer Auftrittshäufigkeit in der Bevölkerung, eine erniedrigte Affinität zu Hsp70 und Hsc70 gefunden.

#### **4.1.2 Interaktion von HSP70-Molekülen mit 15 AS langen Fractogel-gebundenen Peptidsequenzen: Bestätigung der Ergebnisse mit den 5 AS langen Peptiden**

Für die Bindung an HSP70-Moleküle sind Peptidsequenzen von vier bis fünf AS entscheidend (s. 1.6). Die in 4.1.1 verwendeten Peptide hatten eine ausreichende Länge von 5 AS. Da aber auch den das Bindungsmotiv flankierenden Sequenzen eine Bedeutung zukommen kann, wurde untersucht, ob die differentielle HSP70-Bindung auch für längere Peptidsequenzen aus HLA-DR-Molekülen gilt. Es wurden Bindungsversuche mit 15 AS langen Fractogel-gebundenen Peptiden wiederholt, die Position 65 bis 79 aus einem SE-positiven, RA-assoziierten HLA-DR (<sup>65</sup>KDLLE**QKRAA**VDTYC<sup>79</sup>, z. B. DRB1\*0401) bzw. einem RA-protectiven HLA-DR-Molekül (<sup>65</sup>KDILE**DERAA**VDTYC<sup>79</sup>, z. B. HLA-DRB1\*0402) repräsentierten. Abb. 4.2 zeigt die Interaktion von DnaK, Hsc70 und Hsp70 mit diesen verlängerten Peptiden. Auch hier konnte dasselbe Muster wie für die kurzen Peptide gezeigt werden: Alle

drei HSP70-Moleküle interagierten mit der  $^{70}\text{QKRAA}^{74}$ -Peptidsequenz aus RA-assoziierten HLA-DR-Molekülen, nicht aber mit der  $^{70}\text{DERAA}^{74}$ -Sequenz aus den Protektion vermittelnden HLA-DR-Molekülen.



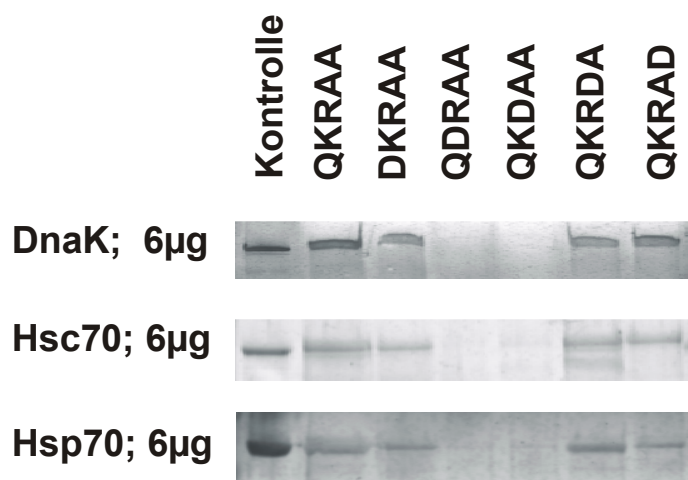
**Abb. 4.2**

Interaktion von DnaK, Hsc70 und Hsp70 mit 14 AS langen Fractogel-gebundenen Peptiden. Die Peptide  $^{65}\text{KDILEDERAAVDTYC}^{79}$  (z. B. aus dem RA-protectiven DRB1\*0402) und  $^{65}\text{KDLLEQKRAAVDTYC}^{79}$  (z. B. aus dem RA-assoziierten, SE-positiven DRB1\*0401) wurden mit 7 µg Protein inkubiert. Experimentelle Bedingungen wie in Abb. 4.1.

Um die Möglichkeit von unspezifischen Ion-Ion Wechselwirkungen zwischen geladenen Aminosäureresten der Peptide und der HSPs auszuschließen, wurde ein Versuch mit einem Waschpuffer durchgeführt, der eine extrem hohe Salzkonzentration enthielt (Fractogel-Waschpuffer mit zusätzlich 1M NaCl), um eventuelle unspezifische Wechselwirkungen aufzuheben. Auch dieser Versuch führte zum gleichen Ergebnis (Daten nicht gezeigt), womit unspezifische Wechselwirkungen als Ursache der HSP:Peptid-Interaktion ausgeschlossen werden konnten.

### 4.1.3 „Asparaginsäure-Scan“: Negativ geladene Seitenketten an Position 71 und 72 verhindern die HSP70:Peptid-Interaktion

Es ist auffällig, dass die Aminosäuresequenz  $^{70}\text{DERAA}^{74}$  als einzige aller untersuchten Sequenzen in Position  $\beta 70$  und  $\beta 71$  der HLA-DR  $\beta$ -Kette zwei Aminosäuren mit negativ geladenen Seitenketten besitzt (D, Asparaginsäure und E, Glutaminsäure). Im Gegensatz hierzu besitzt beispielsweise das SE-Motiv  $^{70}\text{QKRAA}^{74}$  in Position 71 eine AS mit positiv geladener Seitenkette (K, Lysin). Daher liegt die Vermutung nahe, dass das Nicht-Binden der Peptide durch die negativ geladenen AS-Seitenketten beeinflusst wird. Es wurden modifizierte  $^{70}\text{QKRAA}^{74}$ -Peptide synthetisiert, bei denen jeweils eine Aminosäure durch die negativ geladene Asparaginsäure ersetzt wurde („Asparaginsäure-Scan“, s. Abb. 4.3). Es konnte gezeigt werden, dass negativ geladene Aminosäuren an Position 2 und 3 der Peptide (entspricht Position  $\beta 71$  und  $\beta 72$  der HLA-DR  $\beta$ -Kette) eine Interaktion mit allen drei Hitzeschockproteinen verhindern können.



**Abb. 4.3**

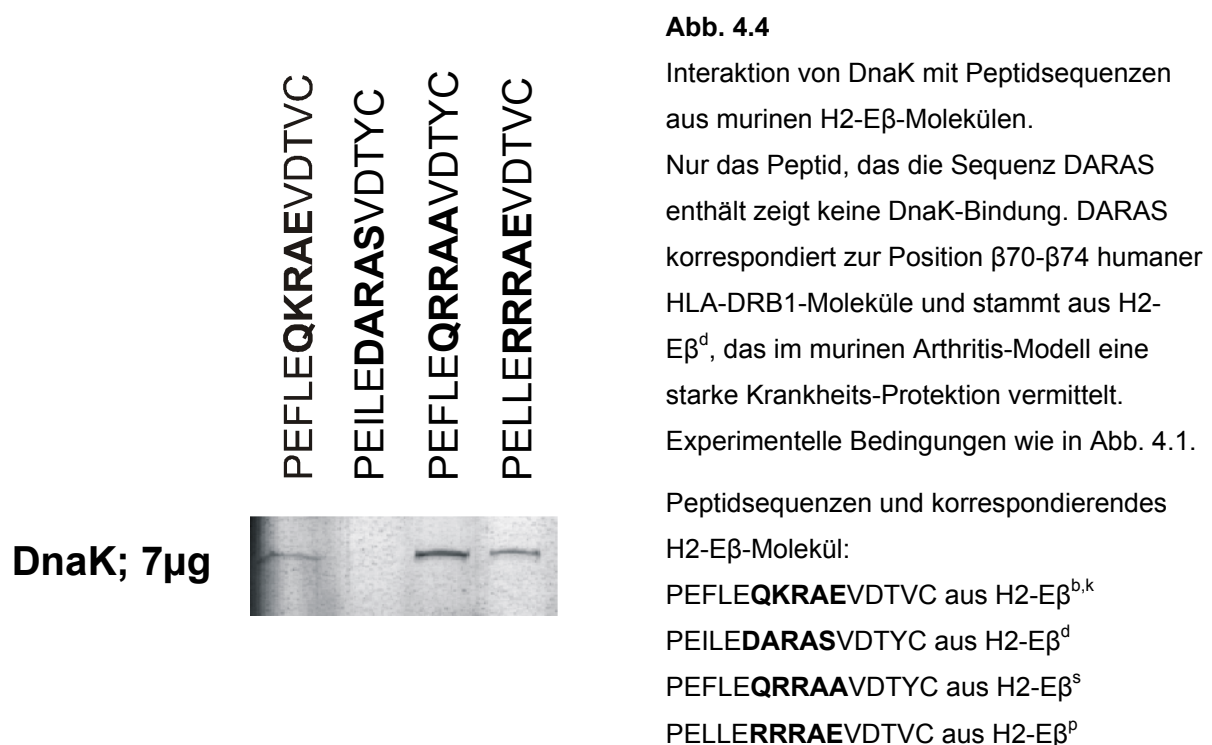
„Asparaginsäure-Scan“:

Interaktion von DnaK, Hsc70 und Hsp70 mit modifizierten SE-Peptiden, die nicht natürlich in der HV3-Region von HLA-DR vorkommen. Dazu wurde Peptide synthetisiert, bei denen jeweils eine Position der SE-Sequenz  $^{70}\text{QKRAA}^{74}$  durch Asparaginsäure (D, besitzt eine negativ geladene Seitenkette) ersetzt wurde. Peptide mit Asparaginsäure in Position  $\beta 71$  und  $\beta 72$  binden keines der untersuchten HSP70-Moleküle. Experimentelle Bedingungen wie in Abb. 4.1.

#### 4.1.4 Im murinen Arthritis-Modell protektive Sequenzen zeigen ebenfalls keine Interaktion mit HSP70

Den humanen HLA Klasse II-Molekülen entsprechen im Mausmodell die H2-A und H2-E Moleküle, wobei die E $\beta$ -Kette homolog zum humanen HLA-DRB1-Molekül ist. Mäuse mit dem Haplotyp H2-A<sup>q</sup> und H2-A<sup>r</sup> sind anfällig für collagen-induzierte Arthritis (CIA), einem murinen Arthritis-Modell. Ähnlich der humanen RA ist die Erkrankung mit prädisponierenden und protektiven MHC II-Molekülen assoziiert, H2-E $\beta$ <sup>d</sup> vermittelt dabei Protektion vor der Erkrankung. Dieses murine MHC II-Molekül besitzt die AS-Sequenz DARAS an der Position, die der HV3-Region humaner HLA-DRB1-Moleküle entspricht.

Die Interaktion von DnaK mit 15 AS langen Fractogel-gebundenen Peptidsequenzen aus H2-E $\beta$ -Molekülen wurde untersucht. Die murinen Peptidsequenzen korrespondierten dabei mit den humanen Sequenzen, die die HV3-Region enthalten. Abb. 4.4 zeigt, dass nur das Peptid mit der Sequenz DARAS (aus H2-E $\beta$ <sup>d</sup>) nicht mit DnaK interagiert, während für die restlichen drei untersuchten Sequenzen eine DnaK-Interaktion gefunden wurde. In Analogie zur humanen RA zeigt auch im murinen Modell die Peptidsequenz aus dem MHC II-Molekül, das mit starker Krankheits-Protektion assoziiert ist, keine Affinität zu HSP70.





## 4.2 Quantitative Bindungsuntersuchungen mit HSP70 und HLA-DR-Peptidfragmenten im Europium-Fluoreszenz-Assay

Mit den Fractogel-gebundenen HLA-DR Peptiden ist es nur möglich, qualitative Aussagen über das Bindungsverhalten der Peptide an HSP70 zu machen. Daher wurde eine Methode etabliert, die quantitative Bindungsmessungen der Peptide an HSP70 ermöglicht. Hierzu wurde die Methode des Europium-Fluoreszenz-Assays (s. 3.5) gewählt. Aufwändigere Verfahren wie die Bindungsmessung mittels HPLC, Massenspektrometrie oder BIAcore (quantitative Oberflächenplasmonresonanz-Messungen mittels proteinbeschichteter Chips) sind mit erheblichem apparativen Aufwand verbunden und in unserem Labor nicht durchführbar. Beim Europium-Fluoreszenz-Assay handelt es sich um ein dem ELISA verwandtes, aber sensitiveres Verfahren (s. 3.5). Es wurden freie (nicht Fractogel-gebundene) Biotin-markierte HLA-DR-Peptidfragmente mit HSP70 vorinkubiert, die Hsp:Peptid-Komplexe wurden an eine mit Antikörper beschichtete Platte gebunden und nach Inkubation mit Europium-Streptavidin konnte die resultierende Fluoreszenz quantifiziert werden.

### 4.2.1 Methodische Ergebnisse: Optimierung des Europium-Fluoreszenz-Assays

#### 4.2.1.1 Auswahl des Indikatorpeptides, Bindungspuffer und Inkubationszeiten

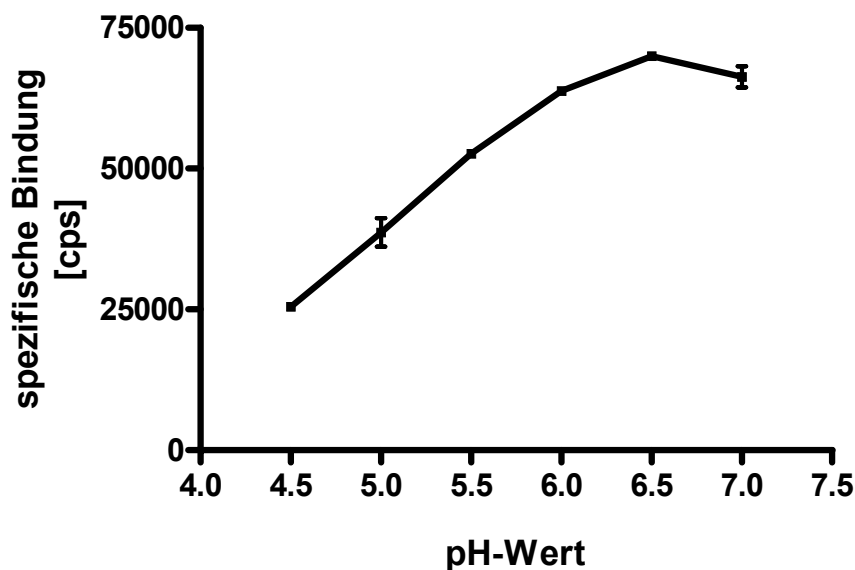
Erste positive Resultate wurden mit DnaK und einem biotinylierten Peptid mit der Sequenz <sup>65</sup>KDFLE**DRRAL**VDT<sup>77</sup> (aus HLA-DRB1\*0801) erhalten. Allerdings waren die erhaltenen Messwerte sehr niedrig, daher wurden für diese Versuche nach einem Waschschrift die gebundenen Peptide mittels Glutaraldehyd an DnaK fixiert, wodurch höhere Messwerte erhalten wurden. Des Weiteren wurden Bindungsexperimente mit weiteren biotinylierten Peptiden durchgeführt. Für biotinyliertes CLIP<sub>105-117</sub>-Peptid (<sup>105</sup>SKMRMATPLLMQA<sup>117</sup>) wurde ebenfalls eine Affinität zu DnaK gefunden, dieses Peptid führte zu höheren Messwerten als das HLA-DRB1\*0801-Peptidfragment. Auf eine Fixierung gebundener Peptide mit Glutaraldehyd konnte in Experimenten mit Biot-CLIP<sub>105-117</sub> verzichtet werden.

Als Inkubationsbedingungen für die HSP:Peptid-Komplexe wurde eine Inkubation über Nacht (ca. 18 h) bei 37 °C (Thermoschüttler) gewählt. Kürzere Inkubationszeiten und Inkubationen bei niedrigeren Temperaturen ergaben

schlechtere Resultate (Daten nicht gezeigt). Beim Test von verschiedenen Bindungspuffern wurden die besten Ergebnisse in normalem PBS erzielt, in dem auch schon die Fractogel-Experimente durchgeführt wurden.

#### **4.2.1.2 pH-Optimum der HSP70-Interaktion mit HLA-DR-Peptidfragmenten im Neutralen**

Mit dem Europium-Fluoreszenz-Assay konnte das pH-Optimum der HSP70-Peptid-Interaktion bestimmt werden. Dazu wurde DnaK mit Biotin-markiertem HLA-DRB1\*0801-Peptid in Phosphatpuffern mit verschiedenen pH-Werten vorinkubiert. Das pH-Optimum der HSP:Peptid-Interaktion wurde ca. bei pH 6,5 gefunden, also bei fast neutralem pH (Abb. 4.5). Bei erniedrigten pH-Werten nahm die Bindung deutlich ab.

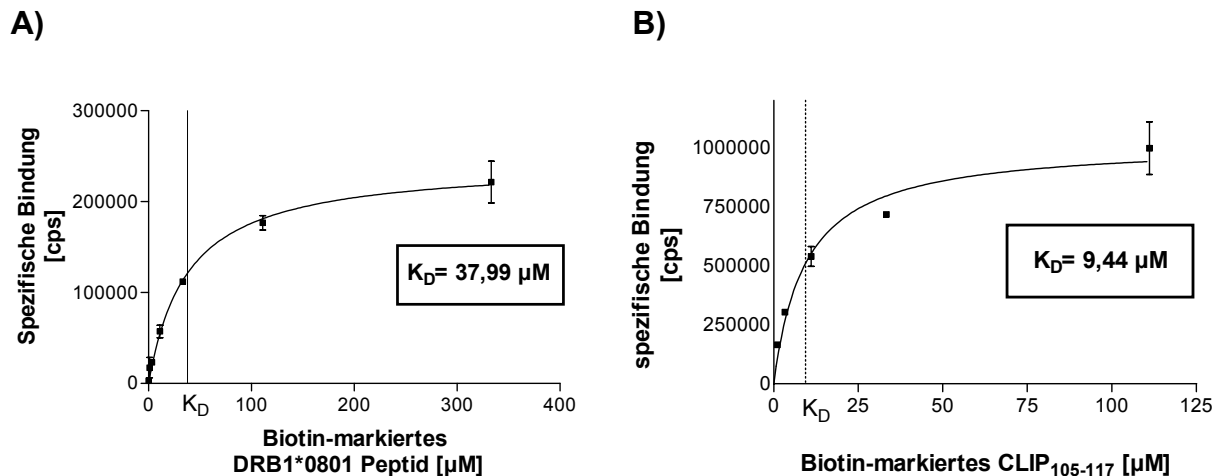


**Abb. 4. 5**

Inkubation von 10 µg/ml DnaK (0,15 µM) mit 10 µg/ml Biot-DRB1\*0801-Peptid (5,5 µM) in Phosphatpuffern mit unterschiedlichen pH-Werten. Das Optimum der DnaK:Peptid-Bindung wurde ca. bei pH 6,5 gefunden, die Bindung nimmt bei erniedrigten pH-Werten stark ab.

#### 4.2.2 Quantitative Bindungsuntersuchungen mit DnaK und einem HLA-DRB1\*0801-Peptidfragment: gefundener $K_d$ -Wert von 30 $\mu\text{M}$

Abb. 4.6 A zeigt ein Sättigungsexperiment mit DnaK und verschiedenen Konzentrationen des Biotin-markierten HLA-DRB1\*0801-Peptidfragmentes  $^{65}\text{KDFLEDRRALVDT}^{77}$ . Die Bindung des Peptides zeigt ab einer Konzentration von ca. 100  $\mu\text{M}$  Peptid eine Sättigung. Ein wichtiger Parameter, um die Affinität einer Interaktion zu beschreiben, ist die Gleichgewichts-Dissoziationskonstante ( $K_d$ -Wert). Der  $K_d$ -Wert beschreibt die Konzentration, bei der gebundenes und abdissoziiertes Peptid im Gleichgewicht vorliegen und kann aus der Regressionskurve berechnet werden. Der  $K_d$ -Wert der untersuchten Interaktion wurde in mehreren Experimenten auf durchschnittlich 27,7  $\mu\text{M}$  bestimmt. Dies korreliert gut mit HSP70:Peptidaffinitäten, die in anderen Arbeiten gefunden wurden (Javid *et al.* 2004; MacAry *et al.* 2004; Rudiger *et al.* 1997b). Abb. 4.6 B zeigt zum Vergleich ein Sättigungsexperiment mit DnaK und dem Biotin-markierten CLIP<sub>105-117</sub>-Peptid ( $^{105}\text{SKMRMATPLLMQA}^{117}$ ), für das ein  $K_d$ -Wert von < 10  $\mu\text{M}$  berechnet wurde.



**Abb. 4.6**

Sättigungsexperimente im Europium-Fluoreszenz-Assay (Dreifachwerte, Experimentelle Bedingungen s. 3.5.1).

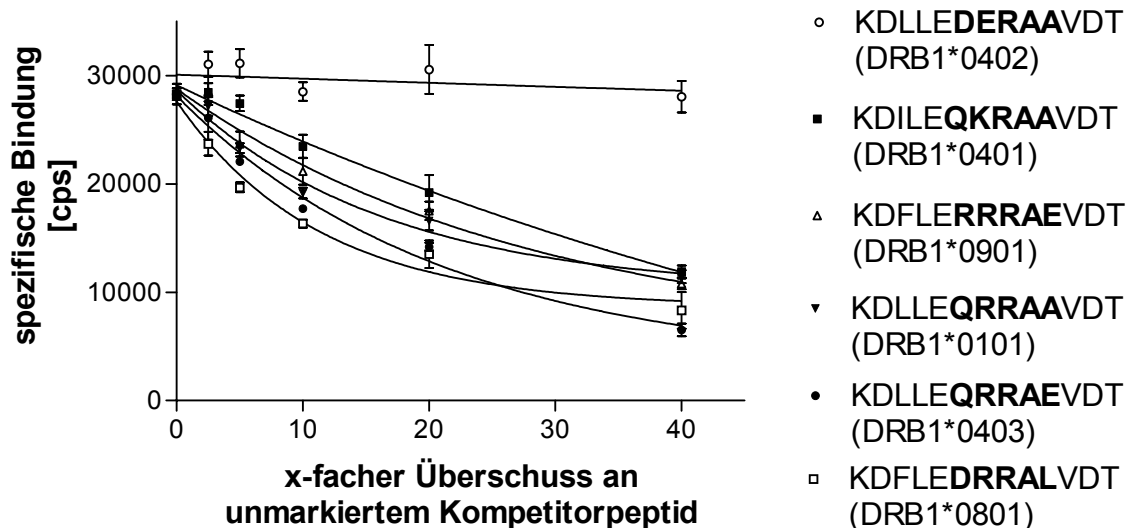
**A)** Interaktion von DnaK mit mit verschiedenen Konzentrationen Biotin-markiertem HLA-DRB1\*0801-Peptid (Biot- $^{65}\text{KDFLEDRRALVDT}^{77}$ ). Gefundener  $K_d$ -Wert der Interaktion in diesem Experiment: 38  $\mu\text{M}$ . In mehreren Experimenten wurde der  $K_d$ -Wert mit durchschnittlich 27,7  $\mu\text{M}$  bestimmt.

**B)** Bindung von biotinyliertem CLIP<sub>105-117</sub> Peptid (Biot- $^{105}\text{SKMRMATPLLMQA}^{117}$ ) an DnaK mit einem gefundenen  $K_d$ -Wert von < 10  $\mu\text{M}$ .

Auswertung mit Graphpad Prism 4.0 (nicht-lineare Regression,  $R^2$  in beiden Experimenten > 0,95).

### 4.2.3 Wettbewerbsversuche mit unmarkierten Peptidfragmenten aus der HV3-Region von HLA-DR. Bestätigung des Bindungsmusters aus den Fractogel-Versuchen

Neben der Sättigung ist ein weiteres Kriterium für die Spezifität der Interaktion eines Moleküls mit seinem Liganden die Konkurrenz der Interaktion durch unmarkierten Liganden im Überschuss. Dazu wurden mit dem Europium-Fluoreszenz-Assay kompetitive Experimente durchgeführt: DnaK (10 µg/ml bzw. 0,15 µM) wurde mit einer fixen Konzentration (1 µg/well, bzw. 11,1 µM) biotinyliertem HLA-DRB1\*0801-Peptid inkubiert. In verschiedenen Proben wurden neben diesem Indikatorpeptid unterschiedliche Überschüsse anderer, nicht biotinylierter Peptidfragmente aus HLA-DRB1 als Konkurrenten zugegeben. Es zeigten fast alle untersuchten unmarkierten HLA-DR-Peptidfragmente eine konzentrationsabhängige Konkurrenz des Indikatorpeptides. Einzige Ausnahme war wie auch schon in den qualitativen Fractogel-Bindungsexperimenten das Peptid mit der <sup>70</sup>DERAA<sup>74</sup>-Sequenz, das ausschließlich in RA-protectiven HLA-DR Molekülen gefunden wird (Abb. 4.7).

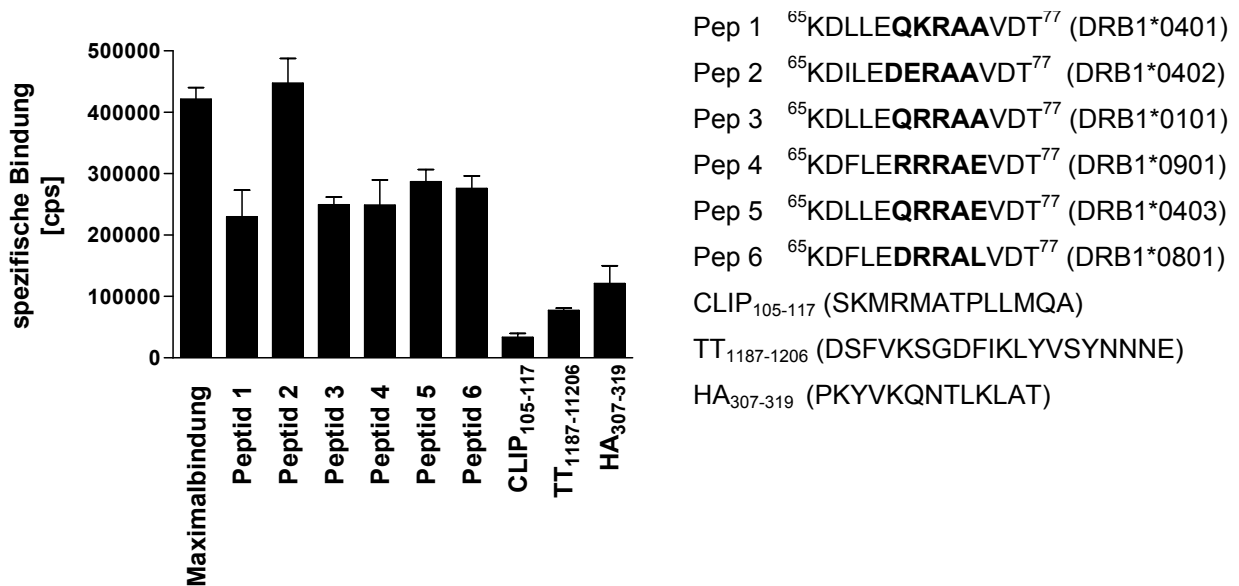


**Abb. 4.7**

Kompetition im Europium-Fluoreszenz-Assay (Experimentelle Bedingungen s. 3.5.1).

Inkubation von 0,15 µM DnaK mit 11,1 µM DRB1\*0801-Biotin-Peptid (Biot-<sup>65</sup>KDFLEDRRALVDT<sup>77</sup>) als Indikatorpeptid. Konkurrenz durch verschiedene Überschüsse unmarkierter Peptide, die die Sequenz  $\beta$ 65-77 aus verschiedenen HLA-DR-Molekülen repräsentieren (Beispiel für ein korrespondierendes HLA-DR-Molekül in Klammern). Alle untersuchten Peptide zeigen eine konzentrationsabhängige Konkurrenz mit Ausnahme des Peptides, das die Sequenz <sup>70</sup>DERAA<sup>74</sup> enthält, die ausschließlich in RA-protectiven HLA-DR-Molekülen wie DRB1\*0402 gefunden wird.

Abb. 4.8 zeigt ein Konkurrenzexperiment mit DnaK und Biot-CLIP<sub>105-117</sub> (2,5 µM) als Indikatorpeptid (keine Fixierung). Unmarkierte HLA-DRB1-Peptidfragmente (Peptid 1 bis 6) wurden in 10-fachem molaren Überschuss zugegeben. Als Kontrollpeptide wurde das unmarkierte CLIP<sub>105-117</sub>-Peptid sowie zwei antigene und immundominante (s. 4.4.3) Peptide aus dem Tetanus-Protein C-Fragment (TT<sub>1187-1206</sub>, DSFVKSGDFIKLYVSYNNNE) und dem Influenzavirusprotein Hämagglutinin (HA<sub>307-319</sub>, PKYVKQNTLKLAT) verwendet, ebenfalls in 10-fachem Überschuss. Auch hier wurde das bereits bekannte Muster gefunden: Konkurrenz durch alle HLA-DRB1-Peptidfragmente mit Ausnahme des Peptides, das nur in protektiven HLA-DRs gefunden wird (z. B. DRB1\*0402, <sup>70</sup>DERAA<sup>74</sup>). Alle anderen HLA-DRB1-Peptide zeigten eine Konkurrenz der Indikatorpeptidbindung auf ungefähr 50 % der Maximalbindung. Sowohl unmarkiertes CLIP<sub>105-117</sub> als auch TT<sub>1187-1206</sub> und HA<sub>307-319</sub> zeigten eine deutlichere Konkurrenz als die HLA-DRB1-Peptidfragmente.



**Abb. 4.8**

Konkurrenzexperiment mit DnaK, Biot-CLIP<sub>105-117</sub>-Peptid und fixem Überschuss unmarkierter Peptide. Bindung von Biot-CLIP<sub>105-117</sub> (Biot-<sup>105</sup>SKMRMATPLLMQA<sup>117</sup>, 2,5 µM) an DnaK (10 µg/ml, entspr. 0,15 µM) entspricht der Maximalbindung.

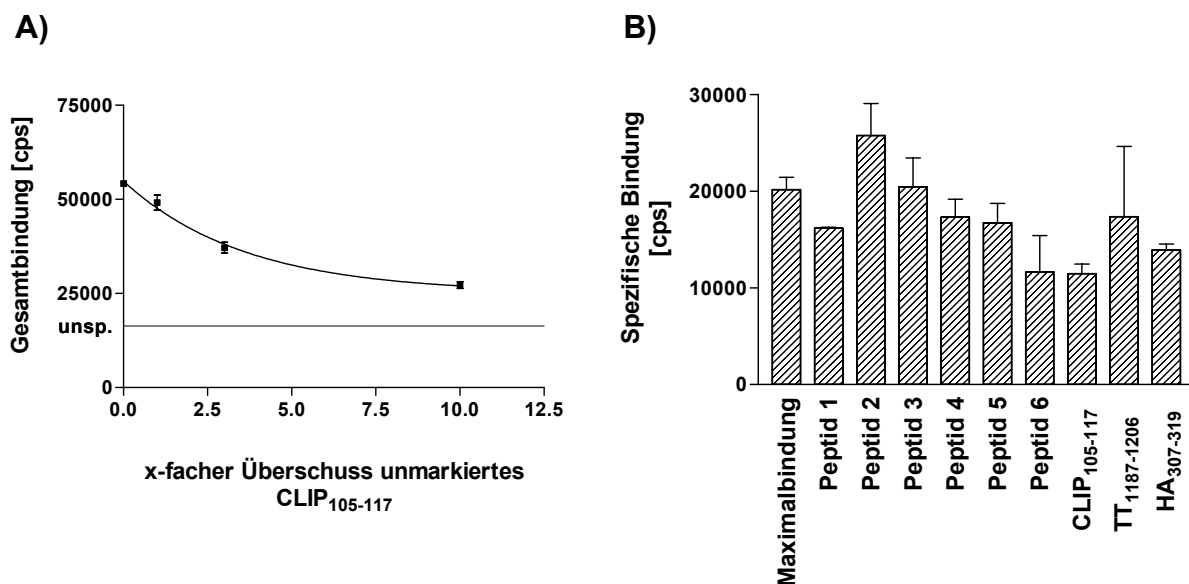
Konkurrenz erfolgte durch 10-fachen molaren Überschuss unmarkierter HLA-DRB1-Peptidfragmente Peptide 1 bis 6. Die HV3-Sequenzen sind fett gedruckt, in Klammern ein Beispiel für ein korrespondierendes HLA-DR-Molekül. Als Kontrollpeptide wurden unmarkiertes CLIP<sub>105-117</sub>, sowie TT<sub>1187-1206</sub> aus Tetanus-Toxin C-Fragment und HA<sub>307-319</sub> aus Hämagglutinin verwendet.

Experimentelle Bedingungen s. 3.5.1, Dreifachwerte, unspezifische Bindung abgezogen.

Nur das HLA-DRB1-Peptid 2 (<sup>70</sup>DERAA<sup>74</sup>) zeigte keine Konkurrenz, die Kontrollpeptide zeigen im Vergleich zu den HLA-DRB1-Peptidfragmenten eine stärkere Konkurrenz.

#### 4.2.4 Bindungsversuche mit humanem Hsp70: geringere Affinität der Peptide, differentielles Bindungsmuster weniger stark ausgeprägt

Für Bindungsversuche mit rekombinantem, humanem Hsp70 war die Affinität der biotinylierten HLA-DRB1-Peptidfragmente trotz Fixierung nicht ausreichend. Daher wurden die Hsp70-Experimente mit dem Biotin-markierten CLIP<sub>105-117</sub>-Peptid (<sup>105</sup>SKMRMATPLLMQA<sup>117</sup>) durchgeführt. Mit Biot-CLIP<sub>105-117</sub> waren Messungen mit Hsp70 möglich, auch wenn die Affinität zu Hsp70 im Vergleich zu DnaK niedriger war. Abb. 4.9 A zeigt die Konkurrenz von 5 µM biotinyliertem CLIP<sub>105-117</sub> durch verschiedene Überschüsse an unmarkiertem CLIP<sub>105-117</sub>. Abb. 4.9 B zeigt die Konkurrenz von biotinyliertem CLIP<sub>105-117</sub> (5 µM) durch einen 10-fachen molaren Überschuss unmarkierter HLA-DRB1-Peptide an Hsp70 (gleiche Durchführung und Kontrollpeptide wie in Abb. 4.8).



**Abb. 4.9**

**A)** Konkurrenz von Biot-CLIP<sub>105-117</sub> (5µM) an Hsp70 (0,5 µg/well, entspr. 0,3 µM) durch verschiedene Überschüsse unmarkiertes CLIP<sub>105-117</sub> (unspezifische Bindung nicht abgezogen)

**B)** Bindung von Biot-CLIP<sub>105-117</sub> (5 µM) an Hsp70 (0,5 µg/well, entspr. 0,3 µM) (=Maximalbindung). Konkurrenz durch 10-fachen molaren Überschuss unmarkierter HLA-DRB1-Peptidfragmente (Peptide 1 bis 6). Unmarkiertes CLIP<sub>105-117</sub>, TT<sub>1187-1206</sub> und HA<sub>307-319</sub> wurden als Kontrollpeptide verwendet. Peptidsequenzen: s. Legende zu Abb. 4.8. Experimentelle Bedingungen s. 3.5.1, Dreifachwerte, unspezifische Bindung wurde abgezogen.

Das Peptidbindungsmuster für Hsp70 war weniger stark ausgeprägt als für DnaK, das Peptid 2 (<sup>70</sup>DERAA<sup>74</sup>) zeigt in den Experimenten ebenfalls keine Konkurrenz.

Für Hsp70 war das Muster weniger ausgeprägt als mit DnaK: Die unmarkierten HLA-DRB1 Peptidfragmente zeigten keine so starke Konkurrenz wie an DnaK, allerdings wurden auch hier die höchsten Messwerte für das Peptid 2 ( $^{70}\text{DERAA}^{74}$ ) aus RA-protectiven HLA-DR-Molekülen (z. B. DRB1\*0402) gefunden, das in keinem Experimente eine Konkurrenz zeigte. In dem hier abgebildeten Experiment zeigt Peptid 3 ( $^{70}\text{QRRAA}^{74}$ , z. B. aus DRB1\*0101) ebenfalls keine Konkurrenz, am ausgeprägtesten war die Konkurrenz für Peptid 6 (z. B. aus DRB1\*0801) und die Kontrollpeptide. Vermutlich ist in diesem Experiment auch der Maximalwert zu niedrig gemessen worden. Der Versuch wurde für die Abbildung ausgewählt, weil er parallel zu dem in Abb. 4.8 gezeigten Experiment mit den gleichen HLA-DR-Peptiden und Kontrollpeptiden durchgeführt wurde.

### **4.3. Bindungsuntersuchungen mit HSP70 und intakten, aus Zelllinien aufgereinigten HLA-DR-Molekülen**

Im nächsten Schritt sollte geklärt werden, ob die gefundene HSP70-HLA-DR-Interaktion auf die Peptidfragmente aus HLA-DRB1 beschränkt ist, oder ob auch ganze HLA-DR-Moleküle mit HSP70 interagieren. Von besonderem Interesse war dabei, ob das mit den Peptiden gefundene differentielle Bindungsmuster bestätigt werden kann.

#### **4.3.1 Methodische Ergebnisse: Optimierung des Europium-Fluoreszenz-Assays für Bindungsuntersuchungen mit intakten HLA-DR-Molekülen**

Die ganzen, intakten HLA-DR-Moleküle wurden, wie im Methodenteil beschrieben, aus EBV-transformierten B-Zelllinien aufgereinigt (s. 3.6.1), zum Teil mit Biotin markiert (s. 3.6.2) und dann ebenfalls im Europium-Fluoreszenz-Assay (s. 3.5) untersucht. Dabei wurden hier jedoch die Mikrotiter-Platten direkt mit den HSP70-Molekülen beschichtet, eine vorherige Beschichtung der Platten mit anti-HSP mAk war nicht notwendig und führte zu niedrigeren Messwerten. Als Blockierungsreagenz wurde BSA (Konzentration: 1-2% in PBS) verwendet. Damit wurde eine unspezifische Bindung erhalten, die in den meisten Experimenten weniger als 10% der Maximalbindung betrug. Andere Blockierungsreagenzien führten z. T. zu deutlich höheren unspezifischen Bindungen. Anschließend wurde die Platte eine Stunde bei 37°C mit den Biotin-markierten HLA-DR-Molekülen inkubiert (bzw. zusätzlich mit

unmarkierten Kompetitormolekülen in kompetitiven Experimenten). Längere Inkubationszeiten resultierten in erhöhter unspezifischer Bindung. Des Weiteren wurde dem Bindungspuffer (meist PBS + 0,02% NaN<sub>3</sub>) 0,05% Tween-20 zugesetzt, um zu gewährleisten, dass die HLA-DR-Moleküle in Lösung bleiben. Versuche mit anderen, oft in Arbeiten mit löslichen MHC-Molekülen benutzten Detergenzien ( $\beta$ -Octyl-D-Glucosid oder NP-40) führten zu schlechteren Ergebnissen. Die hier gezeigten Versuche wurden meist bei neutralem pH durchgeführt. Versuche bei erniedrigten pH-Werten führten zu höheren Messwerten, allerdings erhöhte sich mit Abnahme des pH-Wertes die unspezifische Bindung beträchtlich (Daten nicht gezeigt).

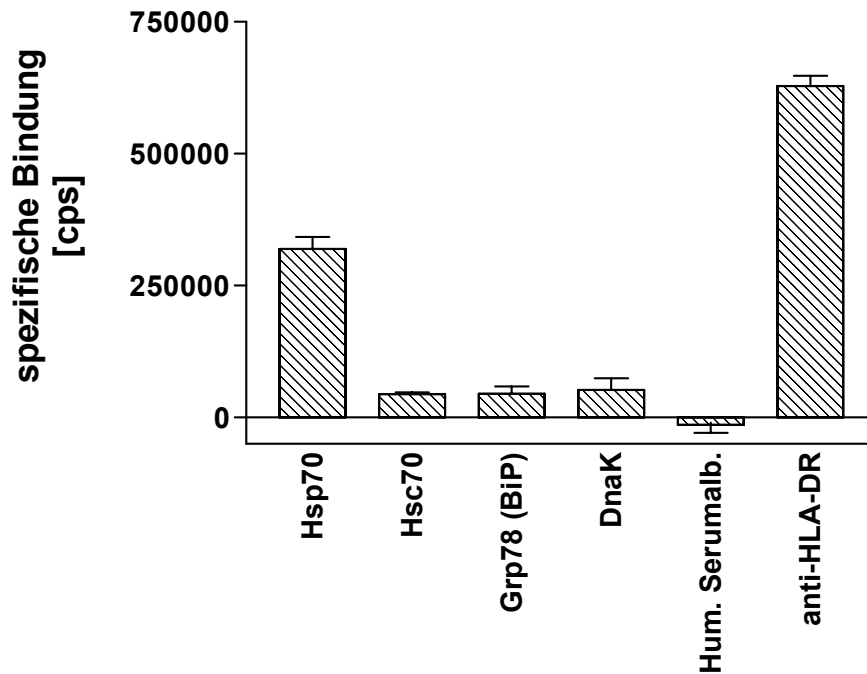
#### **4.3.2 Interaktion ganzer HLA-DR-Moleküle mit verschiedenen HSP70-Molekülen: starke Interaktion mit humanem Hsp70**

Es wurde untersucht, mit welchen HSP70-Molekülen HLA-DR interagiert (Abb. 4.10). Verschiedene HSP70-Moleküle wurden in einer Konzentration von 2,5  $\mu$ g/ml (38  $\mu$ M) über Nacht auf eine Mikrotiterplatte gecoatet und dann mit 60 nM biotinyliertem HLA-DRB1\*0401 inkubiert, einem RA-assoziierten HLA-DR-Molekül, das die SE-Sequenz <sup>70</sup>QKRAA<sup>74</sup> enthält. Als Positivkontrolle für die Bindung intakter HLA-DR-Moleküle diente in diesen Experimenten der monoklonale anti-HLA-DR-Ak L-243, als Negativkontrolle wurde humanes Serumalbumin (HSA) verwendet. Der mAk L-243 erkennt ein nicht-polymorphes Epitop intakter HLA-DR-Dimere (Klohe *et al.* 1988). Durch die Bindung an L-243 konnte gezeigt werden, dass die aufgereinigten Biotin-markierten HLA-DR-Moleküle intakt waren. Denaturierung (10 min 70 °C) der HLA-DR-Moleküle führte zu einer starken Reduktion der Bindung an L-243 (Daten nicht gezeigt).

Untersucht wurde die Interaktion von HLA-DR mit dem zytosolischen stress-induzierbaren Hsp70, dem konstitutiv exprimierten zytosolischen Hsc70, dem aus dem ER stammenden Grp78 (auch als BiP bezeichnet), sowie dem prokaryontischen DnaK aus *E.coli*. Nur für das stress-induzierbare Hsp70 wurde dabei eine starke Interaktion mit HLA-DRB1\*0401 gefunden, die etwa 50 % der Maximalbindung von HLA-DR an den mAk L-243 betrug. Hsc70, Grp78 und DnaK zeigten eine schwache Affinität zu HLA-DR, die nur zu geringfügig höheren Messwerten als die Negativkontrolle (HSA) führte. In Experimenten mit dem Biotin-markierten HLA-



DRB1\*0801-Molekül ( $^{70}\text{DRRAL}^{74}$ , nicht RA-assoziiert) wurden vergleichbare Ergebnisse wie mit DRB1\*0401 erhalten (starke Affinität nur zu Hsp70, Daten nicht gezeigt).



**Abb. 4.10**

Europium-Fluoreszenz-Assayessenz-Test mit aufgereinigtem, Biotin-markiertem HLA-DRB1\*0401 (60 nM).

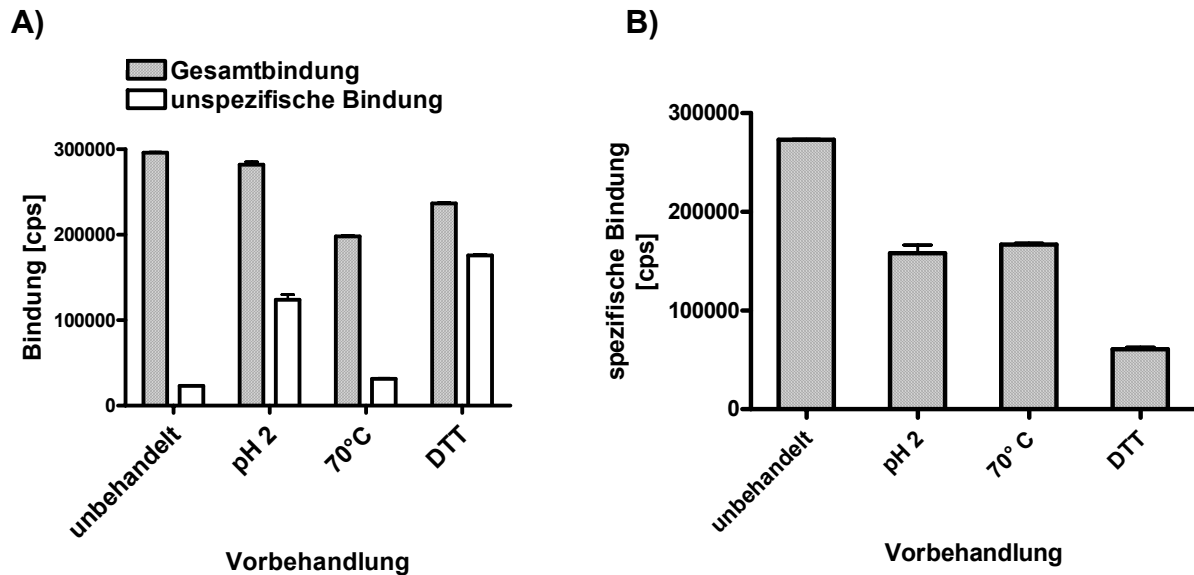
Verschiedene HSP70-Proteine, Humanes Serumalbumin (Kontrollprotein) und der anti-HLA-DR mAk L-243 (Positivkontrolle) wurden über Nacht auf die Platte gecoatet (38 nM bzw. 2,5 µg/ml). Nach Blockierung (2 % BSA) erfolgte die Inkubation mit 60 nM (3,9 µg/ml) Biotin-markiertem HLA-DRB1\*0401 (1h, 37°C). Weitere experimentelle Bedingungen s. 3.5.2.

Hsp70 zeigt die stärkste Affinität zu HLA-DRB1\*0401.

### 4.3.3 Intakte, nicht aber denaturierte HLA-DR-Moleküle interagieren spezifisch mit HSP70-Molekülen

Abb. 4.11 zeigt, dass durch Denaturierung der intakten HLA-DR Moleküle unter verschiedenen Bedingungen (erniedrigter pH, Erhitzen, Zugabe von SDS) die Bindung an Hsp70 abnimmt, während die unspezifische Bindung an das Blockierungsreagenz BSA zunimmt. Die spezifische Bindung nahm unter allen denaturierenden Bedingungen ab. Dieses Ergebnis zeigt, dass nur intakte HLA-DR-

Moleküle spezifisch mit Hsp70 interagieren. Die Interaktion ist kein Effekt einer unspezifischen Bindung von HSP70 an hydrophobe Anteile partiell denaturierter HLA-DR-Moleküle.



**Abb. 4.11**

Bindung von aufgereinigtem, Biotin-markiertem HLA-DRB1\*0401 (8 nM bzw. 0,5 µg/ml) an plattengebundenen HSP70 (30 nM bzw. 2 µg/ml). Die HLA-DR-Moleküle wurden z. T. vor der Inkubation unter verschiedenen denaturierenden Bedingungen vorbehandelt:

pH 2: HLA-DR-Moleküle 1 h bei pH 2, dann Neutralisierung mit Tris/HCl

70°C: 10 min im Thermomixer bei 70°C

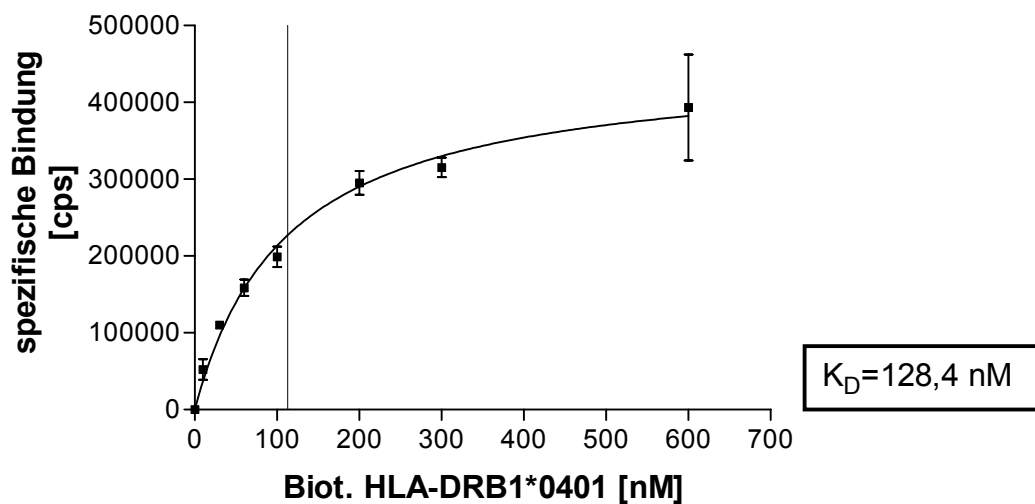
DTT: DTT (15,5 mg/ml, m/V) zum Bindungspuffer zugegeben und 10 min im Thermomixer bei 70°C

**A)** Unter denaturierenden Bedingungen wurde eine Zunahme der unspezifischen Bindung (pH2, DTT) bzw. eine Abnahme der Gesamtbindung (70 °C).

**B)** Die spezifische Bindung (Gesamtbindung minus unspezifische Bindung) der Daten aus Abb. 4.11 A ist dargestellt. Die spezifische Bindung nimmt unter allen denaturierenden Bedingungen ab.

#### 4.3.4 Die Hsp70-HLA-DR-Interaktion besitzt einen gefundenen $K_D$ -Wert von ca. 100 nM

Abb. 4.12 zeigt die Interaktion von aufgereinigtem, biotinyliertem HLA-DRB1\*0401 mit plattengebundenem Hsp70 in einem Sättigungsexperiment. Die Bindung des intakten HLA-DR-Moleküls war sättigbar und hat mit einem gefundenen  $K_D$ -Wert von ca. 130 nM eine viel stärkere HSP70-Affinität als die HLA-DR-Peptidfragmente (s. 4.2.2). In mehreren Experimenten wurde ein durchschnittlicher  $K_D$ -Wert von ungefähr 100 nM für die Interaktion von Hsp70 mit HLA-DRB1\*0401 bestimmt.

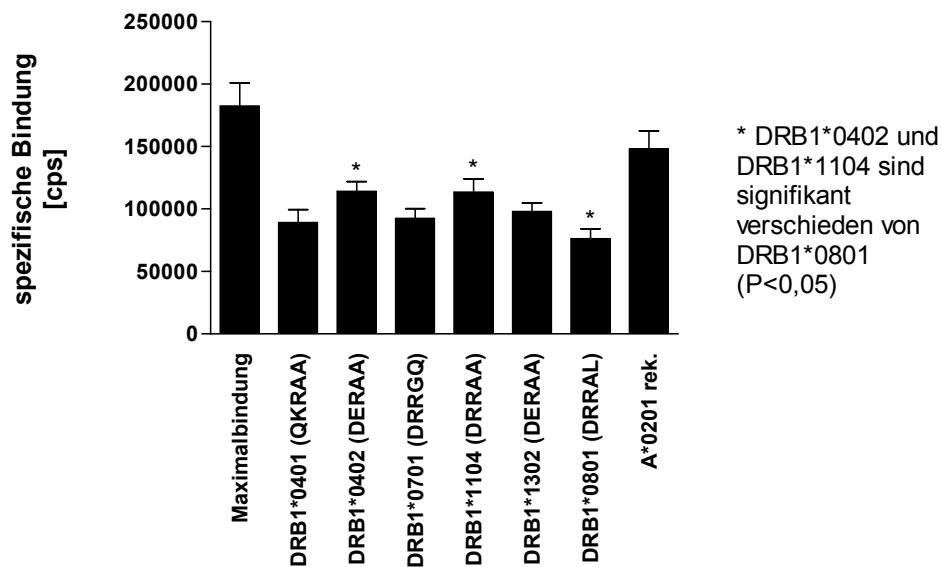


**Abb. 4.12**

Sättigungsbindung von HLA-DRB1\*0401 ( $^{70}\text{QKRAA}^{74}$ ) an Hsp70 im Europium-Fluoreszenz-Assay. Coating: Rekombinantes, humanes Hsp70 (ca. 80 nM bzw. 5  $\mu\text{g/ml}$ ), Blockierung: 2 % BSA in PBS, Inkubation: verschiedene Konzentrationen HLA-DRB1\*0401 Biotin-markiert (1 h bei 37 °C). Sonstige experimentelle Bedingungen wie in 3.5.2 beschrieben, Dreifachwerte. Der  $K_D$ -Wert wurde in diesem Experiment mit 128 nM bestimmt.

#### 4.3.5 Konkurrenz durch unmarkierte HLA-DR-Moleküle: keine signifikanten Unterschiede zwischen den verschiedenen HLA-DR-Varianten

In Analogie zu den Versuchen mit den HLA-DR-Peptidfragmenten wurden auch mit den ganzen HLA-DR-Molekülen Wettbewerbsversuche mit einem Überschuss an unmarkierten Molekülen durchgeführt. Nach Vorversuchen wurde dabei ein zehnfacher Überschuss für diese Experimente gewählt (Daten nicht gezeigt). Abb. 4.13 zeigt die Konkurrenz von 60 nM biotinyliertem HLA-DRB1\*0401 durch unmarkierte HLA-DR-Moleküle in 10-fachem Überschuss.



**Abb. 4.13**

Konkurrenz von 60 nM Biotin-markiertem HLA-DRB1\*0401 durch verschiedene unmarkierte HLA-DR-Moleküle in 5-fachem Überschuss. Bindung erfolgte an 40 nM rekombinantes Hsp70. Das rekombinante HLA-Klasse I-Molekül HLA-A\*0201 wurde als Kontrollprotein verwendet. In Klammern ist die Sequenz der HV3-Region der HLA-DR-Moleküle angegeben (AS-Positionen  $\beta$ 70-74). Sonstige experimentelle Bedingungen wie in 3.5.2 beschrieben.

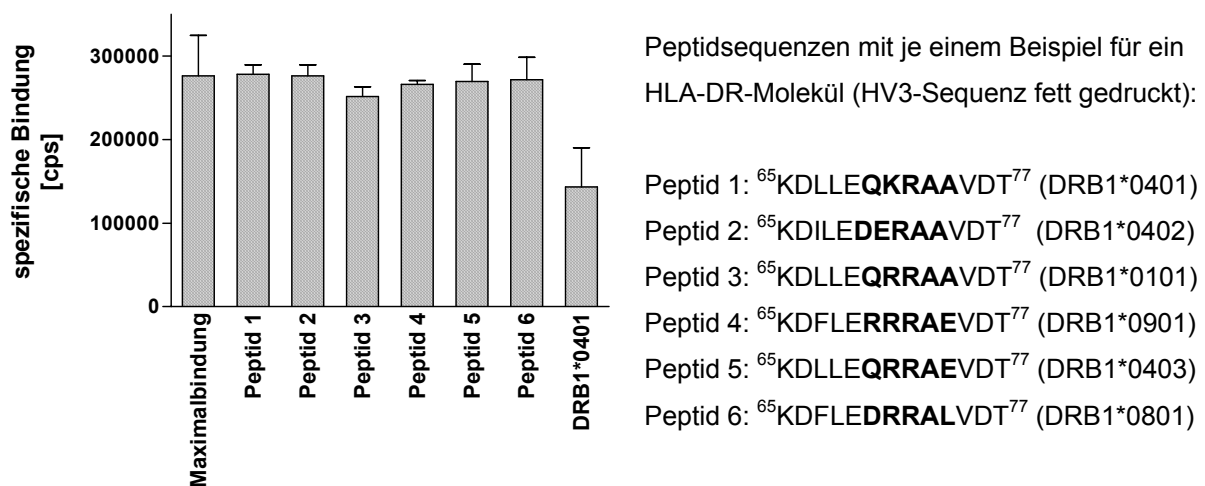
Alle getesteten HLA-DR-Moleküle zeigen eine Konkurrenz, nur zwischen wenigen allelischen Varianten wurden signifikante Unterschiede gefunden.

Als Kontrollprotein diente ein rekombinant hergestelltes nicht-biotinyliertes MHC I-Verfügung gestellt von Dr. Steffen Walter), das die geringste Konkurrenz zeigte. Zwischen den verschiedenen allelischen Varianten gab es zwar geringe Unterschiede in ihrer Konkurrenzkraft, die auch in den einzelnen Experimenten

reproduzierbar waren. Das als RA-protektiv beschriebene HLA-DRB1\*0402 (<sup>70</sup>DERAA<sup>74</sup>) zeigte zwar in den meisten Experimenten die geringste Konkurrenz, jedoch waren die gefundenen Unterschiede zwischen den verschiedenen HLA-DR-Molekülen geringer als bei den Peptidfragmenten und nicht in allen Experimenten statistisch signifikant ( $P < 0,05$ ).

#### 4.3.6 Die Interaktion zwischen HLA-DR und HSP70 kann nicht durch Peptidfragmente aus der HV3-Region von HLA-DR kompetitiert werden.

Falls ganze HLA-DR-Moleküle nur über die AS-Sequenz der HV3-Sequenz mit der Peptidbindungsstelle von Hsp70 interagieren, sollte sich die Interaktion von HLA-DR-Molekülen mit Hsp70 durch einen Überschuss an HLA-DR-Peptidfragmenten kompetitieren lassen. Abb. 4.14 zeigt den Versuch, die Interaktion zwischen biotinyliertem HLA-DRB1\*0401 (60 nM) und Hsp70 (40 nM) durch einen 250-fachen Überschuss (11  $\mu$ M) an Peptidfragmenten aus der HV3-Region von HLA-DRB1-Molekülen zu verdrängen.



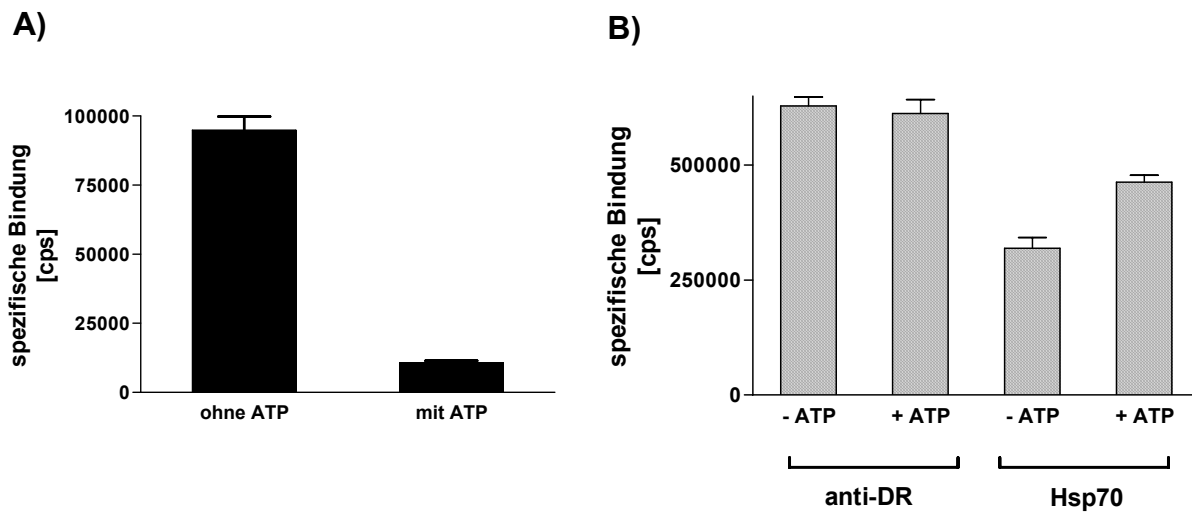
**Abb. 4.14**

Bindung von 60 nM Biotin-markiertem HLA-DRB1\*0401 an 40 nM Hsp70 (=Maximalbindung) und Konkurrenz durch HLA-DR-Peptidfragmente (15  $\mu$ M, 250-facher Überschuss) bzw. unmarkiertes HLA-DRB1\*0401-Molekül in 5-fachem Überschuss (300 nM). Experimentelle Bedingungen s 3.5.2. Die HLA-DR-Peptidfragmente umfassen die HV3-Sequenzen verschiedener HLA-DR-Moleküle. Keines der HLA-DR-Peptidfragmente zeigt in 250-fachem Überschuss eine signifikante Konkurrenz der Hsp70-HLA-DRB1\*0401-Interaktion. Das unmarkierte HLA-DRB1\*0401-Molekül zeigt in nur 5-fachem Überschuss bereits eine starke Konkurrenz.

Weder durch Peptidsequenzen aus RA-protektiven (z. B. aus DRB1\*0402, Peptid 2), noch durch Peptidsequenzen aus RA-assoziierten (z. DRB1\*0401, Peptid 1) wurde die Interaktion zwischen HLA-DRB1\*0401 und Hsp70 beeinflusst. Die Zugabe des aufgereinigten, unmarkierten HLA-DRB1\*0401-Moleküls in nur 5-fachem Überschuss zeigte hingegen eine deutliche Konkurrenz. Die Tatsache, dass durch keines der Peptide in diesem hohen Überschuss eine signifikante Konkurrenz erreicht wurde, ist ein Indiz dafür, dass die Interaktion der ganzen HLA-DR-Moleküle mit Hsp70 nicht, oder nicht ausschließlich, durch die HV3-Region bewirkt wird.

#### **4.3.7 Die Hsp70-Interaktion der HLA-DR-Peptidfragmente ist ATP-abhängig, die Interaktion der ganzen HLA-DR-Moleküle wird durch ATP nicht beeinflusst.**

Hsp70 und andere HSP-Moleküle der 70 kDa Klasse geben unter Hydrolyse von ATP zu ADP und Phosphat die gebundenen Peptide wieder ab (s. 1.6). Die Zugabe eines Überschusses an ATP zum Bindungspuffer inhibiert daher die Peptidbindung an HSP70-Moleküle. Abb. 4.15 A zeigt, dass die Bindung eines biotinylierten HLA-DR-Peptidfragmentes an Hsp70 durch Zugabe von 2 mM ATP zum Bindungspuffer weitgehend verhindert wird. Im Gegensatz hierzu zeigt Abb. 4.15 B, dass die Interaktion von intaktem biotinyliertem HLA-DRB1\*0401 und Hsp70 bzw. einem anti-HLA-DR mAk durch ATP-Zugabe nicht beeinflusst wird. In den meisten durchgeführten Experimenten wurde die Hsp70-HLA-DR Interaktion durch ATP-Zugabe sogar verstärkt. Diese Experimente sind ein weiteres Argument dafür, dass die Interaktion der ganzen HLA-DR-Moleküle mit HSP70 nicht ausschließlich auf eine Interaktion der HV3-Region mit der Peptidbindungsstelle von HSP70 zu begründen ist.



**Abb. 4.15**

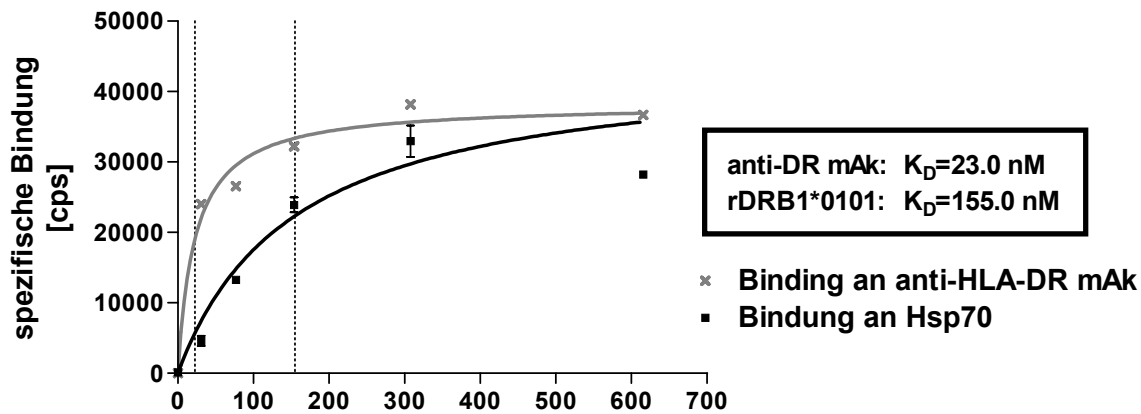
**A)** Bindung von 11  $\mu$ M Biotin-markiertem HLA-DRB1\*0801 Peptidfragment an Hsp70 in Gegenwart oder Abwesenheit von 2 mM ATP. Experimentelle Durchführung wie in 3.5.1 beschrieben. ATP-Zugabe verhindert Peptidbindung an Hsp70.

**B)** Bindung von 60 nM aufgereinigtem, Biotin-markiertem HLA-DRB1\*0401 an anti-DR-Ak bzw. Hsp70 (platten-gebunden, jeweils 40 nM) mit und ohne Zugabe von 2 mM ATP zum Bindungspuffer. Experimentelle Durchführung wie in 3.5.2 beschrieben. Die Zugabe von 2 mM ATP beeinflusst die Interaktion von Hsp70 mit ganzen HLA-DR-Molekülen nicht.

#### 4.3.8 Versuche mit rekombinanten HLA-DR-Molekülen: Hsp70-Affinität ohne signifikantes allelspezifisches Bindungsmuster

Es ist bekannt, dass Hsp70-Moleküle mit einer breiten Palette hydrophober oder positiv geladener Peptidsequenzen interagieren können (Flynn *et al.* 1989; Gragerov und Gottesman 1994; Rudiger *et al.* 1997a). Bei der Aufreinigung der HLA-DR-Moleküle aus Zelllinien wird auch die Transmembran-Domäne mitaufgereinigt, die einen hohen Anteil hydrophober Aminosäurereste besitzt. Um die Möglichkeit auszuschließen, dass Hsp70 mit den hydrophoben Anteilen der Transmembran-Domäne interagiert, wurden Bindungsexperimente mit rekombinanten HLA-DR-Molekülen durchgeführt, die statt der Transmembran-Domäne eine Leucin-Sequenz enthalten (s. 3.12.1). Die  $\beta$ -Kette der Moleküle enthält eine Biotinylierungssequenz, mit der die HLA-DR-Moleküle mit genau einem Molekül Biotin pro HLA-DR-Molekül biotinyliert werden können. Das hat den Vorteil, dass sich das Biotin-Molekül an einer

genau definierten Position befindet. Abb. 4.16 zeigt die Interaktion von rekombinantem HLA-DRB1\*0101 mit Hsp70 und anti-DR mAk.



**Abb. 4.16**

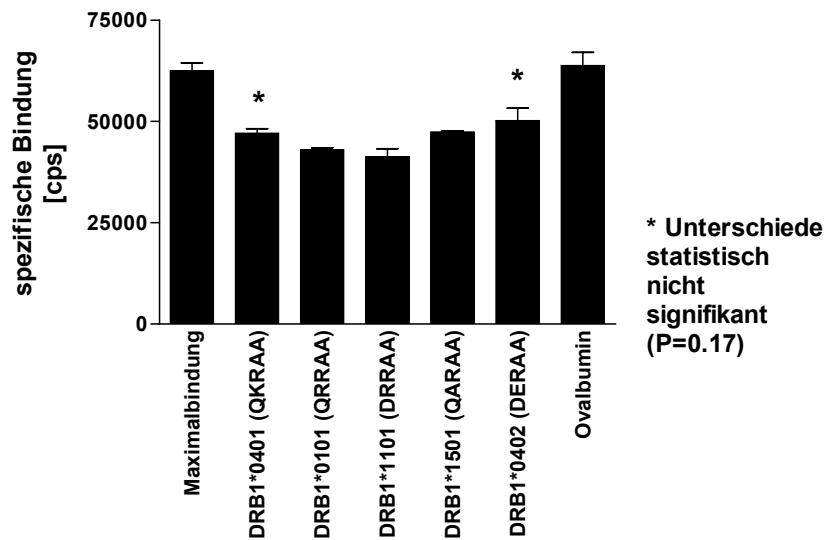
Sättigungsexperiment mit rekombinantem Biotin-markiertem HLA-DRB1\*0101 an Hsp70 und anti-HLA-DR mAk L-243 (beide 40 nM). Experimentelle Bedingungen s. 3.5.2, Bindung an Hsp70 wurde als Doppelwerte, Bindung an anti-HLA-DR als Einfachwerte bestimmt.

Auch die rekombinanten HLA-DR-Moleküle zeigen eine Sättigungsbindung an Hsp70, die Messwerte sind niedriger als mit den aufgereinigten Molekülen. Der  $K_d$ -Wert für rekombinantes DRB1\*0101 an Hsp70 wurde mit 155 nM bestimmt (vergleichbar den Werten mit aufgereinigten HLA-DR-Molekülen), der  $K_d$ -Wert für die Bindung an anti-DR wurde mit 23 nM bestimmt.

Mit den rekombinanten Molekülen erhaltene Messwerte waren wesentlich niedriger als die Messwerte mit den aufgereinigten Molekülen, vermutlich durch den geringen Biotinylierungsgrad mit nur einem Molekül Biotin pro HLA-DR-Molekül. Die Bedingungen bei diesen Versuchen waren dieselben wie bei den Experimenten mit aufgereinigten HLA-DR-Molekülen (s. 3.5.2). Für die rekombinanten HLA-DR-Moleküle wurden vergleichbare  $K_d$ -Werte wie mit den aufgereinigten HLA-DR-Molekülen gefunden (150 nM bei dem Experiment in Abb. 4.16). Die Bindung der rekombinanten HLA-DR-Moleküle an anti-DR mAk führte nur zu geringfügig höheren Messwerten als die Bindung der Moleküle an Hsp70, der  $K_d$ -Wert für die Bindung an anti-HLA-DR mAk wurde in diesem Experiment mit 23 nM bestimmt.



Auch mit den rekombinanten HLA-DR-Molekülen wurden Konkurrenzexperimente durchgeführt. Abb. 4.17 zeigt die Konkurrenz von 92 nM Biotin-markiertem, rekombinatem HLA-DRB1\*1501 durch 5-fachen Überschuss an unmarkierten rekombinanten HLA-DR-Molekülen bzw. Kontrollproteinen.



**Abb. 4.17**

Konkurrenz von rekombinatem HLA-DRB1\*1501 (92 nM Biotin-markiert) durch unmarkierte rekombinante HLA-DR-Moleküle und Ovalbumin in 5-fachem molaren Überschuss. Bindung an 30 nM Hsp70, sonstige experimentelle Bedingungen wie in 3.5.2 beschrieben. In Klammern ist die Sequenz der HV3-Region der HLA-DR-Moleküle angegeben.

Im Gegensatz zum Kontrollprotein Ovalbumin zeigten alle unmarkierten rekombinanten HLA-DR-Moleküle eine Konkurrenz. Es wurden dabei keine signifikanten Unterschiede zwischen den verschiedenen HLA-DR-Molekülen gefunden. Ovalbumin zeigte keine Konkurrenz.

In mehreren Experimenten mit rekombinanten HLA-DR-Molekülen konnten wie in dem hier gezeigten Experiment keine signifikanten Unterschiede zwischen den verschiedenen HLA-DR-Varianten gefunden werden. Diese Experimente bestätigen die mit den aufgereinigten HLA-DR-Molekülen gefundenen Ergebnisse, dass es kein eindeutiges allelspezifisches Bindungsmuster der ganzen HLA-DR-Moleküle an Hsp70 gibt.

#### **4.4 T-Zellproliferationsversuche: Beeinflusst Hsp70 die Proliferation antigenspezifischer CD4<sup>+</sup> T-Zellen?**

Wie in der Einleitung beschrieben (1.7), beeinflussen HSP-Moleküle die Präsentation und Reaktion auf (auto-) antigene Peptide über MHC I und wie neuere Arbeiten zeigen wohl auch über MHC II.

Hypothese: HSPs können im humanen System als Träger von (auto-) antigenen Peptiden dienen, ihre Übertragung auf MHC II-Moleküle erleichtern und damit die Peptid-Präsentation beeinflussen. Eine direkte Interaktion von HSPs mit MHC II-Molekülen, wie in den bisher beschriebenen Ergebnissen (4.1 bis 4.3) gezeigt, kann dann ein entscheidender Schritt in der MHC II-vermittelten Antigenpräsentation und CD4<sup>+</sup> T-Zellaktivierung spielen und so die Pathogenese von Autoimmunerkrankungen beeinflussen.

Daher wurde im folgenden Teil der Arbeit untersucht, welchen Einfluss Hsp70:Peptid-Komplexe auf die MHC II-vermittelte Antigenpräsentation und die Proliferation von CD4<sup>+</sup> Th-Gedächtniszellen haben. Dazu wurden PBMCs gesunder Donoren mit bekanntem Haplotyp verwendet, die gegen Tetanus-Toxin (TT) bzw. Influenza immunisiert waren. Um CD4<sup>+</sup> Th-Gedächtniszellen aus dem peripheren Blut der Donoren zu stimulieren wurden antigene Peptide aus dem TT C-Fragment und dem Influenza-Protein Hämagglutinin (HA) verwendet, die im Kontext mit bestimmten HLA-DR-Allelen als antigen beschrieben waren (s. 4.4.3).

In T-Zellproliferationsexperimenten wurde die Stimulation von CD4<sup>+</sup> Th-Gedächtniszellen mit antigenem Peptid alleine mit der Stimulation durch Hsp:Peptid-Komplexe verglichen. Eine Affinität der antigenen Peptide zu HSP70 wurde im Europium-Fluoreszenz-Assay gezeigt (s. 4.4.1). Die Antigenpezifität der generierten T-Zellen wurde durch die Färbung mit HLA-DR-Tetrameren untersucht (s. 4.4.11).

#### **4.4.1 Methodische Ergebnisse: Optimierung der T-Zellkultur**

##### **4.4.1.1 Medium**

Erste T-Zellkultur-Versuche wurden mit PBMCs in RPMI 1640-Medium durchgeführt, das mit 10% humanem AB-Serum (Serum von Spendern mit der Blutgruppe AB) supplementiert war. Beim Wechsel der Serum-Charge ergaben sich Probleme durch eine hohe Zahl toter Zellen, ein weiterer Nachteil ist der hohe Preis von AB-Serum. Bei Verwendung von autologem Serum der Donoren besteht das Problem, dass für jeden Donor ein eigenes Medium benötigt wird, die Versuchsbedingungen zwischen den einzelnen Donoren sind dadurch sehr unterschiedlich. Außerdem sind noch Gerinnungsproteine im „Serum“ enthalten, falls der Ficoll-Überstand als „Serum“ verwendet wird.

Schließlich wurde von insgesamt 8 Donoren gepooltes, humanes Serum (PHS, s. 3.8.3) getestet (10% in RPMI 1640). Bei den Donoren handelt es sich um fest angestellte Mitarbeiter des Klinikums, so dass es möglich ist, auch zu späteren Zeitpunkten Serum der selben Zusammensetzung herzustellen. Da die Blutgruppenantigene auf den nach dem Ficoll-Gradienten eliminierten Erythrozyten vorkommen, besteht für Experimente zur CD4<sup>+</sup> T-Zellstimulation keine Notwendigkeit, nur Serum von Spendern mit der Blutgruppe AB zu verwenden. Das 10%-ige PHS-Medium erwies sich als geeignet und wurde für die Experimente zur CD4<sup>+</sup> T-Zellproliferation verwendet.

##### **4.4.1.2 Zellzahl, CD4<sup>+</sup> T-Zell-Isolierung, Kulturdauer**

Die Versuche zur Reaktivität der Donoren auf die verschiedenen antigenen Peptide wurden mit PBMCs der Donoren ohne Isolierung der CD4<sup>+</sup> T-Zellen durchgeführt. Da festgestellt wurde, dass die Zahl der APZs Einfluss auf die T-Zellproliferation und den HSP-Effekt hat, wurden für weitere T-Zellexperimente mit den Donoren die CD4<sup>+</sup> T-Zellen isoliert (s. 3.8.5) und mit einer definierten Zahl an APZs kultiviert.

Nach Experimenten mit unterschiedlichen Zellzahlen wurde eine Zellzahl von  $2 \times 10^5$  CFSE-gefärbten CD4<sup>+</sup> T-Zellen pro Loch (bzw.  $5 \times 10^5$  PBMCs ohne vorherige CD4<sup>+</sup>-Isolierung) in einer 96-Loch Flachbodenplatte (200 µl Gesamtvolumen) als geeignet gewählt. Zu den isolierten CD4<sup>+</sup> T-Zellen kamen autologe APZs in verschiedenen Verhältnissen (s. 4.4.9). Eine Kulturdauer von 6 Tagen wurde gewählt, da an Tag 4

und 5 noch zu wenige Zellen proliferiert waren. Längere Kulturzeiten beeinflussten das Ergebnis kaum, da die Teilungsaktivität der Zellen nachlies.

#### 4.4.2 Donoren

Es wurden nur T-Zellen aus dem peripheren Blut gesunder Donoren mit bekanntem HLA-DR-Haplotyp verwendet. Diese stammten entweder von HLA-typisierten Labormitarbeitern oder wurden aus sog. Buffy-Coats (HLA-Typisierung und Versorgung mit Buffy-Coats: Frau Prof. Dr. Wernet, Transfusionsmedizin Tübingen) isoliert, einem Nebenprodukt bei der Gewinnung von Serum oder Plasma aus Blutspenden. Dieses ist besonders reich an Leukozyten und Thrombozyten. Die Buffy-Coats stammten von Spendern mit den Haplotypen DRB1\*0401 oder \*0402.

Es wurden Experimente mit Donoren der Haplotypen HLA-DRB1\*0101 (1 Donor), \*0401 (13 Donoren), \*0402 (2 Donoren), \*1101 (3 Donoren), \*1501 (2 Donoren) durchgeführt.

#### 4.4.3 Verwendete antigene Peptide und deren Hsp70-Affinität

Zur Stimulation von T-Zellen der Donoren wurden Peptidsequenzen aus dem Tetanus-Toxin (C-Fragment) oder dem Influenza-Virus-Protein Hämagglutinin verwendet (s. Tab. 4.1). Durch Immunisierung gegen Tetanus-Toxin oder Influenza sind bei einigen Donoren antigenspezifische Th-Gedächtnis-Zellen gegen eines oder mehrere dieser Peptide im peripheren Blut vorhanden. Diese können nach Isolierung der CD4<sup>+</sup> T-Zellen in vitro stimuliert und expandiert werden.

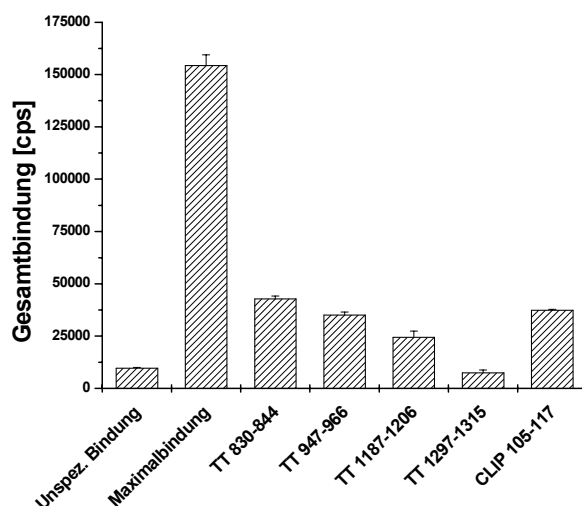
Bezeichnung	Sequenz	Herkunft
TT <sub>830-844</sub>	QYIKANSFKIGITEL	Tetanus-Toxin, C-
TT <sub>947-966</sub>	FNNFTVSFWLRVPKVSASHL	Fragment
TT <sub>1187-1206</sub>	DSFVKSGDFIKLYVSYNNNE	
TT <sub>1297-1315</sub>	KILGCDWYFVPTDEGWTND	
HA <sub>307-319</sub>	PKYVKQNTLKLAT	Hämagglutinin (Influenza-Virus)

**Tab. 4.1**

Sequenzen und Herkunft der verwendeten antigenen Peptide

Für alle fünf Peptide wurden mit dem Epitop-Vorhersage-Algorithmus SYFPEITHI (Rammensee *et al.* 1999) ([www.syfpeithi.de](http://www.syfpeithi.de)) mögliche Liganden bzw. T-Zellepitope mit HLA-DRB1\*0101, \*0401, \*1101 und \*1501 vorhergesagt. Während für TT<sub>1187-1206</sub> und TT<sub>1297-1315</sub> vor allem eine Präsentation im Zusammenhang mit HLA-DR\*11 (und HLA-DQ) beschrieben ist, gelten TT<sub>830-844</sub> und TT<sub>947-966</sub> als relativ universelle CD4<sup>+</sup> T-Zellepitope, die von vielen HLA-DR-Molekülen präsentiert werden können (Liganden- und T-Zellepitop-Datenbank SYFPEITHI bzw. (Diethelm-Okita *et al.* 1997; Reece *et al.* 1993). HA<sub>307-319</sub> ist als T-Zellepitop für HLA-DRB1\*0101 und HLA-DRB1\*0401 beschrieben (Liganden- und T-Zellepitop-Datenbank SYFPEITHI bzw. Carmichael *et al.* 1997; Stern *et al.* 1994), antigenspezifische CD4<sup>+</sup> T-Zellen konnten mittels HLA-DR-Tetrameren nachgewiesen werden (Danke und Kwok 2003).

Die verwendeten antigenen Peptide wurden mit dem Europium-Fluoreszenz-Assay (s. 3.5.1) auf ihre Hsp70-Affinität getestet. Abb. 4.18 zeigt die Konkurrenz von 1 µg/well (bzw. 11,1 µM) Biotin-markiertem CLIP<sub>105-117</sub> Indikatorpeptid durch einen fünffachen Überschuss der unmarkierten Peptide aus TT C-Fragment und unmarkiertem CLIP<sub>105-117</sub>. Die Bindung an 0,5 µg Hsp70/well (ca. 0,15 µM) wurde untersucht.



**Abb. 4.18**

Test der antigenen Peptide aus TT C-Fragment auf ihre Hsp70-Affinität.

Kompetitionsversuch mit 1 µg/well Biotin-markiertem CLIP<sub>105-117</sub> als Indikatorpeptid und den unmarkierten Peptiden aus TT C-Fragment und unmarkiertem CLIP<sub>105-117</sub> in fünffachem Überschuss. Die Bindung an 0,5 µg (0,15 µM) Hsp70/well wurde untersucht, sonstige experimentelle Bedingungen waren wie in 3.5.1 beschrieben. Alle TT-Peptide verdrängten das Indikatorpeptid in fünffachem Überschuss gleich gut oder besser als unmarkiertes CLIP<sub>105-117</sub>.

Das TT<sub>1297-1315</sub>-Peptid hatte die stärkste Hsp70-Affinität, es verdrängte in 5-fachem Überschuss die Indikatorpeptidbindung auf weniger als 5 % des Maximalwertes, wenn die unspezifische Bindung subtrahiert wurde (mehr als 95 %-ige Konkurrenz). Auch die anderen TT-Peptide verdrängten das Indikatorpeptid ähnlich stark oder stärker als unmarkiertes CLIP<sub>105-117</sub>-Peptid: TT<sub>830-844</sub> auf 27,7%, TT<sub>947-966</sub> auf 22,7%, TT<sub>1187-1206</sub> auf 15,8%, TT<sub>1297-1315</sub> auf 4,8% und unmarkiertes CLIP<sub>105-117</sub> auf 24,8 % des Maximalwertes. Alle TT-Peptide besitzen damit eine Hsp70-Affinität. Für HA<sub>307-319</sub> wurde in vergleichbaren Experimenten ebenfalls eine Hsp70-Affinität gefunden (< 20 % der Maximalbindung, Daten nicht gezeigt).

#### **4.4.4 Messung der CD4<sup>+</sup> T-Zellproliferation mittels Verdünnung des Farbstoffes CFSE**

Die Proliferation wurde anfangs mit der Methode des Tritium-markierten Thymidineinbaus untersucht, dann wurde aber der Färbung mittels CFSE der Vorzug gegeben, die Proliferation wird dabei per FACS analysiert. Diese Methode besitzt gegenüber dem herkömmlichen <sup>3</sup>H-Thymidineinbau die Möglichkeit, durch zusätzliches Anfärben mit Fluoreszenz-markierten Antikörpern weitere Zell-Merkmale, wie die Expression des Oberflächenmoleküls CD4, zu untersuchen. Durch Färbung mit anti-CD4 mAk in Kombination mit peptidbeladenen HLA-DR-Tetrameren war es möglich, die Auswertung ausschließlich auf antigenspezifische CD4<sup>+</sup> T-Zellen zu beschränken. Es wird die Proliferation während der gesamten Stimulation berücksichtigt (und nicht wie beim Tritium-markierten Thymidineinbau nur während der letzten 12-18 Stunden). Da sich der CFSE-Farbstoff bei jeder Teilung zu gleichen Teilen auf die Mutter- und Tochterzelle verteilt, lässt sich die Anzahl der Zellteilungen errechnen. Durch die Formel  $x:2^n$ , wobei x die Anzahl der Zellen nach der Teilung und n die Anzahl der Teilungen ist, kann die Anzahl der Ausgangszellen abgeschätzt werden.

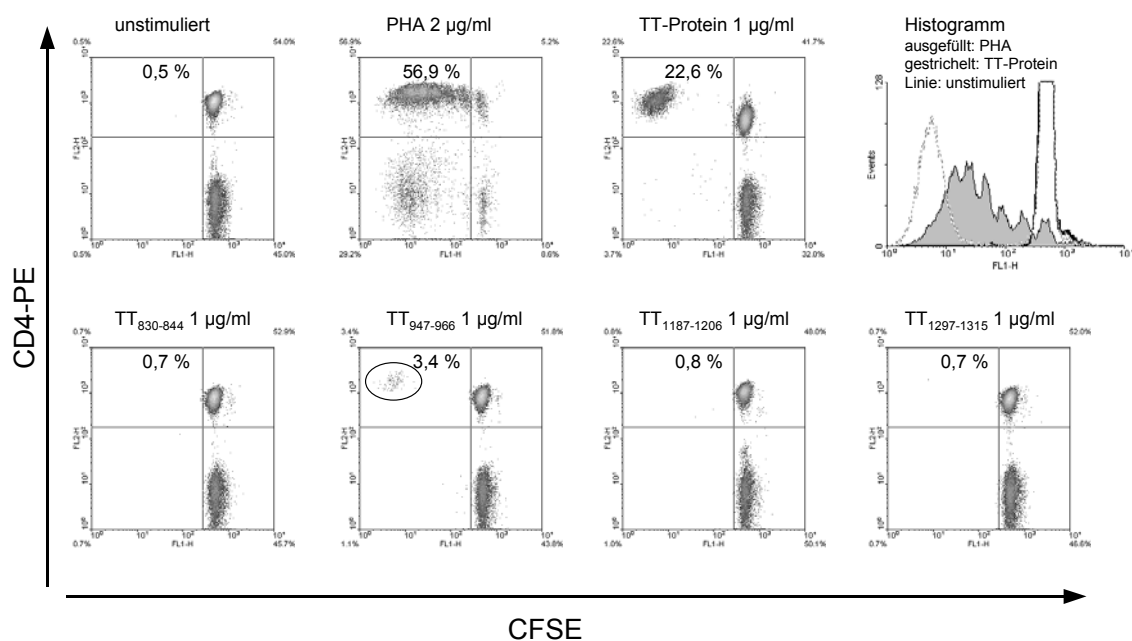
Die Zellen wurden mit dem Fluoreszenz-Farbstoff CFSE gefärbt (s. 3.9), mit Peptid alleine bzw. mit Hsp70:Peptid-Komplexen (s. 3.11) stimuliert und in Kultur genommen (s. 3.10). An Tag 6 wurden die Zellen entnommen, mit fluoreszenz-markiertem anti-CD4 mAk und/oder HLA-DR-Tetrameren gefärbt (s. 3.13) und im FACS analysiert (s. 3.14). In Abbildung 4.19 ist beispielhaft das FACS-Bild der CD4<sup>+</sup> T-Zellproliferation eines DRB1\*1101-Individuums mit verschiedenen antigenen

Peptiden als Punktediagramm dargestellt, wobei jeder Punkt im Diagramm einer analysierten Zelle entspricht. Im oberen linken Quadranten befindet sich dabei der Anteil proliferierter  $CD4^+$  Zellen ( $CD4^{+high}$ ), die durch Zellteilung den Farbstoff CFSE abgegeben haben ( $CFSE^{low}$ ). In den im Folgenden dargestellten Ergebnissen wird der Prozentsatz dieser  $CD4^{+high}$   $CFSE^{low}$  T-Zellen an der gemessenen Gesamtzellzahl als Anteil proliferierter Zellen angesehen. Diese werden als Punktediagramm (y-Achse CD4, x-Achse CFSE) dargestellt (Abb. 4.19) oder als CFSE-Histogramm nach Eingrenzung mittels eines Gates auf  $CD4^+$  T-Zellen (Abb. 4.19 oben rechts). Bei der Stimulation mit SEB oder PHA wird ein Großteil der  $CD4^+$  T-Zellen unspezifisch aktiviert, dabei ergibt sich ein Histogramm mit definierten Maxima, die den einzelnen Zellteilungen entsprechen und aus denen die Anzahl der Zellteilungen abgeleitet werden kann. Die Stimulation mit antigenen Peptiden oder TT-Protein führt dazu, dass nur ein kleiner Teil der T-Gedächtniszellen spezifisch aktiviert wird, die sich mehrmals teilen und meist zu einem Bild ohne definierte Teilungsmaxima führt.

#### 4.4.5 Test der Peptidreaktivität der Donoren

Von allen Donoren wurde zuerst getestet, auf welche antigenen Peptide sie reaktive Th-Gedächtniszellen besitzen. Isolierte PBMCs wurden ohne  $CD4^+$  T-Zellisolierung mit CFSE gefärbt und 6 Tage in Kultur genommen ( $5 \times 10^5$  PBMCs/Loch, 96-Loch Flachbodenplatte). Die Stimulation erfolgte mit antigenen Peptiden in den Konzentrationen 0,1; 1 und 10  $\mu\text{g/ml}$ . Als Negativkontrolle dienten unstimulierte PBMCs, als Positivkontrolle Zellen, die mit 2  $\mu\text{g/ml}$  SEB oder PHA bzw. intaktem Tetanusprotein C-Fragment stimuliert wurden. Die Analyse erfolgte mittels anti-CD4-PE-Färbung im FACS. Die Prozentzahl proliferierter  $CD4^{+high}$   $CFSE^{low}$  T-Zellen im oberen linken Quadranten wurde ermittelt (s. 4.4.4). Abb. 4.19 zeigt als Beispiel die CFSE-Färbungen eines DRB1\*1101-Donors, der reaktive T-Zellen auf TT<sub>947-966</sub> besitzt, nicht aber auf die restlichen untersuchten TT-Peptide. Mit TT<sub>947-966</sub> wurden dabei 3,4 % proliferierte  $CD4^+$  T-Zellen gefunden, die anderen Peptide und unstimulierte Zellen führten zu einer Proliferation von  $< 0,8$  %. Stimulation mit TT-Protein führte zur Proliferation von mehr als 22 %, unspezifische Stimulation mit PHA führte zu beinahe 57 % proliferierten  $CD4^+$  T-Zellen.

Für verschiedene Donoren mit den Haplotypen HLA-DRB1\*1101 (3 Donoren), \*0401 (13 Donoren), \*0402 (2 Donoren), \*0101 (1 Donor), \*1501 (2 Donoren) wurde so die Reaktivität auf die antigenen Peptide untersucht. Reagierte ein Donor auf eines oder mehrere der Peptide, wurde in weiteren Experimenten der Einfluss von Hsp70 auf die T-Zellproliferation untersucht (s. 4.4.7). Schließlich wurde durch Färbung mittels peptidbeladener HLA-DR-Tetramere getestet, ob tatsächlich antigenspezifische Zellen auf das eingesetzte Peptid im Kontext mit dem gewünschten HLA-DR-Molekül des Donors generiert wurden (s. 4.4.11).



**Abb. 4.19**

Stimulation eines DRB1\*1101 positiven Donors mit PHA, TT-Protein und 4 verschiedenen Peptiden (1 µg/ml) aus dem Tetanus-Protein C-Fragment.  $5 \times 10^5$  CFSE-gefärbte PBMCs (ohne CD4<sup>+</sup>-Isolierung) je Probe wurden 6 Tage kultiviert (s. 3.10), mit anti-CD4-PE mAk gefärbt (s. 3.13.1) und im FACS analysiert (s. 3.14). Prolifериerte CD4<sup>+</sup> T-Zellen werden im oberen linken Quadranten der Punktediagramme gefunden, da sie den Farbstoff CFSE (x-Achse) verlieren und CD4-positiv (y-Achse) sind (CD4<sup>high</sup>CFSE<sup>low</sup>-Zellen).

Obere Reihe: Unstimulierte Zellen zeigen kaum Proliferation (0,5 %), wohingegen PHA (56,9 %) und TT-Protein (22,6%) zu einer starken Proliferation führen. Oben rechts ist ein Histogramm der Stimulation mit PHA (definierte Teilungsmaxima), TT-Protein und unstimulierten Zellen als Overlay dargestellt. Untere Reihe: Stimulation mit TT-Peptiden. Der Donor reagiert einzig auf TT<sub>947-966</sub> (3,4 %), Stimulation mit den anderen Peptiden zeigt eine ähnliche Proliferation wie die unstimulierte Probe (0,8 % oder weniger).

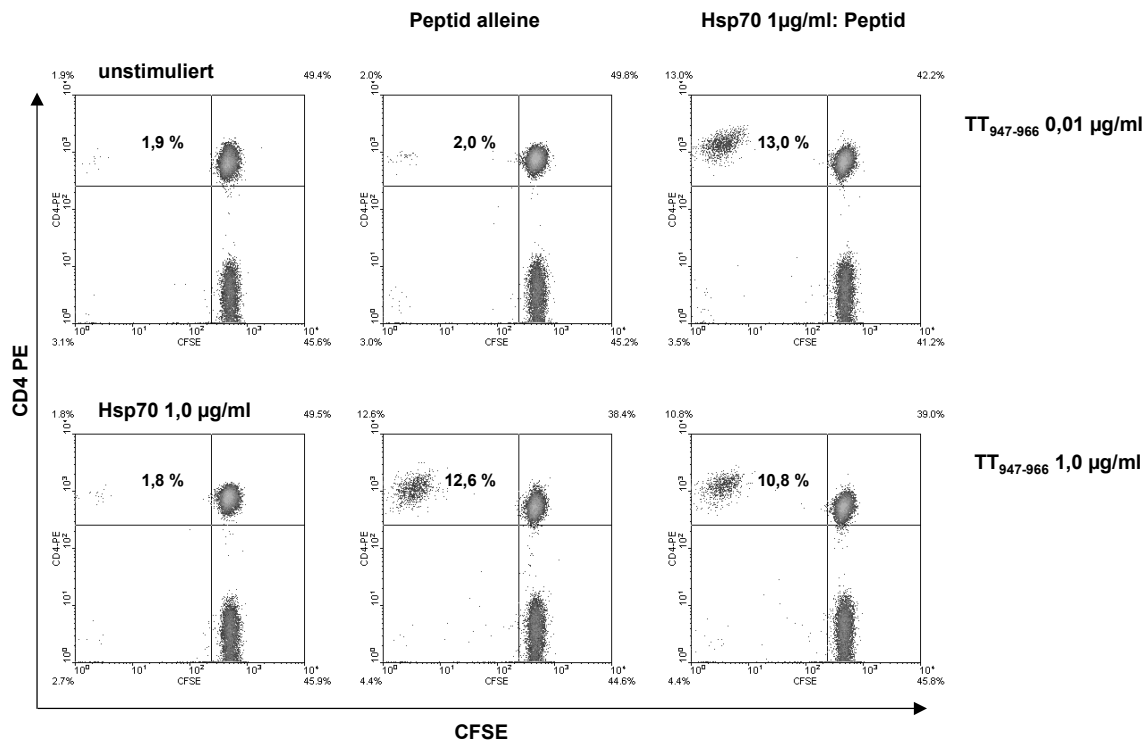


#### 4.4.7 Hsp70 verstärkt die CD4<sup>+</sup> T-Zellproliferation

War für einen Donor mit bekanntem HLA-DR-Haplotyp die Peptidreaktivität bekannt, wurde getestet, ob die Proliferation von CD4<sup>+</sup> T-Zellen bei Stimulation mit Hsp70:Peptid-Komplexen verstärkt wird. HSP70:Peptid-Komplexe wurden wie beschrieben (s. 3.11) über Nacht bei 37 °C in PBS generiert. Aus dem peripheren Blut der Donoren wurden PBMCs isoliert (s. 3.8.4) und mit CFSE gefärbt (s. 3.9). Anfangs wurden die gesamten PBMCs entweder mit unkomplexiertem Peptid oder mit Hsp70:Peptid-Komplexen stimuliert ( $5 \times 10^5$ /well). Die Zellen wurden 6 Tage kultiviert, dann erfolgte die Analyse mittels FACS (s. 3.13.1 und 3.14).

Abb. 4.20 zeigt die Stimulation von PBMCs eines gesunden DRB1\*1101-Spenders mit zwei Konzentrationen (0,01 und 1,0 µg/ml) des antigenen Tetanus-Peptides TT<sub>947-966</sub>. Das Peptid wurde unkomplexiert oder nach vorheriger Komplexierung an Hsp70 eingesetzt.

Dabei führte die Stimulation mit sehr geringen Peptidmengen (0,01 µg/ml), die mit Hsp70 komplexiert wurden zu einer starken Proliferation von CD4<sup>+</sup> T-Zellen, die Stimulation mit unkomplexiertem Peptid führte in dieser Konzentration nicht zu einer sichtbaren Proliferation. Im Gegensatz hierzu zeigte Stimulation mit hohen Peptidkonzentrationen (1,0 µg/ml) keine signifikanten Unterschiede zwischen T-Zell-Stimulation mit Peptid alleine oder Hsp70:Peptid-Komplexen. In den meisten Experimenten konnte eine vergleichbare CD4<sup>+</sup> T-Zellproliferation mit einer um etwa zwei Zehnerpotenzen erniedrigten Peptidkonzentration erzielt werden, wenn das Peptid mit Hsp70 komplexiert wurde. In hohen Konzentration hatte die Komplexierung des Peptides an Hsp70 keine Vorteile gegenüber der Stimulation mit Peptid alleine.



**Abb. 4.20**

Proliferation von CD4<sup>+</sup> T-Zellen bei Stimulation mit Peptid alleine oder Hsp70:Peptid-Komplexen.

PBMCs (ohne Isolierung der CD4<sup>+</sup> T-Zellen) eines gesunden DRB1\*1101-positiven Spenders wurden mit zwei Konzentrationen TT<sub>947-966</sub>-Peptid (0,01 und 1,0 µg/ml) mit und ohne vorherige Komplexierung an Hsp70 (1 µg/ml) stimuliert. Experimentelle Bedingungen und Analyse wie in Abb. 4.20.

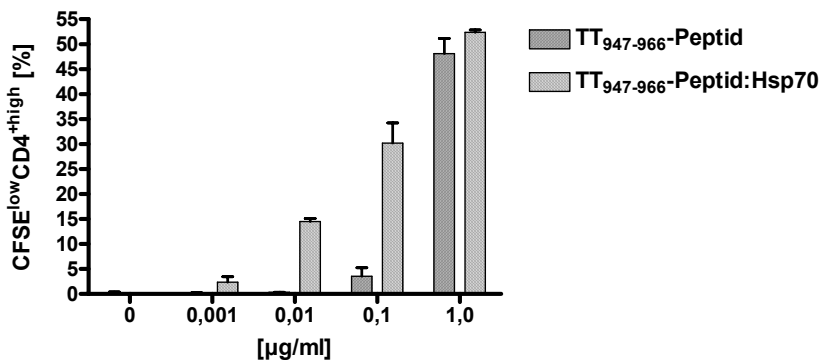
Die proliferierten Zellen (CD4<sup>+</sup>CFSE<sup>low</sup>-Zellen im oberen linken Quadranten der Punktediagramme) waren CD4-positiv. Stimulation mit 1 µg/ml Peptid alleine oder Peptid komplexiert an Hsp70 führte zu einer ähnlichen Anzahl proliferierter Zellen (unten Mitte und unten rechts), wohingegen die Stimulation mit 0,01 µg/ml Peptid nur zu einer starken Proliferation führte, wenn das Peptid zuvor an Hsp70 komplexiert wurde (oben Mitte und oben rechts). Unstimulierte und mit Hsp70 alleine stimulierte PBMCs zeigten keine signifikante Proliferation (oben links und unten links).

Für weitere Versuche wurden die CD4<sup>+</sup> T-Zellen isoliert (s. 3.8.5), da gefunden wurde, dass die APZ-Zahl die Proliferation beeinflusst, außerdem sollte in den einzelnen Versuchen ein möglichst konstantes APZ:CD4<sup>+</sup> T-Zell-Verhältnis gewährleistet werden. Daher wurden 2 x 10<sup>5</sup> isolierte CD4<sup>+</sup> T-Zellen mit einer definierten Zahl APZs kultiviert, die mit verschiedenen Konzentrationen an unkomplexiertem Peptid oder Hsp70:Peptid-Komplex inkubiert wurden. In den meisten Experimenten wurden als Kontrolle Zellen mit Peptiden stimuliert, die mit einem Kontrollprotein vorinkubiert waren (s. Abb. 4.28), des Weiteren wurden Zellen mit Hsp70 plus Peptid ohne vorherige Komplexierung stimuliert (s. 4.24). Am Tag 6 erfolgte die Analyse im FACS (s. 3.13.1 und 3.14).

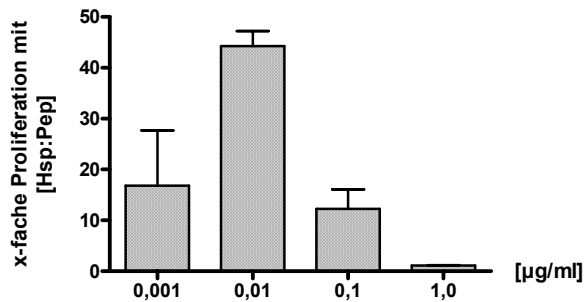
In Abbildung 4.21 ist die Stimulation von isolierten CD4<sup>+</sup> T-Zellen des DRB1\*1101-Donors aus Abb. 4. 21 mit verschiedenen Konzentrationen TT<sub>947-966</sub>-Peptid oder Hsp70:TT<sub>947-966</sub>-Komplexen. Die Balken in Abb. 4.21 A stellen den Prozentsatz proliferierter CD4<sup>+</sup> T-Zellen (vgl. Abb. 4.20, CD4<sup>high</sup>CFSE<sup>low</sup>-Zellen aus dem oberen linken Quadranten) in 3-fach-Bestimmung dar. Die Balken in Abb. 4.21 B stellen die x-fach verstärkte Proliferation bei Stimulation mit Hsp70:Peptid-Komplexen für die verschiedenen Peptidkonzentrationen dar.

Wurde das Peptid mit Hsp70 vorinkubiert konnte noch in Konzentrationen von 0,001 µg/ml Peptid eine CD4<sup>+</sup> T-Zellproliferation gefunden werden. Mit Peptid alleine wurde erst ab Peptidkonzentrationen von 0,1 µg/ml eine messbare Proliferation gefunden. In hohen Peptid-Konzentrationen (1 µg/ml) hatte die Komplexierung des Peptides mit Hsp70 keinen Vorteil gegenüber der Stimulation mit Peptid alleine (Abb. 4.21 A). In sehr niedrigen Peptidkonzentrationen führte die Stimulation mit Hsp70:Peptid-Komplexen zu einer bis zu etwa 50 x verstärkten CD4<sup>+</sup> T-Zellproliferation gegenüber der Stimulation mit Peptid alleine (Abb. 4.21 B).

A)



B)



$$\text{x-fache Proliferation} = \frac{\text{Proliferation Hsp:Peptid} [\%]}{\text{Proliferation nur Pep} [\%]}$$

**Abb 4.21**

Stimulation isolierter CD4<sup>+</sup> T-Zellen des DRB1\*1101-Donors aus Abb. 4.21 mit TT<sub>947-966</sub>-Peptid in Konzentrationen von 0,001 bis 1 µg/ml. Unkomplexiertes Peptid oder Peptid komplexiert mit 0,3 µg/ml Hsp70 wurde verwendet. Das APZ: CD4<sup>+</sup> T-Zell-Verhältnis war 1:5. Die Proliferation wurde wie in Abb. 4.20 beschrieben gemessen.

**A)** Die Balken entsprechen dem Prozentsatz proliferierter CD4<sup>+</sup> T-Zellen (vgl. Abb. 4.21 oberer linker Quadrant CD4<sup>+high</sup>CFSE<sup>low</sup>) nach Stimulation mit verschiedenen Konzentrationen Peptid oder Hsp70:Peptid-Komplex (Mittelwert + Standardabweichung aus drei unabhängig voneinander stimulierten Proben).

**B)** x-fach verstärkte Proliferation mit Hsp70:Peptid-Komplexen bei den verschiedenen Peptidkonzentrationen (= % CFSE<sup>low</sup>CD4<sup>+high</sup> T-Zellen stimuliert mit Hsp70:Peptid / % CFSE<sup>low</sup>CD4<sup>+high</sup> T-Zellen stimuliert mit Peptid alleine).

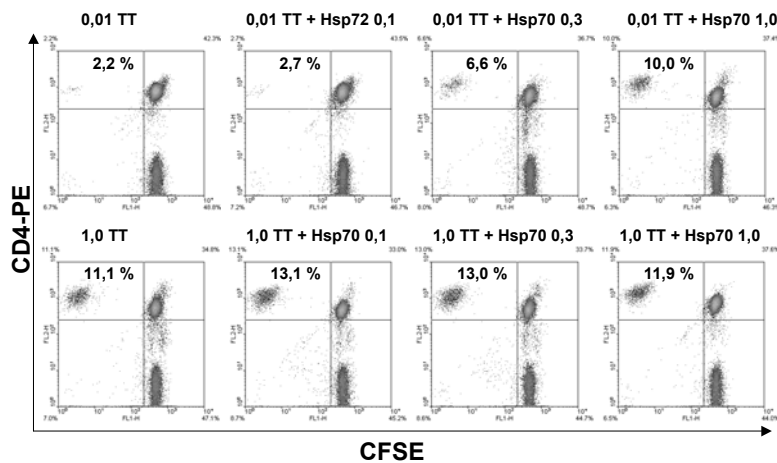
Die mit Hsp70:Peptid-Komplexen verstärkte T-Zellproliferation wurde mit verschiedenen Peptiden an Donoren mit unterschiedlichem HLA-DR-Haplotyp gefunden:

**TT2:** 2 x DRB1\*1101/01, 1 x DRB1\*0401/11  
**HA:** 1 x DRB1\*0401/0402, 1 x DRB1\*0401/15, 1 x DRB1\*0101,  
**TT2 und TT4:** 1 x DRB1\*0401/0404

#### **4.4.8 Hsp70-Konzentration beeinflusst die CD4<sup>+</sup> T-Zellproliferation**

Der Effekt von Hsp70 auf die CD4<sup>+</sup> T-Zellproliferation war abhängig von der eingesetzten Konzentration an Hsp70. In niedrigen Peptidkonzentrationen (0,01 µg/ml TT<sub>947-966</sub>) führte die Komplexierung an steigende Hsp70-Konzentrationen zu einer Hsp70-konzentrationsabhängigen Verstärkung der CD4<sup>+</sup> T-Zellproliferation. In hohen Peptidkonzentrationen (1,0 µg/ml) hatte die Komplexierung des Peptides mit steigenden Hsp70-Konzentrationen keinen Einfluss auf die Anzahl proliferierter CD4<sup>+</sup> T-Zellen (Abb. 4.22).

A)



B)

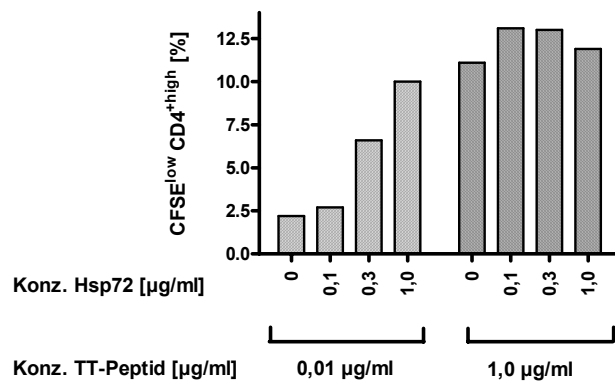


Abb. 4.22

Verstärkung der CD4<sup>+</sup> T-Zellantwort in Abhängigkeit von der Hsp70-Konzentration.

PBMCs eines DRB1\*1101-Spenders wurden mit einer niedrigen (0,01 µg/ml) oder hohen (1,0 µg/ml) Konzentration TT<sub>947-966</sub>-Peptid (= TT-Peptid) stimuliert. Unkomplexiertes Peptid oder Peptid, das mit verschiedenen Konzentrationen Hsp70 (0,1; 0,3 und 1,0 µg/ml) komplexiert war, wurde zur Stimulation verwendet. Die Proliferation wurde wie in Abb. 4.20 beschrieben gemessen.

**A)** Darstellung der Daten als Punktediagramme (obere Reihe 0,01 µg/ml Peptid, untere Reihe 1,0 µg/ml Peptid, von rechts nach links jeweils Komplexierung mit steigenden Konzentrationen Hsp70).

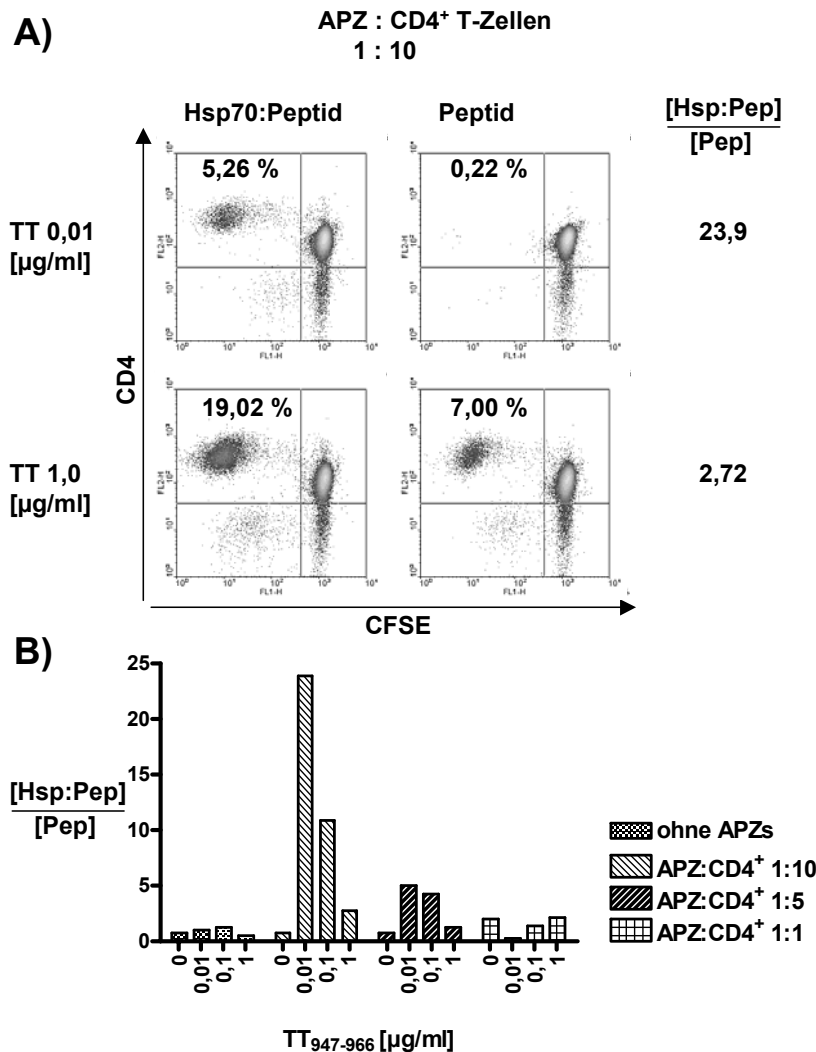
**B)** Darstellung der Prozentzahl proliferierten CD4<sup>+</sup> T-Zellen als Balkendiagramm (CFSE<sup>low</sup>CD4<sup>high</sup>, vgl. Abb. 4.21).

In niedrigen Peptidkonzentrationen wurde ein klarer, dosisabhängiger Hsp70-Effekt gefunden, in hohen Peptidkonzentrationen hatte die Komplexierung an Hsp70 keinen Einfluss auf die Proliferation.

#### 4.4.9 Die Anzahl der eingesetzten APZs beeinflusst den Hsp70-Effekt

Um den Einfluss der APZ-Zahl auf die Proliferation von T-Zellen mit Peptiden bzw. HSP:Peptid-Komplexen zu untersuchen, wurden  $2 \times 10^5$  isolierte CD4<sup>+</sup> T-Zellen mit unterschiedlichen APZ-Zahlen und verschiedenen Peptidkonzentrationen stimuliert. Dazu wurde das Peptid mit und ohne Hsp70-Komplexierung eingesetzt. Die größte Hsp70-abhängige Proliferationsverstärkung wurde bei geringen Peptidmengen in Kombination mit einer sehr kleinen Anzahl an APZs gefunden (Abb. 4.23): Wurde ein APZ:CD4<sup>+</sup> T-Zell-Verhältnis von 1:10 mit einer Peptidmenge von 0,01 µg/ml TT<sub>947-966</sub>-Peptid eingesetzt, war in dem hier gezeigten Versuch die CD4<sup>+</sup> T-Zellproliferation mit Hsp70:Peptid-Komplexen 24-fach erhöht gegenüber der Stimulation mit Peptid alleine (5,26 % mit Hsp70:Peptid gegenüber 0,22 % mit Peptid alleine). Mit steigenden Konzentrationen an antigenem Peptid und steigenden APZ-Zahlen nahm der proliferationsverstärkende Effekt durch Hsp70 deutlich ab.

Diese Daten zeigen, dass Hsp70-gebundenen Peptide in der Lage sind, CD4<sup>+</sup> T-Zellen mit sehr viel niedrigeren Peptidkonzentrationen und APZ-Zahlen zu aktivieren. Mit einem weiteren DRB1\*1101-Spender (und TT<sub>947-966</sub>), sowie zwei DRB1\*0401-Spendern im Kontext mit HA<sub>307-319</sub> wurden vergleichbare Ergebnisse gefunden. Für die einzelnen Spender wurden jeweils optimale APZ:CD4<sup>+</sup> T-Zell-Verhältnisse individuell ermittelt, weitere Versuche wurden bei diesen Verhältnissen durchgeführt.

**Abb. 4.23**

Die APZ-Zahl beeinflusst den Hsp70-Effekt auf die CD4<sup>+</sup> T-Zellproliferation.

2 x 10<sup>5</sup> CFSE-gefärbte CD4<sup>+</sup> T-Zellen eines DRB1\*1101-Spenders wurden 6 Tage mit verschiedenen APZ-Zahlen (APZ:CD4<sup>+</sup> T-Zell-Verhältnisse 1:10, 1:5, 1:1) bzw. ohne APZs kultiviert. Bestrahlte CD4<sup>+</sup> T-Zellnegative autologe Zellen wurden als APZs verwendet. APZs wurden mit verschiedenen Konzentrationen TT<sub>947-966</sub>-Peptid (0; 0,01; 0,1; 1,0 µg/ml) stimuliert, das mit und ohne vorherige Komplexierung an Hsp70 eingesetzt wurde. Die Proliferation wurde wie in Abb. 4.20 beschrieben gemessen.

**A)** Die Puntediagramme der Stimulation mit 0,01 und 1 µg/ml Peptid mit und ohne Hsp70-Komplexierung bei einem APZ:CD4<sup>+</sup> T-Zell-Verhältnis von 1:10 sind beispielhaft dargestellt.

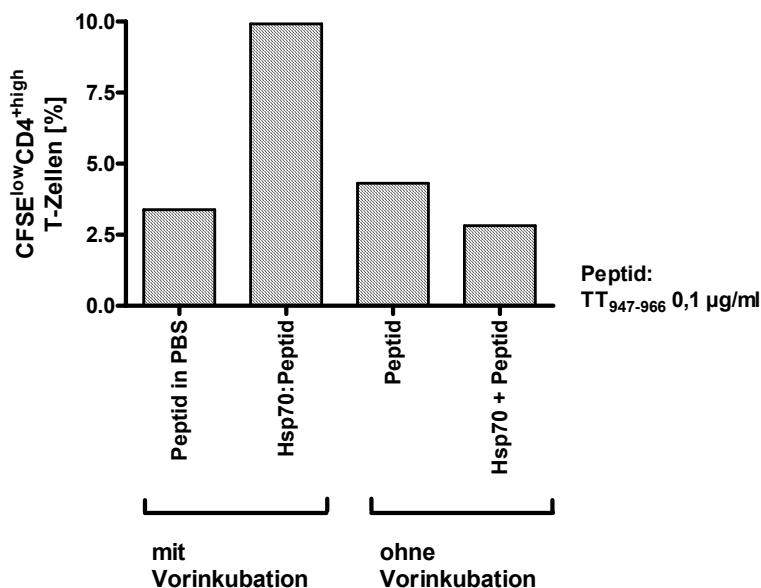
**B)** Die x-fache Proliferation mit Hsp70:Peptid gegen Peptid alleine ist für alle APZ-Verhältnisse und Peptidkonzentrationen dargestellt (= % CFSE<sup>low</sup>CD4<sup>high</sup> T-Zellen stimuliert mit Hsp70:Peptid / % CFSE<sup>low</sup>CD4<sup>high</sup> T-Zellen stimuliert mit Peptid alleine, s. Abb. 4.21).

Je geringer die Zahl der APZs im Verhältnis zu den CD4<sup>+</sup> T-Zellen wird, um so ausgeprägter ist die Proliferationsverstärkung mit HSP70-Peptid-Komplexen



#### 4.4.10 Komplexierung der Peptide an Hsp70 ist Voraussetzung für die Proliferationsverstärkung

Um zu untersuchen, ob die Komplexierung der Peptide an Hsp70 essentiell für die Proliferationsverstärkung ist, wurden CD4<sup>+</sup> T-Zellen zum einen mit antigenem Peptid stimuliert, das entweder in PBS alleine oder in PBS mit Hsp70 (1 µg/ml) über Nacht vorinkubiert wurde (Abb. 4.24, linker Teil). Zum anderen wurden die Zellen mit Peptid und Peptid + Hsp70 ohne Vorinkubation stimuliert (Abb. 4.24, rechter Teil). Durch gleichzeitige Zugabe von Hsp70 und Peptid in die Zellkultur ist keine vorausgehende Komplexierung von Hsp70 mit Peptid möglich. Nur die Stimulation mit Peptid, das zuvor mit Hsp70 komplexiert wurde führte zu einer verstärkten CD4<sup>+</sup> T-Zellproliferation.



**Abb. 4.24**

Peptid-Komplexierung an Hsp70 ist Voraussetzung für eine verstärkte CD4<sup>+</sup> T-Zellproliferation. CD4<sup>+</sup> T-Zellen von DRB1\*1101-Spender Nr.2 wurden mit 0,1 µg/ml TT<sub>947-966</sub>-Peptid stimuliert. Proliferation wurde gemessen wie in Abb. 4.21 beschrieben, die y-Achse stellt die Prozentzahl proliferierter CD4<sup>+</sup> T-Zellen dar (CD4<sup>+</sup>CFSE<sup>+</sup>). Das Peptid wurde in PBS oder PBS mit 1 µg/ml Hsp70 vorinkubiert (links). Zum Vergleich wurden Zellen mit Peptid oder Peptid + Hsp70 ohne Vorinkubation stimuliert (rechts). Nur Stimulation mit Peptid, das mit Hsp70 komplexiert wurde zeigt eine verstärkte Proliferation.

Diese Ergebnisse zeigen, dass die Vorinkubation von antigenem Peptid mit Hsp70 und die damit verbundene Bildung der Hsp70:Peptid-Komplexe, absolute Voraussetzung für den verstärkenden Effekt von Hsp70 auf die CD4<sup>+</sup> T-Zellproliferation war. Stimulation mit unbehandeltem Peptid und Peptid, das in PBS vorinkubiert wurde, führte zu einer vergleichbaren Anzahl proliferierter CD4<sup>+</sup> T-Zellen, was zeigt, dass die Vorinkubation des Peptides bei 37 °C keinen Effekt auf das Peptid hatte. Die Stimulation mit Peptid + Hsp70 ohne Komplexierung diente in den meisten Experimenten als Kontrolle. Daneben wurden als weitere Kontrolle die antigenen Peptide meist auch mit irrelevanten Proteinen wie HSA oder Hsc70-ATPase vorinkubiert, was ebenfalls nicht zu einer Proliferationsverstärkung führte (s. Abb. 4.25 und 4.28)

#### **4.4.11 Mit Hsp70:Peptid-Komplexen generierte T-Zellen sind antigenspezifisch**

Die Methode der CFSE-Proliferationsmessung hat gegenüber Methoden wie dem <sup>3</sup>H-Thymidineinbau den Vorteil, dass noch weitere Parameter der proliferierten Zellen bestimmt werden können. In den bis hierher vorgestellten Ergebnissen wurden die proliferierten Zellen zusätzlich auf die Expression des T-Zell Ko-Rezeptors CD4 untersucht, um zu zeigen, dass CD4<sup>+</sup> T-Zellen aktiviert wurden. Es konnte gezeigt werden, dass Stimulation mit Hsp70:Peptid-Komplexen mit niedrigen Peptidkonzentrationen und reduzierter APZ-Zahl die Proliferation von CD4<sup>+</sup> T-Zellen verstärkt. Jedoch ist nicht klar, ob diese mit Hsp70:Peptid-Komplexen generierten T-Zellen tatsächlich spezifisch für das eingesetzte Antigen sind.

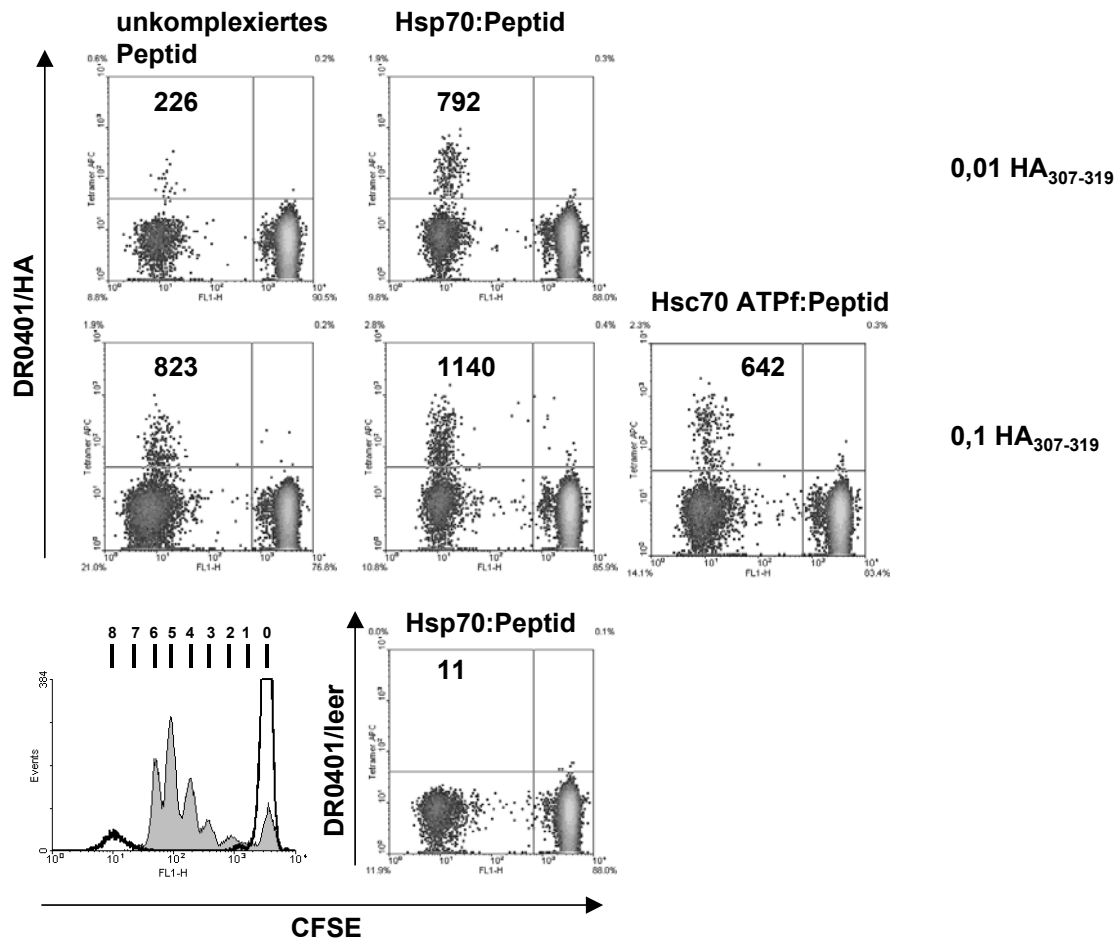
In den meisten Experimenten wurde bei unstimulierten Proben weniger als 1 % CD4<sup>+</sup> T-Zellproliferation gemessen. Lipopolysaccharid (LPS) konnte in den bisher gezeigten Versuchen nicht als Kontrolle verwendet werden, da es selbst eine Proliferation von T-Zellen stimuliert. Diese Zellen sind sicher nicht antigenspezifisch, eine sinnvolle Auswertung ist aber nur möglich, wenn die tatsächliche Anzahl antigenspezifischer Zellen ermittelt werden kann.

Um herauszufinden, ob und wie viele der proliferierten CD4<sup>+</sup> T-Zellen tatsächlich spezifisch auf das verwendete Antigen reagieren, wurden die CD4<sup>+</sup> T-Zellen mit HLA-DR-Tetrameren gefärbt, die mit dem entsprechenden antigenen Peptid beladen waren (s. 3.12). Dazu wurden CFSE-gefärbte CD4<sup>+</sup> T-Zellen genau wie in den bisher beschriebenen Versuchen mit Peptiden oder Hsp70:Peptid-Komplexen stimuliert und

für 6 Tage in Kultur genommen (s. 3.10). Dann wurden die Zellen mit HLA-DR-Tetrameren, anti-CD4 und Propidium-Iodid gefärbt (s. 3.13.2) und im FACS analysiert. Bei der Auswertung wurde die Darstellung durch das Setzen von „Gates“ im FSC/SSC-Diagramm auf Lymphozyten und im anti-CD4-PE/SSC-Diagramm auf CD4-positive T-Lymphozyten eingeschränkt. Tote Zellen wurden mittels Propidium-Iodid ausgeschlossen (doppelt positive Zellen im FL2/FL3-Diagramm). In den folgenden Abbildungen werden CFSE-Verlust (x-Achse) und Antigen-spezifität (y-Achse) von lebenden CD4<sup>+</sup> T-Zellen dargestellt.

Abb. 4.25 zeigt die FACS-Analyse der CD4<sup>+</sup> T-Zellen des DRB1\*0401-Spenders 105. Die T-Zellen wurden mit verschiedenen Konzentrationen HA<sub>307-319</sub>-Peptid stimuliert. Es wurde unkomplexiertes Peptid, Hsp70-komplexiertes Peptid und Peptid das mit Hsc70-ATPf als Kontrollprotein vorinkubiert war, verwendet. Obwohl es sich um ein Experiment handelt, bei dem auch ohne Stimulation CFSE-negative Zellen beobachtet wurden, kann durch die Färbung mit peptid-beladenen HLA-DR-Tetrameren die Auswertung des Versuches auf die tatsächlich antigenspezifischen Zellen beschränkt werden.

In Abb. 4.26 ist ein ähnliches Experiment mit einem DRB1\*1101-Spender und unkomplexiertem oder Hsp70-komplexiertem TT<sub>947-966</sub>-Peptid gezeigt.



**Abb. 4.25**

Detektion antigenspezifischer CD4<sup>+</sup> T-Zellen mittels HLA-DR-Tetrameren bei einem DRB1\*0401-positiven Donor. Stimulation mit Hsp70:Peptid-Komplexen führt zu einer verstärkten Proliferation antigenspezifischer CD4<sup>+</sup> T-Zellen.

2 x 10<sup>5</sup> CFSE-gefärbte CD4<sup>+</sup> T-Zellen des DRB1\*0401 Spenders 105 wurden mit 0,01 oder 0,1 µg/ml HA<sub>307-319</sub> Peptid mit oder ohne Komplexierung an 1 µg/ml Hsp70 stimuliert. Sonstige experimentelle Bedingungen wie in Abb. 4.21, APZ:CD4<sup>+</sup> T-Zellratio 1:1. Proben wurden mittels FACS an Tag 6 mit DRB1\*0401/HA<sub>307-319</sub> Tetramer auf ihre Antigen-spezifität untersucht. Zellen wurden auf CD4<sup>+</sup> Lymphozyten gated, tote Zellen durch Färbung mit Propidium-Iodid ausgeschlossen.

Als Kontrolle wurden die Zellen mit einem leeren DRB1\*0401 Tetramer gefärbt (unten rechts).

Die Zahl der Zellteilungen wurde mittels den definierten Fluoreszenz-Peaks einer SEB-stimulierten Probe abgeschätzt (Histogramm unten links): Das CFSE-Histogramm der mit HA<sub>307-319</sub> 0.01:Hsp70 stimulierten Probe (Linie) und der mit SEB 2.0 µg/ml stimulierten Probe (grau ausgefüllt) ist als Overlay dargestellt und ergibt eine Gesamtzahl von 8 Teilungen.

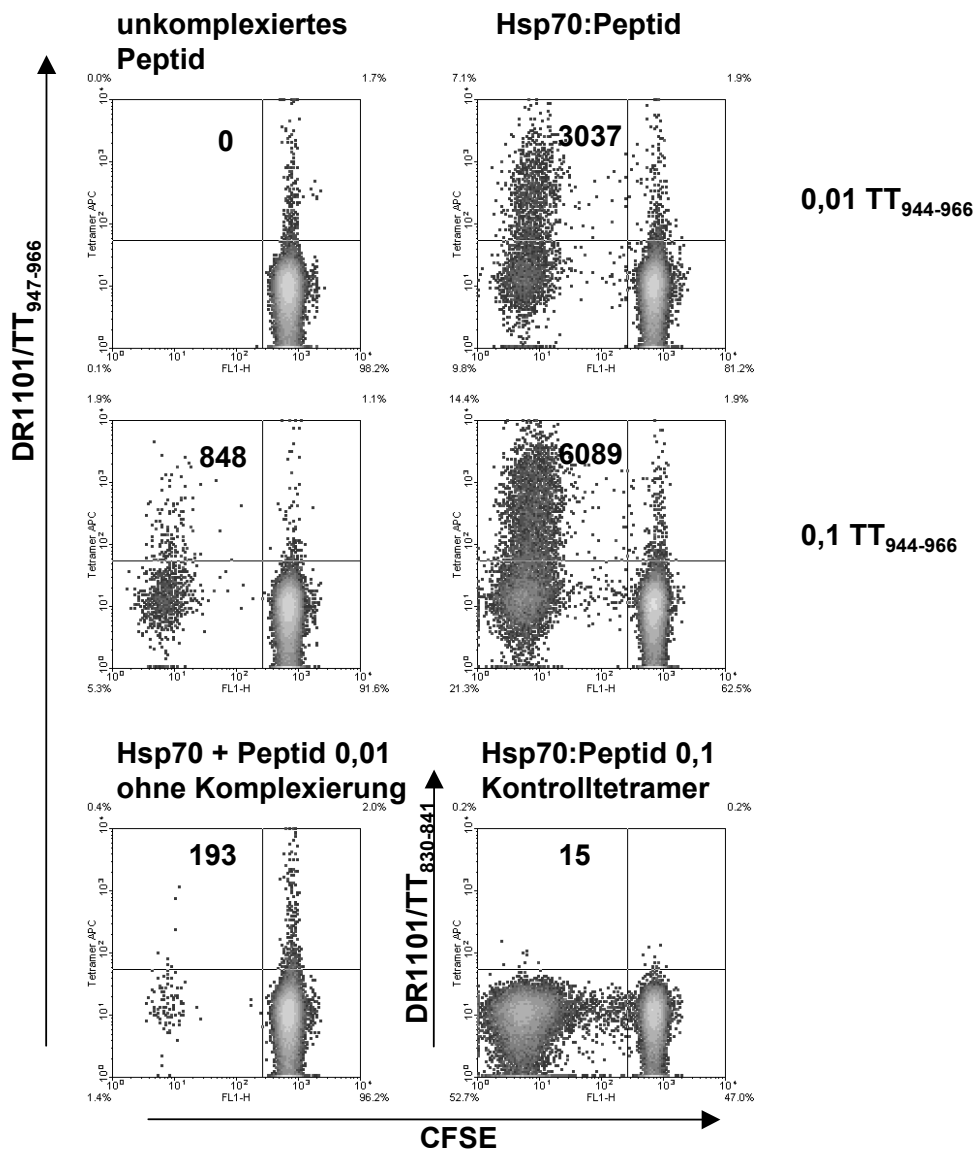


Abb. 4.26

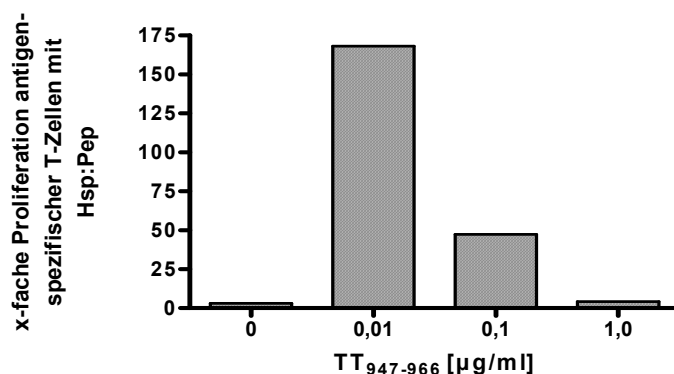
Verstärkte Proliferation antigenspezifischer CD4<sup>+</sup> T-Zellen eines DRB1\*1101-Donors bei Stimulation mit Hsp70:Peptid-Komplexen.

Stimulation der CD4<sup>+</sup> T-Zellen eines DRB1\*1101 Donors erfolgte mit 0,01 und 0,1 µg/ml unkomplexiertem TT<sub>947-966</sub>-Peptid (linke Seite), 0,01 und 0,1 µg/ml Peptid komplexiert an Hsp70 (rechte Seite) und 0,01 µg/ml Peptid + Hsp70 ohne vorausgehende Komplexierung (unten links). Experimentelle Bedingungen wie in Abb. 4.21, APZ:CD4<sup>+</sup> T Zellratio 1:5.

Es ist jeweils das Punktediagramm der ersten von drei individuell stimulierten Proben der selben Konzentration dargestellt. Antigen-spezifische Zellen wurden mit DRB1\*1101/TT<sub>947-966</sub>-Tetramer detektiert, als irrelevanter Kontrolltetramer wurde DRB1\*1101/TT<sub>830-844</sub> verwendet (unten rechts). Mit einer SEB-stimulierten Probe wurde wie in Abb 4.25 eine Gesamtzahl von 8 Teilungen abgeschätzt (Daten nicht gezeigt).

In beiden Experimenten (Abb. 4.25 und 4.26) wurde bei Stimulation mit Hsp70:Peptid-Komplexen eine erhöhte Anzahl Tetramer-spezifischer T-Zellen gegenüber der Stimulation mit Peptid alleine gefunden, insbesondere bei sehr niedrigen Peptidkonzentrationen (0,01 µg/ml). Peptid alleine musste wiederum in deutlich höheren Konzentrationen eingesetzt werden, um eine signifikante Proliferation antigenspezifischer T-Zellen zu bewirken. Die Stimulation mit Hsp70:Peptid-Komplexen bewirkt also schon in sehr niedrigen Peptid-Konzentrationen die Proliferation von antigenspezifischer CD4<sup>+</sup> T-Zellen.

Dass die Aktivierung antigenspezifischer T-Zellen mit Hsp70:Peptid-Komplexen in sehr niedrigen Peptidkonzentrationen der Stimulation mit Peptid alleine deutlich überlegen ist, zeigt auch das in Abb. 4.27 gezeigte Experiment mit 3 unterschiedlichen Peptidkonzentrationen. Bei Stimulation mit einer sehr geringen Peptidmenge (0,01 µg/ml) werden nach Vorinkubation mit Hsp70 ca. 175 mal mehr antigenspezifische T-Zellen aktiviert als mit dem Peptid alleine, mit steigenden Peptidkonzentrationen nimmt der Effekt einer Vorinkubation des Peptides mit Hsp70 gegenüber der Stimulation mit dem Peptid alleine immer mehr ab.



**Abb. 4.27**

CD4<sup>+</sup> T-Zellen eines DRB1\*1101-Donors wurden mit 3 verschiedenen Konzentrationen TT<sub>947-966</sub>-Peptid bzw. Hsp70:TT2-Komplexen stimuliert. Experimentelle Bedingungen wie in Abb. 4.26. An Tag 6 wurde die Anzahl tetramerspezifischer CD4<sup>+</sup> T-Zellen bestimmt. Für jede Konzentration wurde das Verhältnis aus der Anzahl proliferierter tetramerspezifischer Zellen (CFSE<sup>low</sup>DR1101/TT<sub>947-966</sub><sup>+</sup>) bei Stimulation mit Hsp:Peptid-Komplexen und Peptid alleine gebildet, der Quotient gibt die x-fache Verstärkung der Proliferation mit Hsp70:Peptid-Komplexen an (s. a. Abb. 4.21).

Hsc70-ATP<sub>f</sub>, das in dem in Abb. 4.25 gezeigten Versuch als Kontrollprotein eingesetzt wurde, führte nicht zu einer verstärkten Proliferation antigenspezifischer Zellen. Bei Hsc70-ATP<sub>f</sub> handelt es sich um das ATase-Fragment des Hsc70-Proteins, dem die Peptidbindungsdomäne fehlt, das aber wie das hier benutzte Hsp70 rekombinant in *E.coli* exprimiert und laut Herstellerangabe in einem vergleichbaren Verfahren gereinigt wird.

Stimulation der Zellen des DRB1\*1101-Donors in Abb. 4.26 mit antigenem Peptid + Hsp70 ohne vorausgehende Komplexierung führt nicht zur Proliferation einer größeren Anzahl antigenspezifischer T-Zellen (193 Zellen mit Hsp70 + Peptid gegenüber 3037 mit Hsp70:Peptid). Dies bestätigt wie schon in Abb. 4.24 gezeigt, dass die Komplexierung der Peptide an Hsp70 für die Proliferationsverstärkung essentiell ist.

In Abb. 4.25 wurden mit 0,01 µg/ml Peptid 226 DRB1\*0401/HA<sub>307-319</sub>-spezifische T-Zellen gefunden. Die Anzahl der aktivierten Vorläufer-T-Zellen lässt sich mit folgender Formel abschätzen: Anzahl der aktivierten Vorläufer-Zellen =  $X/2^n$ , wobei n die Anzahl der Zellteilungen ist und X die Anzahl gemessener Tetramer-positiver Zellen. Basierend auf den Maxima der Fluoreszenz-Peaks der mit SEB stimulierten Kontrolle wurde in den meisten Experimenten eine Gesamtzahl von 8 Zellteilungen der mit antigen stimulierten T-Zellen im Zeitraum von 6 Tagen gefunden (Abb. 4.25 unten links). Die analysierte Gesamtzellzahl betrug 50000, davon wurden 38400 als lebende CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten identifiziert. Mit diesen Angaben lässt sich errechnen, dass mit 0,01 µg/ml unkomplexiertem Peptid ungefähr eine DRB1\*0401/HA<sub>307-319</sub>-spezifische Vorläufer-T-Zelle in 43500 eingesetzten CD4<sup>+</sup> T-Zellen aktiviert wurde. Zum Vergleich wurde eine Vorläufer-Zelle in 13000 T-Zellen aktiviert, wenn 0,01 µg/ml Peptid mit Hsp70 komplexiert wurde, mit Hsp70 wurden also 3,3 mal mehr Vorläufer-Zellen aktiviert.

In dem in Abb. 4.26 gezeigten Experiment ist die Überlegenheit der Stimulation mit Hsp70:Peptid-Komplexen noch deutlicher: Stimulation mit 0,01 µg/ml Peptid komplexiert mit Hsp70 führte zur Detektion von 3037 DRB1\*1101/TT<sub>947-966</sub>-spezifischen T-Zellen, was einer rechnerischen Aktivierung von einer Vorläuferzelle in 3500 ursprünglich eingesetzten T-Zellen entspricht (3037 antigenspezifische Zellen in 42100 lebenden CD4<sup>+</sup> T-Zellen, 8 Zellteilungen). Mit unkomplexiertem Peptid wurden in der Konzentration 0,01 µg/ml keine antigenspezifischen Zellen

gefunden, mit Hsp70 + Peptid ohne vorherige Komplexierung wurden 193 tetramer-positive Zellen gefunden, was rechnerisch die Aktivierung einer Vorläuferzelle in 57500 Zellen ergab, es wurden also über 16 mal mehr Vorläufer-Zellen aktiviert, wenn das Peptid mit Hsp70 komplexiert wurde. Die in Abb. 4.26 gezeigten Punktediagramme zeigen jeweils die Daten für die erste von 3 individuell stimulierten Proben je Peptidkonzentration.

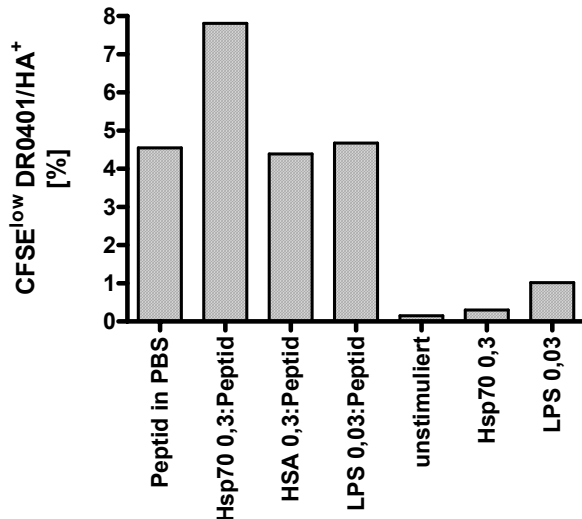
#### **4.4.12 Kontrollproteine verstärken nicht die Proliferation antigenspezifischer CD4<sup>+</sup> T-Zellen**

In den meisten Experimenten wurden die antigenen Peptide als Kontrolle mit einer der Hsp70-Konzentration äquivalenten Menge an Kontrollproteinen vorinkubiert. Als Kontrollproteine wurden unter anderem HSA und Hsc70-ATPf verwendet. Diese Proteine führten in der Regel ohne Peptid zu keiner Proliferation, eine Verstärkung der CD4<sup>+</sup> T-Zellantwort nach Vorinkubation mit antigenem Peptid wurde nicht gefunden. Abb. 4.28 zeigt die Stimulation von isolierten CD4<sup>+</sup> T-Zellen eines DRB1\*0401-Spenders mit unkomplexiertem HA<sub>307-319</sub>-Peptid, sowie dem Peptid komplexiert mit Hsp70 (0,3 µg/ml), HSA (0,3 µg/ml) und LPS (0,03 µg/ml). Im Gegensatz zur Vorinkubation mit Hsp70 führte die Vorinkubation mit den Kontrollproteinen HSA und LPS zu keiner verstärkten Proliferation antigenspezifischer CD4<sup>+</sup> T-Zellen.

Die Hsp70-Präparation, die in den meisten Experimenten verwendet wurde, stammt rekombinant aus *E.coli* Bakterien und kann damit mikrobielle Verunreinigungen wie LPS enthalten. Diese in der Zellmembran gram-negativer Bakterien enthaltenen Endotoxine können einen eigenen Effekt auf APZs und die Proliferation von CD4<sup>+</sup> T-Zellen haben (Bausinger *et al.* 2002; Gao und Tsan 2003; MacAry *et al.* 2004). Die in den meisten Versuchen verwendete Hsp70-Präparation besaß laut Herstellerangaben eine Reinheit von >90 %, mit SDS-PAGE und Silberfärbung (s. 3.4) konnten keine Banden durch Verunreinigungen detektiert (Daten nicht gezeigt). Als Kontrollprotein wurde daher auch reines LPS eingesetzt. LPS führte in einer Menge von 0,03 µg/ml (das entspricht 10 % der Hsp70-Konzentration in den meisten Experimenten) bereits zu einer sehr starken T-Zellproliferation (bis zu 50 % proliferierte Zellen, Daten nicht gezeigt), während die Hsp70-Präparation alleine auch



in höheren Konzentrationen zu keiner Proliferation führte, z. B. 1 µg/ml (s. Abb. 4.20) oder mehr (Daten nicht gezeigt).



**Abb. 4.28**

Nur die Vorinkubation des antigenen Peptides mit Hsp70, nicht aber mit Kontrollproteinen führt zu einer verstärkten Proliferation antigen-spezifischer CD4<sup>+</sup> T-Zellen.

CD4<sup>+</sup> T-Zellen eines DRB1\*0401-Donors wurden mit 1 µg/ml HA<sub>307-319</sub>-Peptid stimuliert, sonstige experimentelle Bedingungen wie in Abb. 4.25. Das Peptid wurde in PBS oder PBS mit Hsp70 oder einem der Kontrollproteine HSA oder LPS vorinkubiert. Hsp70 und HSA wurden in der Konz. 0,3 µg/ml verwendet, die LPS-Konz. betrug 0,03 µg/ml. Zusätzlich wurden CD4<sup>+</sup> T-Zellen mit PBS, Hsp70 und LPS alleine (ohne Peptid) stimuliert. Die y-Achse stellt die Prozentzahl proliferierter antigenspezifischer T-Zellen dar (CFSE<sup>low</sup> DRB1\*0401/HA<sup>+</sup>, Gate auf CD4<sup>+</sup>).

Nur mittels der HLA-DR-Tetramer-Färbung kann zwischen unspezifisch durch LPS stimulierten Zellen und antigenspezifischen Zellen unterschieden werden. Abb. 4.28 zeigt, dass die Vorinkubation des antigenen Peptides mit LPS und anderen Kontrollproteinen keinen Einfluss auf die Anzahl proliferierter Zellen hat, die DRB1\*0401/HA<sub>307-319</sub>-spezifisch binden. Das antigene Peptid wurde mit 0,03 µg/ml LPS vorinkubiert (10 % der Hsp70-Konzentration), Vorinkubation mit anderen Kontrollproteinen (HSA, Hsc70-ATPf) erfolgte in gleicher Konzentration wie die Inkubation mit Hsp70. Der Versuch zeigt, dass nur die Vorinkubation mit Hsp70 zu einer verstärkten Proliferation antigenspezifischer CD4<sup>+</sup> T-Zellen führt.

## 5 DISKUSSION

Die RA ist eine chronische, entzündliche Autoimmunerkrankung des Erwachsenen (Feldmann *et al.* 1996). Obwohl viele Details der Pathogenese bis heute ungeklärt sind, gilt als sicher, dass die Entstehung eng mit der Expression bestimmter HLA-Moleküle assoziiert ist. Die SE-Hypothese geht davon aus, dass das Risiko an RA zu erkranken deutlich erhöht ist, wenn HLA-DR-Moleküle exprimiert werden, die das SE-Epitop (AS-Sequenz <sup>70</sup>QKRAA<sup>74</sup>, <sup>70</sup>QRRAA<sup>74</sup>, <sup>70</sup>RRRAA<sup>74</sup>, z. B. DRB1\*0401 oder DRB1\*0101) in der  $\beta$ 1-Kette besitzen (Gregersen *et al.* 1987). Umgekehrt geht die RA-Protektionshypothese davon aus, dass die RA-Prädisposition durch bestimmte HLA-DQ-Allele vermittelt wird und HLA-DR einen modulierenden Effekt auf diese Prädisposition hat (Zanelli *et al.* 1995; Zanelli *et al.* 2000b). In diesem Modell wird einigen HLA-DR-Allelen eine starke Protektion vor RA zugeschrieben (z. B. DRB1\*0402, \*1301 und \*1302). Diese protektiven HLA-DR-Moleküle besitzen eine auffällige Gemeinsamkeit: Sie exprimieren alle die AS-Sequenz <sup>70</sup>DERAA<sup>74</sup> in der HV3-Region der  $\beta$ 1-Kette. Allerdings kann keines der beiden Modelle alle im Zusammenhang mit der Pathogenese der RA gefundenen HLA-Assoziationen vollständig erklären. Heute wird davon ausgegangen, dass es sich bei der Pathogenese der RA wohl um einen multifaktoriellen Prozess handelt, bei dem neben dem HLA-DR- und dem HLA-DQ-Haplotyp auch noch weitere Faktoren eine Rolle spielen. Die Expression bestimmter HLA-DR-Allele kann dabei das Risiko an RA zu erkranken stark erhöhen (insbesondere die homozygote Expression von HLA-DR-Molekülen mit dem SE), wohingegen andere Allele dieses Risiko reduzieren (vor allem Allele mit der AS-Sequenz <sup>70</sup>DERAA<sup>74</sup>) (Zanelli *et al.* 2000a).

1996 wurde von Auger *et al.* beschrieben, dass Peptide mit der SE-Sequenz mit an das *E.coli* HSP70-Molekül DnaK binden können (Auger *et al.* 1996). HSP70-Moleküle können vielfältige Aufgaben erfüllen (s. 1.6), daher eröffnete eine Interaktion RA-assoziiierter HLA-DR-Peptidfragmente mit HSP70-Molekülen neue Ansatzpunkte zur Diskussion der Mechanismen, die bei der SE-Hypothese und der HLA-Assoziation der RA von Bedeutung sind. Als Mechanismus wurde unter anderem vermutet, dass SE-positive HLA-DR-Moleküle an HSP70 gebunden über Membrangrenzen hinweg direkt in die MHC II-Beladungskompartimente transportiert werden, was in einer schnelleren und verstärkten Antigenpräsentation der SE-positiven HLA-DR-Moleküle resultieren könnte (Ollier *et al.* 1996).

Diese interessante Entdeckung, dass HSP70-Moleküle mit SE-positiven Peptiden interagieren können, bildete die Grundlage für die im ersten Teil dieser Arbeit näher untersuchte Interaktion von HSP70-Molekülen mit verschiedenen HLA-DR-Peptidfragmenten. In der hier vorgestellten Arbeit wurde dazu das Bindungsverhalten von HLA-DR-Peptidfragmenten mit verschiedenen HSP70-Molekülen in qualitativen und quantitativen Bindungsexperimenten charakterisiert.

Ob auch die zu den Peptidfragmenten korrespondierenden ganzen HLA-DR-Moleküle spezifisch mit HSP70 interagieren können wurde anschließend in quantitativen Bindungsexperimenten mit aus Zelllinien isolierten und rekombinanten HLA-DR-Molekülen untersucht.

Es liegt nahe, dass eine direkte Interaktion von HSP70 mit HLA-DR-Molekülen die Präsentation antigener Peptide über MHC II beeinflussen kann. Damit könnte der HSP70-HLA-DR-Interaktion eine wichtige Rolle in der CD4<sup>+</sup> T-Zellantwort auf (auto-) antigene Peptide zukommen. In T-Zellexperimenten wurde daher untersucht, ob HSP70 die Präsentation antigener Peptide via MHC II und damit die Proliferation antigenspezifischer CD4<sup>+</sup> T-Zellen beeinflusst und ob dies ein möglicher Mechanismus sein kann, mittels dessen HSP70-Moleküle an der CD4<sup>+</sup> T-Zellantwort und der Pathogenese von Autoimmunerkrankungen wie der RA beteiligt sein können.

## **5.1 Ergebnisse mit HSP70 und Fractogel-gebundenen HLA-DR-Peptidfragmenten**

Mit Fractogel-gebundenen Peptiden wurde die Interaktion von HV3-Peptidsequenzen aus HLA-DRB1-Molekülen mit 3 verschiedenen HSP70-Molekülen untersucht: In Analogie zu Auger *et al.* (1996) mit DnaK, dem HSP70 aus *E.coli*, sowie mit dem stress-induzierbaren, humanen zytosolischen Hsp70 und dem konstitutiv exprimierten zytosolischen Hsc70. Es wurde die HSP70-Interaktion mit allen natürlicherweise in HLA-DRB1-Molekülen gefundenen HV3-Sequenzen getestet. Im Gegensatz zu Auger *et al.* konnte eine Interaktion der meisten in HLA-DR-Molekülen gefundenen HV3-Sequenzen mit allen 3 getesteten HSP70-Molekülen gezeigt werden (s. Abb. 4.1). Eine wichtige Ausnahme bildete lediglich das Peptid mit der Sequenz <sup>70</sup>DERAA<sup>74</sup>, die als einzige zu keinem der getesteten HSP70-Moleküle eine Affinität zeigte. Interessanterweise ist es gerade diese Sequenz, die in allen in der RA-Protektionshypothese als protektiv beschriebenen HLA-DR-Molekülen vorkommt.

Als weiteres Peptid mit reduzierter HSP70-Affinität wurde nur die Sequenz  $^{70}\text{DRAAA}^{74}$ , z. B. aus HLA-DRB1\*1603 gefunden, die zwar keine Affinität zu Hsp70 und Hsc70 hatte, wohl aber zu DnaK.

Für die Bindung von Peptiden an HSP70-Moleküle ist eine kurze, ca. 5 AS lange, Peptidsequenz entscheidend. Allerdings spielen bei der Bindung des Peptides auch die AS eine Rolle, die diese Sequenz flankieren (Rudiger *et al.* 1997a, Rudiger *et al.* 1997b). Da die AS in den Positionen  $\beta 65-69$  und  $\beta 76-79$  nicht zur hypervariablen Region gehören, unterscheiden sie sich in den verschiedenen HLA-DR-Molekülen kaum. Mit Fractogel-Säulen, auf deren Oberfläche 15 AS lange Peptide synthetisiert waren ( $^{65}\text{KDLLEQKRAAVDTYC}^{79}$  aus DRB1\*0401 und  $^{65}\text{KDILEDERRAAVDTYC}^{79}$  aus DRB1\*0402) wurden deshalb die mit den kurzen Peptidsequenzen durchgeführten Experimente wiederholt. Das Bindungsmuster konnte auch mit diesen verlängerten Peptiden bestätigt werden: Bindung für das SE-Peptid, Nicht-Bindung für das Peptid mit der RA-protaktiven Sequenz  $^{70}\text{DERAA}^{74}$  (s. Abb. 4.2).

Das in der hier vorgestellten Arbeit gefundene Bindungsmuster (Bindung aller HLA-DR-Peptidfragmente an HSP70 mit Ausnahme der protektiven  $^{70}\text{DERAA}^{74}$ -Sequenz) widerspricht den von Auger *et al.* (1996) beschriebenen Ergebnissen (nur SE-Peptide binden an HSP70). Eine Ursache für diese Diskrepanz kann möglicherweise in der hier verwendeten sensitiveren Methode begründet sein. Es wurde mit Fractogel-gebundenen Peptiden gearbeitet, die sich im Gegensatz zur Methode Sepharose-gebundener Peptide durch eine außerordentlich hohe Beladung korrekt gebundener Peptide auszeichnet (s. 3.1). Gebundenes HSP70 wurde nach gründlichem Waschen sauer eluiert und mittels SDS-PAGE und Silberfärbung detektiert. Im Vergleich zur Färbung mit Coomassie-Farbstoff erlaubt die Silberfärbung die Detektion wesentlich geringerer Proteinmengen auf den Gelen (Coomassie ca. 500 ng je Bande, Silberfärbung ca. 1 ng Protein je Bande in 12-well Gelen, Quelle: Invitrogen NuPAGE manual). Durch dieses Verfahren können auch sehr schwache Peptidaffinitäten mit geringen Mengen gebundenem Protein noch detektiert werden.

Die von Auger *et al.* gefundene Affinität von SE-Peptiden an DnaK (Auger *et al.* 1996) sowie die kurz darauf beschriebene Ko-Präzipitation von HSP70 mit SE-positiven HLA-DR-Molekülen (Auger und Roudier 1997) sind allerdings nicht unumstritten: Rich *et al.* (1998) fanden in Versuchen mit mehreren Zelllinien eine

unspezifische Ko-Präzipitation von HSP70 mit verschiedenen HLA-Molekülen. Dabei spielte es keine Rolle, ob die HLA-DR-Moleküle der Zelllinien das SE besaßen oder nicht. In einer neueren Arbeit haben Auger *et al.* (2002) versucht zu zeigen, dass das konstitutiv exprimierte Hsc70 doch differentiell mit verschiedenen HLA-DR-Varianten interagiert. In quantitativen Präzipitationsexperimenten haben sie eine schwach differentielle Interaktion verschiedener HLA-DR-Moleküle mit Hsc70 beschrieben. Immunpräzipitationsexperimente besitzen den Nachteil, dass sie schlecht zu quantifizieren sind und es oft schwierig ist, unspezifische von spezifischen Wechselwirkungen zu unterscheiden. Da insgesamt nur eine schwach differentielle Interaktion gefunden wurde, sind diese neueren Ergebnisse von Auger *et al.* eher kritisch zu bewerten.

In der hier vorgestellten Arbeit wurde eine HSP70-Interaktion aller HV3-Sequenzen aus HLA-DR mit Ausnahme von <sup>70</sup>DERAA<sup>74</sup> gefunden. Diese Ergebnisse könnten dazu beitragen, die Diskrepanz der verschiedenen Arbeiten zu erklären: Die von Auger *et al.* (1996) verwendete Methode war nicht sensitiv genug, um neben den SE-Peptiden auch die Bindung anderer HLA-DR-Peptidfragmente an HSP70-Moleküle zu detektieren. Möglicherweise waren die Experimente von Rich *et al.* (1998) sensitiver und daher wurde eine „unspezifische“ Ko-Präzipitation sowohl SE-positiver als auch SE-negativer HLA-DR-Moleküle mit HSP70 gefunden.

Die bisher gezeigten Experimente haben nur das Bindungsverhalten der HV3-Peptidfragmente aus HLA-DR an HSP70 untersucht. Analog zu den Arbeiten von Auger *et al.* (Auger *et al.* 1996; Auger und Roudier 1997) und Rich *et al.* (1998) war es natürlich wichtig, neben den Peptidfragmenten auch die Interaktion ganzer HLA-DR-Moleküle mit HSP70 zu untersuchen, um mehr Licht in die HSP70-HLA-DR-Interaktion zu bekommen. Daher sollte später in dieser Arbeit die Interaktion zwischen HSP70 und intakten HLA-DR-Molekülen charakterisiert werden (s. 4.3).

Mit den im „Asparaginsäure-Scan“ modifizierten Fractogel-gebundenen Peptiden konnten Informationen zur Substratbindungsspezifität der HSP70-Moleküle erhalten werden. Die SE-Sequenzen (<sup>70</sup>QKRAA<sup>74</sup>, <sup>70</sup>QRRAA<sup>74</sup>, <sup>70</sup>RRRAA<sup>74</sup>) besitzen in Position β70 und β71 AS mit großen, neutralen oder positiv geladenen Seitenketten (Q, K, R), wohingegen die <sup>70</sup>DERAA<sup>74</sup>-Sequenz in Position β70 und β71 AS mit negativ geladenen Seitenketten (D und E) besitzt. Im „Asparaginsäure-Scan“ wurde daher jeweils eine Position der gut bindenden <sup>70</sup>QKRAA<sup>74</sup>-Sequenz durch die negativ

geladene Asparaginsäure (D) aus der nicht-bindenden Sequenz ersetzt. Es zeigte sich, dass die modifizierten Peptide  $^{70}\text{QDRAA}^{74}$  und  $^{70}\text{QKDAA}^{74}$  keine Affinität mehr zu DnaK, Hsc70 und Hsp70 besaßen. Dieses Ergebnis zeigt, dass eine AS mit negativ geladener Seitenkette (D und E) in Position 2 und 3 der Peptide (entsprechend Position  $\beta 71$  und  $\beta 72$  der HLA-DR-Moleküle) eine Bindung der Peptide an DnaK, Hsc70 und Hsp70 verhindert. Diese Ergebnisse zur Substratbindungsspezifität der HSP70-Moleküle decken sich gut mit den Daten aus der Literatur, wo für die hier verwendeten HSP70-Moleküle vor allem eine Affinität zu Peptidsequenzen mit hydrophoben oder positiv geladenen AS-Resten beschrieben wird und Sequenzen mit negativ geladenen AS-Resten von der Bindung ausgeschlossen sind (de Crouy *et al.* 1996; Flynn *et al.* 1989; Gragerov und Gottesman 1994; Rudiger *et al.* 1997a; Rudiger *et al.* 1997b; Takenaka *et al.* 1995).

Die SE-Hypothese wird gestützt von röntgenkristallographischen Untersuchungen, die eine besondere Bedeutung der AS-Positionen 70, 71 und 74 der  $\beta$ -Kette für die Peptidbindungseigenschaften der HLA-DR-Moleküle belegt haben (Brown *et al.* 1993). Die  $\beta$ -Kette der HLA-DR-Moleküle enthält einige besonders polymorphe AS-Positionen, die wesentlich an der Bildung von insgesamt 5 Bindungstaschen für die Bindung des antigenen Peptides beteiligt sind (P1-P5). Zur Bildung der P4-Bindungstasche tragen die AS an Position 70, 71, 74 und 29 der  $\beta 1$ -Kette bei. Durch Ergebnisse aus Peptidbindungsversuchen wurde vermutet, dass vor allem die Ladung des AS-Restes an  $\beta 71$  die Peptidbindungseigenschaften des HLA-DR-Moleküls stark beeinflusst (Davenport *et al.* 1997; Hammer *et al.* 1995) und damit eine zentrale Rolle bei der Auswahl der antigenen Peptide spielt, die vom HLA-DR-Molekül gebunden werden können. Diese zentrale Bedeutung von  $\beta 71$  wurde durch die Kristallstruktur eines  $\text{DRA1}^*0101/\text{DRB1}^*0401$ -Moleküls mit einem Kollagenpeptid belegt (Dessen *et al.* 1997).

In RA-assoziierten HLA-DR-Molekülen ( $^{70}\text{QKRAA}^{74}$ , z. B.  $\text{DRB1}^*0401$ ) besitzt  $\beta 71$  eine positiv geladene Seitenkette, in RA-protektiven HLA-DR-Molekülen eine negativ geladene ( $^{70}\text{DERAA}^{74}$ , z. B.  $\text{DRB1}^*0402$ ), was in stark unterschiedlichen Peptidbindungsmotiven dieser HLA-DR-Moleküle resultiert, obwohl  $\text{DRB1}^*0401$  und  $\text{DRB1}^*0402$  außer den Position  $\beta 71$  und  $\beta 72$  praktisch identisch sind (Marsh *et al.* 2000). In einer epidemiologischen Studie wurde 2001 bestätigt, dass die Expression eines HLA-DR-Moleküls mit einer neutralen oder negativen elektrischen Ladung in

der P4-Bindungstasche (z. B. DRB1\*0402) mit einer deutlichen Protektion vor RA einhergeht, wohingegen eine positive Ladung keinen Einfluss auf die Prädisposition hatte oder diese verstärken konnte (Reviron *et al.* 2001).

Ein gut etabliertes Tiermodell der RA ist die Collagen-induzierte Arthritis (CIA) in Mäusen. Im murinen Modell entsprechen den humanen HLA Klasse II Molekülen die H2-A- und H2-E-Moleküle, dabei ist die E $\beta$ -Kette homolog zum humanen HLA-DRB1-Molekül. Um zu untersuchen, ob die mit Peptidsequenzen aus humanen HLA-DR-Molekülen gefundene differentielle HSP70-Interaktion auch für das Mausmodell besteht, wurden verschiedene Peptidsequenzen aus murinen MHC II-Molekülen auf Fractogel-Säulen synthetisiert. Die Peptidsequenzen umfassten dabei die der humanen HV3-Region entsprechenden AS. Auch diese Peptide zeigten eine Affinität zu DnaK in Analogie zu den Sequenzen aus humanen HLA-DR-Molekülen, lediglich für das Peptid mit der HV3-Sequenz DARAS aus H2-E $\beta^d$  wurde keine Interaktion mit DnaK gefunden. Ähnlich der humanen RA ist die Anfälligkeit für CIA mit prädisponierenden und protektiven MHC II-Molekülen assoziiert, Mäuse mit dem Haplotyp H2-A<sup>q</sup> und H2-A<sup>r</sup> sind besonders anfällig für CIA. Allerdings verlieren H2-A<sup>q</sup>-Mäuse, die transgen H2-E $\beta$ -Moleküle erhalten, ihre CIA-Anfälligkeit teilweise. Die stärkste CIA-Protektion vermittelt dabei H2-E $\beta^d$  (Gonzalez *et al.* 1994; Gonzalez *et al.* 1995). Dieses murine MHC II-Molekül besitzt die AS-Sequenz DARAS an der Position, die der HV3-Region humaner HLA-DRB1-Moleküle entspricht. Ähnlich den Ergebnissen mit den Peptidsequenzen aus humanen HLA-DR-Molekülen zeigt dieses Peptid aus dem protektiven HLA-DR-Molekül keine Affinität zu HSP70.

## 5.2 Quantitative Ergebnisse mit HLA-DR-Peptidfragmenten

Der in dieser Arbeit etablierte quantitative Europium-Fluoreszenz-Assay hat es ermöglicht, die mit Fractogel-gebundenen Peptiden erhaltenen Ergebnisse in einem zweiten Verfahren zu reproduzieren und zusätzlich zu quantifizieren. Es ließen sich Aussagen zum pH-Optimum sowie dem K<sub>d</sub>-Wert der Interaktion machen.

Verschiedene Biotin-markierte Peptidsequenzen wurden im Europium-Fluoreszenz-Assay auf ihre Affinität zu DnaK getestet. Darunter waren mehrere Peptide, die die HV3-Regionen verschiedener HLA-DR-Moleküle (Position  $\beta$ 65-77) umfassten. Die höchste Affinität wurde dabei für das Peptid mit der HV3-Sequenz <sup>70</sup>DRRAL<sup>74</sup> gefunden, das beispielsweise in dem weder mit Protektion noch Prädisposition vor

RA assoziierten HLA-DRB1\*0801 vorkommt. In mehreren unabhängigen Sättigungsexperimenten konnte dabei der  $K_d$ -Wert der Interaktion von DnaK mit dem DRB1\*0801-Peptidfragment auf ca. 30  $\mu\text{M}$  bestimmt werden. Der  $K_d$ -Wert gibt die Konzentration an Ligand (Peptid) an, bei der die Hälfte der HSP-Bindungsstellen besetzt sind (gebundenes und abdissoziiertes Peptid im Gleichgewicht). Das Biotin-markierte CLIP<sub>105-117</sub>-Peptid, für das ebenfalls eine Interaktion mit DnaK gefunden wurde, besaß mit einem  $K_d$ -Wert von etwa 10  $\mu\text{M}$  im Vergleich zum DRB1\*0801-Peptid eine 3 x höhere Affinität zu DnaK. Eine Interaktion im  $\mu\text{M}$  Bereich gilt nicht als hochaffine Bindung (diese liegen im nanomolaren Bereich) und könnte daher erklären, warum sensitive Methoden wie die Methode der Fractogel-gebundenen Peptide und die Silberfärbung zu ihrer Detektion angewendet werden mussten (s. 4.1). Die gemessenen  $K_d$ -Werte im niedrigen  $\mu\text{M}$  Bereich korrelieren gut mit den in anderen Arbeiten für HSP70 beschriebenen Dissoziationskonstanten von 10 – 20  $\mu\text{M}$  für antigene Peptide mit HSP70-Bindungsmotiv (Javid *et al.* 2004; MacAry *et al.* 2004). Dass diese HSP-Peptid-Interaktionen durchaus eine physiologische Relevanz besitzen kann, zeigt sich darin, dass bereits mit 120 pM HSP-gebundenem Peptid, für das ein  $K_d$ -Wert von 14  $\mu\text{M}$  an mykobakterielles Hsp70 bestimmt wurde, eine CD8<sup>+</sup> zytotoxische T-Zellantwort ausgelöst werden konnte (MacAry *et al.* 2004).

Die Konkurrenz des Biotin-markierten HLA-DRB1\*0801-Peptides (Bindung an DnaK) durch einen Überschuss unmarkierter Peptide aus verschiedenen HLA-DR-Molekülen (Positionen  $\beta$ 65 - 77) ergab für alle untersuchten Peptide eine konzentrationsabhängige Konkurrenz (Abb. 4.7). Einzige Ausnahme war, wie schon in den Versuchen mit Fractogel-gebundenen Peptiden (s. 4.1), wiederum das Peptid mit der Sequenz <sup>70</sup>DERAA<sup>74</sup>, das ausschließlich in HLA-DR-Molekülen gefunden wird, die mit RA-Protektion assoziiert sind. Dieses Peptid zeigte in den Experimenten selbst in 40-fachem Überschuss zum Indikatorpeptid keine signifikante Konkurrenz. Mit diesem quantitativen Verfahren konnte die mit den Fractogel-gebundenen Peptiden gefundene differentielle Bindung von HLA-DR-Peptidfragmenten an HSP70 in einem zweiten Verfahren quantitativ bestätigt werden.

Im Gegensatz zur Interaktion mit DnaK führte die Bindung des Biotin-markierten HLA-DRB1\*0801-Peptides an humanes, zytosolisches Hsp70 nur zu sehr niedrigen Messwerten. Daher wurden quantitative Hsp70-Bindungsexperimente mit dem Biotin-markierten Peptid CLIP<sub>105-117</sub> durchgeführt, mit dem ausreichende Messwerte erhalten wurden. In den Experimenten mit Hsp70 waren die Unterschiede zwischen



den verschiedenen HLA-DR-Peptidfragmenten weniger deutlich ausgeprägt. Allerdings zeigte auch hier in den verschiedenen Experimenten immer das Peptid mit der <sup>70</sup>DERAA<sup>74</sup>-Sequenz die geringste oder gar keine Konkurrenz (s. Abb. 4.9).

Das pH-Optimum der Bindung des HLA-DRB1\*0801 Peptidfragmentes an HSP70 wurde im Neutralen gefunden (bei pH 6,5 – 7). Mit abnehmendem pH-Wert nahm die DnaK-Affinität des Peptides stark ab, bei pH-Werten von 5 oder darunter war nur noch eine äußerst schwache Bindung der Peptide an DnaK messbar (Abb. 4.5). Diese geringere Affinität bei erniedrigtem pH galt ebenfalls für das untersuchte CLIP-Fragment (Daten nicht gezeigt). Geht man davon aus, dass extrazellulär vorkommende, z. B. durch Zellnekrosen freigesetzte HSP70:Peptid-Komplexe durch rezeptor-vermittelte Endozytose (z. B. CD91) spezifisch in APZs aufgenommen werden, so kann der reduzierten HSP70-Affinität der Peptide im leicht sauren Milieu eine wichtige Bedeutung zukommen: Im Zytosol und im Extrazellulär-Raum herrscht normalerweise ein neutraler pH, HSP70 kann Peptide binden. Nach Internalisierung dieser HSP:Peptid-Komplexe in die APZs werden können die Peptide bei dem erniedrigten pH-Wert in den MHC II-Beladungskompartimenten abgegeben und auf MHC II-Moleküle übertragen werden. Inzwischen wurden auch von anderen Arbeitsgruppen Daten publiziert, die bei erniedrigten pH-Werten meist eine reduzierte Affinität antigener Peptide zu HSP70 beschreiben (Mycko *et al.* 2004). Interessant ist in diesem Zusammenhang auch die Tatsache, dass alle als antigen beschriebenen Peptide, die für diese Arbeit auf ihre Hsp70-Bindung untersucht wurden, im Europium-Fluoreszenz-Assay eine Affinität zu Hsp70 zeigten (s. 4.4.3).

Es konnte in diesem Teil der Arbeit gezeigt werden, dass HSP70-Moleküle (v. a. DnaK) mit HLA-DR-Peptidfragmenten differentiell interagieren können. Dabei bestehen auffälligerweise Unterschiede zwischen Peptidfragmenten aus RA-protaktiven und RA-prädisponierenden HLA-DR-Molekülen. Diese differentielle HSP70-Interaktion mit HLA-DR-Peptidfragmenten (unabhängig von einer Interaktion der ganzen HLA-DR-Moleküle) könnte eine Rolle in der Pathogenese der RA spielen, wenn die HLA-DR-Peptidfragmente selbst als antigene Peptide fungieren.

Dafür spricht, dass in Blut und Synovialflüssigkeit von RA-Patienten erhöhte Mengen löslicher HLA-DR-Moleküle gefunden wurden (Verbruggen *et al.* 2000). Außerdem wurde gezeigt, dass endogene HLA-DR-Peptidfragmente nicht nur vermehrt in MIIC vorkommen, sondern auch prozessiert und über MHC II-Moleküle präsentiert werden

können (Chicz *et al.* 1993). Dabei ist vorstellbar, dass extrazelluläre, lösliche HLA-DR-Moleküle oder -Peptidfragmente durch die Bindung an HSP70 rezeptorvermittelt in die MIIC aufgenommen werden (s. 5.4). Nach eventueller Prozessierung könnten die Peptidfragmente durch die Hsp70-Bindung vor proteasomalem Abbau geschützt und über MHC II präsentiert werden. Dadurch könnten autoreaktive T-Zellen, die bei der Deletion im Thymus nicht eliminiert wurden, aktiviert werden. Das <sup>70</sup>DERAA<sup>74</sup>-Peptid bindet nicht an HSP70 und wird daher auch nicht verstärkt über HLA-DR präsentiert. Es kommt zu keiner Aktivierung autoreaktiver T-Zellen, was die RA-Protektion dieser HLA-DR-Moleküle erklären könnte.

Die mögliche Präsentation von SE-positiven HLA-DR-Peptidfragmenten und das überproportional häufige Vorkommen der QKRAA-Sequenz, z. B. in bakteriellen Proteinen wie DnaJ, unterstützen die Hypothese einer molekularen Mimikry (Albani *et al.* 1992): HLA-DR-Peptide mit der QKRAA-Sequenz werden irrtümlich für eingedrungene bakterielle Antigene gehalten (eventuell nach einer tatsächlichen bakteriellen Infektion), in der Folge kommt es zu einer chronischen Entzündungsreaktion gegen diese Antigene. Allerdings konnte dieses Modell bisher nicht belegt werden und erklärt beispielsweise auch nicht die RA-Assoziation vieler SE-negativer HLA-DR-Moleküle.

Umgekehrt könnte es auch sein, dass die HSP70-gebundenen HLA-DR-Peptidfragmente nicht der Präsentation sondern der Proteolyse zugeführt werden, da HSP70 auch eine wichtige Funktion beim Abbau von Proteinen und Peptiden spielt (s. 1.6). Da das <sup>70</sup>DERAA<sup>74</sup>-Peptid nicht an HSP70 bindet könnte es in dieser Hypothese als einziges HLA-DR-Peptidfragment über MHC II an CD4<sup>+</sup> T-Zellen präsentiert werden. Denkbare Mechanismen einer RA-Protektion wären dabei die Deletion DERAAs-reaktiver T-Zellklone im Thymus oder die Generierung von CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup> T-Regulationszellen. Die Präsentation des <sup>70</sup>DERAA<sup>74</sup>-Peptides über DQ8-Moleküle wurde in der RAP-Hypothese als ein möglicher Mechanismus der RA-Protektion diskutiert. Inzwischen konnte ein humaner T-Zellklon identifiziert werden, der das <sup>70</sup>DERAA<sup>74</sup>-Peptid im Kontext mit DQ8 erkennt (Snijders *et al.* 2001).

Insgesamt kann also als gesichert gelten, dass HLA-DR-Peptidfragmente über MHC II-Moleküle präsentiert werden können. Die meisten dieser Peptidfragmente mit Ausnahme von <sup>70</sup>DERAA<sup>74</sup> können mit HSP70 (v. a. DnaK) interagieren. Dadurch kann HSP70 möglicherweise die Präsentation dieser HLA-DR-Fragmente

beeinflussen. Allerdings kann keiner der erwähnten hypothetischen Mechanismen die Pathogenese der RA mit all ihren HLA-Assoziationen schlüssig erklären. Inzwischen wird eher davon ausgegangen, dass die RA-Pathogenese nicht nur durch die Präsentation eines einzelnen arthritogenen Peptides ausgelöst wird, da ein solches Peptid oder die entsprechende T-Zellantwort in RA-Patienten bis heute nicht gefunden wurde. Aus diesen Gründen ist es eher als unwahrscheinlich einzuschätzen, dass die Reaktion auf ein einzelnes HLA-DR-Peptidfragment, die durch HSP70 beeinflusst wird, eine entscheidende in der RA-Pathogenese spielt.

Weitere interessante Möglichkeiten für einen Einfluss von HSP70 auf die RA-Pathogenese können gefunden werden, wenn HSP70 nicht nur mit den HV3-Peptidfragmenten, sondern auch mit den korrespondierenden ganzen HLA-DR-Molekülen differentiell interagieren würde: HSP70 könnte dann als Peptid-„Carrier“ dienen und gebundene antigene Peptide bei erniedrigtem pH in den Beladungskompartimenten abgeben und direkt in die antigenbindende Spalte der MHC II-Moleküle übertragen. Damit wäre HSP70 direkt an der Auswahl und Präsentation der antigenen Peptide beteiligt. Eine Nicht-Bindung von HSP70 an RA-protektive HLA-DR-Moleküle (<sup>70</sup>DERAA<sup>74</sup>) könnte dann die Präsentation des krankheits-auslösenden autoantigenen Peptides verhindern und so die RA-Protektion dieser Allele erklären. Daher wurde im folgenden Teil der Arbeit die Interaktion von HSP70 mit ganzen HLA-DR-Molekülen untersucht.

### 5.3 Versuche mit intakten HLA-DR-Molekülen

Die Interaktion von intakten, aus Zelllinien isolierten HLA-DR-Molekülen mit HSP70 wurde im Europium-Fluoreszenz-Assay untersucht. Dabei zeigten Biotin-markierte, intakte HLA-DR-Moleküle die stärkste Affinität zum humanen Hsp70. Die Bindung des SE-positiven Biotin-markierten HLA-DRB1\*0801-Moleküls an Hsp70 betrug dabei fast 50 % der Maximalbindung von HLA-DRB1\*0801 an den anti-HLA-DR mAk L-243 (Abb. 4.10). Hsc70, BiP und DnaK zeigten nur eine geringe Affinität zu den HLA-DR-Molekülen (< 10 % der Maximalbindung), HSA als Kontrollprotein zeigte keine HLA-DR-Affinität. Die starke Interaktion mit dem mAk L-243 zeigte, dass die verwendete HLA-DR-Präparation tatsächlich intakte HLA-DR-Moleküle enthält. Wie bereits erwähnt erkennt dieser Antikörper nur das intakte HLA-DR-Molekül aus  $\alpha$ - und  $\beta$ -Kette (Klohe *et al.* 1988), nicht aber die einzelnen Ketten nach deren

Denaturierung (keine Detektion der einzelnen Banden von  $\alpha$ - und  $\beta$ -Kette im Western-Blot, reduzierte Fluoreszenz denaturierter HLA-DR-Moleküle im Europium-Fluoreszenz-Assay, Daten nicht gezeigt).

Da HSP70-Moleküle mit einer großen Vielfalt hydrophober Peptidsequenzen interagieren können, musste ausgeschlossen werden, dass die gefundene Affinität zu den ganzen HLA-DR-Molekülen durch die Bindung an hydrophobe Anteile von ganz oder teilweise denaturierten HLA-DR-Molekülen verursacht wird. Peptidsequenzen mit hohem Anteil an hydrophoben Aminosäureresten befinden sich normalerweise im Inneren von Proteinen und sind durch Wechselwirkungen mit anderen hydrophoben Aminosäureresten an der Ausbildung und dem Zusammenhalt der Tertiärstruktur beteiligt. Unter Stressbedingungen kann die Tertiärstruktur von Proteinen beschädigt werden, die hydrophoben Proteinanteile gelangen an die Proteinoberfläche. Zu den physiologischen Funktionen von HSP-Molekülen gehört es, mit diesen hydrophoben Anteilen zu interagieren und dafür zu sorgen, dass das Protein regeneriert oder der Proteolyse zugeführt wird.

Durch verschiedene denaturierende Bedingungen wurde der Anteil denaturierter, hydrophober HLA-DR-Moleküle erhöht. Unter diesen Konditionen zeigten die HLA-DR-Moleküle eine reduzierte spezifische Bindung an Hsp70, während die unspezifische Hintergrundbindung an das Blockierungsreagenz deutlich zunahm (s. Abb. 4.11). Dieses Ergebnis liefert ein weiteres Indiz dafür, dass es sich bei der Interaktion zwischen HLA-DR und Hsp70 tatsächlich um eine spezifische Interaktion mit den intakten HLA-DR-Molekülen handelt.

In verschiedenen Sättigungsexperimenten mit Biotin-markiertem HLA-DRB1\*0801 und HLA-DRB1\*0401 wurden  $K_d$ -Werte bestimmt, die jeweils im Bereich von ca. 90 – 150 nM lagen (s. 4.3.4). Die Bindung der ganzen Moleküle an Hsp70 besitzt damit eine ungefähr 200 x höhere Affinität als die Interaktion der Peptidfragmente mit DnaK (ungefähr 30  $\mu$ M, s. 4.2.2). In Konkurrenzexperimenten mit Biotin-markierten HLA-DR-Molekülen und einem Überschuss verschiedener unmarkierter HLA-DR-Moleküle konnten die HLA-DR-Moleküle die Bindung des Indikator-HLA-DRs an Hsp70 inhibieren. Irrelevante Proteine wie rekombinantes HLA-A\*0201, BSA oder Ovalbumin, die in den meisten Versuchen als Kontrollproteine eingesetzt wurden, zeigten keine oder nur eine geringe Konkurrenz (s. Abb. 4.13 und 4.17). Auch die unmarkierten Peptidfragmente aus der HV3-Region von HLA-DR konnten die Hsp70-

Bindung der ganzen HLA-DR-Moleküle nicht inhibieren. Selbst im 250-fachen molaren Überschuss zeigten sie keine Kompetition (Abb. 4.14). Des Weiteren war die Bindung der ganzen HLA-DR-Moleküle an Hsp70 im Gegensatz zur Hsp70-Bindung der Peptidfragmente nicht ATP-sensitiv (Abb. 4.15).

Zwischen den verschiedenen allelischen HLA-DR-Varianten gab es nur geringe Schwankungen in ihrer Kompetitionskraft. In den meisten Experimenten zeigte das Molekül mit DRB1\*0402 (<sup>70</sup>DERAA<sup>74</sup>, RA-protektiv) die geringste Kompetition. Allerdings konnte dieses Ergebnis nicht immer reproduziert werden und war nicht in allen Versuchen statistisch signifikant verschieden ( $P < 0,05$ ) von der Kompetition durch andere HLA-DR-Moleküle, z. B. mit dem SE. Die Experimente wurden mit HLA-DR-Molekülen verschiedener Chargen (andere Präparationen) wiederholt, insgesamt konnte aber ein differentielles Bindungsmuster zwischen RA-prädisponierenden und RA-protektiven HLA-DR-Molekülen nicht belegt werden.

Diese Ergebnisse sprechen dafür, dass abgesehen von der Sequenz der HV3-Region wohl noch weitere Strukturen zur Interaktion der HLA-DR-Moleküle mit Hsp70 beitragen. Die HV3-Region ist eventuell für die Interaktion von Bedeutung, allerdings kann die Nicht-Bindung der <sup>70</sup>DERAA<sup>74</sup>-Sequenz an Hsp70 die Interaktion nicht verhindern, höchstens reduzieren. Es besteht die Möglichkeit, dass HLA-DR zusätzlich an einer oder mehreren anderen Positionen außerhalb der Peptidbindungsstelle an Hsp70 bindet, da die Interaktion durch Zugabe der HLA-DR-Peptidfragmente selbst in 250-fachem Überschuss nicht inhibiert werden konnte.

In den Versuchen mit denaturierten HLA-DR-Molekülen wurde schon gezeigt, dass die Hsp70-HLA-DR-Interaktion nicht auf die Bindung von Hsp70 an hydrophobe Anteile partiell denaturierter HLA-DR-Moleküle zurückzuführen ist. Allerdings muss auch berücksichtigt werden, dass bei der Aufreinigung der HLA-DR-Moleküle aus Zelllinien auch die Transmembran-Domäne mit aufgereinigt wird. Diese Domäne besitzt wie die denaturierten Proteine einen hohen Anteil hydrophober Aminosäurereste, die eine Verankerung der HLA-DR-Moleküle in der Zellmembran ermöglichen. Rekombinanten HLA-DR-Molekülen fehlt diese Transmembran-Domäne (s. 3.12.1). Ein weiterer Vorteil dieser Moleküle ist die definierte Position des Biotin-Moleküls am Ende der  $\beta$ -Kette. Um die Möglichkeit einer Interaktion von HSP70 mit der Transmembran-Domäne zu überprüfen, wurden Bindungsexperimente mit rekombinanten HLA-DR-Molekülen wiederholt. Die Messwerte mit

rekombinanten HLA-DR-Molekülen waren allerdings insgesamt deutlich niedriger als mit den aufgereinigten, was wahrscheinlich an der Biotinylierung mit nur einem Molekül Biotin pro HLA-DR liegt. Die aus Zelllinien aufgereinigten HLA-DR-Moleküle wurden mit einer Biotinmenge markiert, die rechnerisch ein Verhältnis von ca. drei Molekülen Biotin pro HLA-DR-Molekül ergab (s. 3.6.2). Ein weiteres Problem bei den Bindungsversuchen mit rekombinanten HLA-DR-Molekülen war der relativ große Bedarf an rekombinantem HLA-DR für diese Versuche und die nur begrenzt zur Verfügung stehende Menge dieser Moleküle.

Mit den rekombinanten HLA-DR-Molekülen wurden die Versuche mit den aufgereinigten HLA-DR-Molekülen bestätigt: Der  $K_d$ -Wert der Bindung von DRB1\*0101 an Hsp70 wurde z. B. mit ca. 150 nM bestimmt, was sehr gut zu dem  $K_d$ -Werten passt, die mit den aus Zelllinien aufgereinigten HLA-DR-Molekülen gefunden wurden (ca. 90 - 150 nM). Der  $K_d$ -Wert der Bindung des rekombinanten DRB1\*0101-Moleküls an den mAk L-243 lag bei 23 nM, die gemessenen Werte lagen dabei insgesamt kaum höher als für die Hsp70-Interaktion. Die Bindung der rekombinanten Moleküle konnte durch einen Überschuss verschiedener allelischer Varianten unmarkierter rekombinanter HLA-DR-Moleküle kompetitiert werden, nicht aber durch irrelevante Kontrollproteine wie Ovalbumin (s. Abb. 4.17). Allerdings konnten auch in diesen Experimenten trotz mehrfacher Wiederholung keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen RA-protektiven und RA-prädisponierenden HLA-DR-Molekülen belegt werden.

Die beiden Ketten der rekombinanten HLA-DR-Moleküle werden in getrennten Expressionsvektoren von Insektenzellen exprimiert und erst nach der Aufreinigung mittels des „Leucin-zippers“ zum HLA-DR-Dimer zusammengefügt. Durch diesen „Leucin-zipper“ entstehen stabile rekombinante HLA-DR-Dimere, die kein antigenes Peptid in ihrer Spalte gebunden haben (mündliche Aussage Prof. W. W. Kwok). Aufgereinigte HLA-DR-Moleküle sind dagegen nur stabil, wenn sie mit CLIP oder einem antigenen Peptid beladen sind. Da Hsp70 die rekombinanten HLA-DR-Moleküle mit einer ähnlichen Affinität wie die aufgereinigten Moleküle gebunden hat, kann davon ausgegangen werden, dass Hsp70 mit HLA-DR unabhängig davon interagiert, ob HLA-DR ein Peptid in seiner Spalte gebunden hat oder nicht.

Zusammenfassend kann aus diesen Ergebnissen geschlossen werden, dass zwischen humanem, zytosolischem Hsp70 und intakten HLA-DR-Molekülen eine

spezifische Interaktion besteht. Es wurde ausgeschlossen, dass die Interaktion durch Wechselwirkungen mit hydrophoben Anteilen „gestresster“, partiell denaturierter HLA-DR-Moleküle oder der Transmembrandomäne zurückzuführen ist. Die Interaktion ist sättigbar und lässt sich durch unmarkierte HLA-DR-Moleküle, nicht aber durch Kontrollproteine kompetitieren. Die Hsp70-HLA-DR-Interaktion hat mit  $K_D$ -Werten um 100 nM eine mehr als 200 x höhere Affinität als die Interaktion der Peptidfragmente mit DnaK. Humanes Hsp70 interagiert wesentlich stärker mit HLA-DR-Molekülen als die anderen untersuchten HSP-Moleküle. Im Gegensatz hierzu wurden bei den HLA-DR-Peptidfragmenten die stärkste Interaktion und das ausgeprägteste Bindungsmuster für das bakterielle DnaK gefunden.

Für die ganzen HLA-DR-Moleküle konnten, anders als für die HLA-DR-Peptidfragmente, keine statistisch signifikanten Unterschiede in der Hsp70-Bindung zwischen RA-prädisponierenden und RA-protektiven HLA-DR-Molekülen nachgewiesen werden. Die Hsp70-Bindung der HLA-DR-Moleküle konnte nicht durch die Peptidfragmente aus der HV3-Region von HLA-DR kompetitiert werden und war im Gegensatz zur HSP70-Bindung der Peptidfragmente nicht ATP-sensitiv.

Alle diese Ergebnisse sprechen dafür, dass die Interaktion der ganzen HLA-DR-Moleküle mit Hsp70 getrennt von der Interaktion der Peptidfragmente betrachtet werden muss. Es müssen noch weitere, nicht variable Strukturen der HLA-DR-Moleküle an dieser Interaktion beteiligt sein. Die HV3-Sequenz trägt möglicherweise einen Teil zu dieser Interaktion bei, da in vielen Versuchen HLA-DRB1\*0402 (RA-protektiv) eine geringere Konkurrenz als andere untersuchte HLA-DR-Moleküle zeigte (nicht immer statistisch signifikant).

Die Interaktion ganzer HLA-DR-Moleküle mit Hsp70 kann eine Bedeutung von Hsp70 in der Pathogenese von Autoimmunerkrankungen wie der RA besser erklären, als es die Interaktion der HLA-DR-Peptidfragmente kann: Hsp70 wird z. B. durch Zellnekrosen in einem entzündeten Gelenk freigesetzt und kann (auto-) antigene Peptide mit Hsp70-Bindungsmotiv binden („Scan“-Funktion). Nach rezeptor-vermittelter Endozytose in die APZs kann Hsp70 die gebundenen Peptide in den Beladungskompartimenten durch die Interaktion mit HLA-DR-Molekülen auf diese übertragen („Carrier“-Funktion). Auch ohne die differentielle Interaktion nur mit bestimmten HLA-DR-Molekülen kann Hsp70 dann eine wichtige Funktion in der MHC II-vermittelten Antigenpräsentation spielen und die Aktivierung und Proliferation von

CD4<sup>+</sup> T-Zellen beeinflussen. Hsp70-Moleküle könnten damit eine wichtige Rolle sowohl in der Reaktion auf „Fremd“- als auch auf „Selbst“-antigene spielen und damit an der Pathogenese von Autoimmunerkrankungen wie der RA beteiligt sein. Daher sollte in T-Zellproliferationsexperimenten der Einfluss von Hsp70-gebundenen Peptiden auf die Aktivierung antigenspezifischer CD4<sup>+</sup> T-Zellen untersucht werden.

#### 5.4 Experimente zur T-Zellproliferation

Hypothese für die hier gezeigten Ergebnisse war, wie oben beschrieben, dass Hsp70 im humanen System (auto-) antigene Peptide auswählen („Scan“-Funktion) und sie auf geeignete MHC II-Moleküle übertragen kann. Durch die gezeigte direkte Interaktion mit MHC II-Molekülen kann Hsp70 in einem ternären Komplex mit dem HLA-DR-Molekül und dem antigenem Peptid als Peptid-„Carrier“ fungieren. HSPs können dadurch die PeptidAuswahl und -präsentation beeinflussen und somit die Antwort humaner T-Zellen modulieren und eventuell auch in die Immunregulation eingreifen. In diesem Szenario spielt die gegenseitige Affinität und Bindung von (auto-) antigenem Peptid, Hsp70 und HLA-DR eine entscheidende Rolle in der HLA-DR-vermittelten Peptid-Präsentation und CD4<sup>+</sup> T-Zellaktivierung. Für diese Hypothese spricht beispielsweise, dass bei Zugabe von HSP70 in einem Mausmodell verstärkt kryptische, also hydrophobe, nicht an der Proteinoberfläche liegende, Epitope über MHC II präsentiert wurden (Hanyecz *et al.* 2003). Diese hydrophoben Epitope binden eventuell besonders gut an HSP70 und können von diesem auf MHC II übertragen werden.

HSP:Peptid-Komplexe können von nekrotischen Zellen freigesetzt werden (Basu *et al.* 2000), professionelle APZs (aber z. B. nicht T-Zellen) können mit diesen HSP:Peptid-Komplexen interagieren und die Komplexe rezeptorvermittelt internalisieren (Arnold *et al.* 1999). Der genaue Mechanismus dieser rezeptorvermittelten Endozytose ist noch nicht eindeutig geklärt, es werden inzwischen eine Reihe möglicher HSP-Rezeptoren auf APZs diskutiert (zusammengefasst in Binder *et al.* 2004):



**CD91:** CD91 wurde zuerst als Rezeptor für das 90 kDa HSP gp96 beschrieben (Binder *et al.* 2000) und kurz darauf auch für weitere HSPs, z. B. HSP70 (Basu *et al.* 2001).

**CD40:** Eine CD91 unabhängige Präsentation von gp96-gebundenen Peptiden wurde gezeigt (Berwin *et al.* 2002), dabei wird CD40 als HSP-Rezeptor diskutiert (Becker *et al.* 2002).

**MHC I:** Für humanes Hsp70 und Hsp60 wurde eine Ko-Internalisation mit MHC I in dendritische Zellen gefunden, die HSPs konnten anschließend auch in MHC II-angereicherten Kompartimenten gefunden werden (Lipsker *et al.* 2002).

Daneben wurden noch weitere Rezeptoren für Hsp70 vorgeschlagen wie CD14 (Asea *et al.* 2000) und die Toll-like Rezeptoren TLR-2 und TLR-4 (Asea *et al.* 2002), wobei inzwischen gezeigt wurde, dass LPS in Hsp70-Präparationen für die TLR-2 und TLR-4-Abhängigkeit verantwortlich ist (Bausinger *et al.* 2002). Es gilt inzwischen als gesichert, dass HSP:Peptid-Komplexe von APZs rezeptorvermittelt aufgenommen werden, auch wenn der genaue Mechanismus noch nicht geklärt ist.

Die Interaktion von HSP:Peptid-Komplexen mit professionellen APZs hat zwei wichtige Konsequenzen:

1. Die HSP-Moleküle binden an einen Signal-gebenden Rezeptor und haben einen direkten Effekt auf die APZs, sie induzieren über NF- $\kappa$ B die

- Sekretion pro-inflammatorischer Zytokine wie Tumor-Nekrose-Faktor  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), Interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), IL-12, IL-6 und GM-CSF in Makrophagen und dendritischen Zellen (Basu *et al.* 2000; Singh-Jasuja *et al.* 2000a; Wang *et al.* 2002)
- Sekretion von Chemokinen wie MCP-1, MIP-1 und RANTES durch Makrophagen (Wang *et al.* 2002)
- verstärkte Expression von Aktivierungsmarkern wie MHC II, CD83, CD86 und CD40 auf dendritischen Zellen (Basu *et al.* 2000; Singh-Jasuja *et al.* 2000a)
- Migration der dendritischen Zellen in die Lymphknoten (Basu *et al.* 2000).

2. Die Hsp:Peptid-Komplexe binden an einen Endozytose-Rezeptor (s.o.) und werden rezeptorvermittelt von den APZs aufgenommen. Die extrazellulär zugeführten HSP:Peptid-Komplexe können nach ihrer rezeptor-vermittelten Endozytose in die MHC II-Beladungskompartimente (MIIC) gelangen (Lipsker *et al.*

2002). Die HSP-gebundenen Peptide können anschließend über MHC-Moleküle auf der Zelloberfläche präsentiert werden (Suto und Srivastava 1995).

Die Fähigkeit von HSP-Molekülen, extrazellulär gebundene Peptide über MHC I-Moleküle an CD8<sup>+</sup> T-Zellen zu präsentieren und eine effektive ZTL-Antwort *in vivo* und *in vitro* auszulösen, ist inzwischen gut untersucht (Li *et al.* 2002; Singh-Jasuja *et al.* 2000b; Singh-Jasuja *et al.* 2001; Srivastava 2002a; Srivastava 2002b; Udono und Srivastava 1993). Die Immunogenität HSP-assoziiierter Peptide wurde erstmals von Udono und Srivastava mit HSP70-Präparationen aus Tumorzellen gezeigt, die tumorspezifische Peptide beinhalteten und eine starke ZTL-Antwort gegenüber Tumorzellen nach autologer Vakzinierung im Mausmodell induzieren konnten (Udono und Srivastava 1993). Darauf folgende Studien mit Tumormodellen oder virusinfizierten Zellen belegen, dass HSP:Peptid-Komplexe eine verstärkte Immunantwort gegen das vom HSP gebundenen Peptid auslösen können (Blachere *et al.* 1997; Tamura *et al.* 1997; Todryk *et al.* 1999; Wells und Malkovsky 2000). Neue Studien zeigen, dass dendritische Zellen für eine effiziente antigenspezifische ZTL-Antwort die Bindung antigener Peptide an Hsp70 benötigen (MacAry *et al.* 2004). Bereits die Bindung des Antigens an eine verkürzte Form von HSP70 von nur 136 Aminosäuren kann dabei die antigenspezifische Antwort auslösen. Die genannten Studien untersuchen allerdings alle die Aktivierung von CD8<sup>+</sup> zytotoxischen T-Zellen, die Peptide mit Hilfe der Präsentation von MHC I erkennen.

Über die Beteiligung von Hsp70 an der Präsentation exogener Peptide über MHC II und damit die Aktivierung von CD4<sup>+</sup> T-Helfer-Zellen (Th) ist noch relativ wenig bekannt, obwohl sie seit längerem vermutet wird (De Nagel und Pierce 1992). Gestützt wird diese Hypothese unter anderem dadurch, dass eine Überexpression von Hsc70 (konstitutiv exprimiertes zytosolisches HSP70) in einer Makrophagen-Zelllinie zu einer verstärkten Präsentation von exogenem Antigen über MHC II führt (Panjwani *et al.* 1999). Außerdem konnte gezeigt werden, dass das *E.coli* 70 kDa HSP DnaK die effiziente Prozessierung und Präsentation von Antigenen über MHC II erhöht. Eine Zugabe von DnaK zu antigenem Protein und APZs führte zu einer gesteigerten Proliferation von CD4<sup>+</sup> T-Zellen. Die Verstärkung der Proliferation war abhängig vom HLA-DR-Allel der verwendeten APZ (Roth *et al.* 2002). Inzwischen wurde auch gezeigt, dass Hsp70 die Präsentation von Autoantigenen wie MBP erhöht und damit eine Rolle bei der Auslösung von Autoimmunerkrankungen spielen kann (Mycko *et al.* 2004). Im Mausmodell wurde nachgewiesen, dass das HSP gp96

die in vivo-Präsentation von MHC II-abhängigen Peptiden erleichtert und die Proliferation von antigenspezifischen CD4<sup>+</sup> Zellen steigert (Doody *et al.* 2004). Allerdings zeigten die so generierten CD4<sup>+</sup> Zellen keine Effektor-Funktion im Sinne einer Zytokinproduktion. Eine andere Arbeit hat gezeigt, dass EBV-transformierte B-Zelllinien in der Lage waren, ein mit gp96 komplexiertes HIV-Antigen über MHC I- und MHC II-Moleküle zu präsentieren (SenGupta *et al.* 2004) und kürzlich wurde gefunden, dass bakterielle HSP70-Moleküle verlängerte Peptide der MHC II-Präsentation zuführen können, dabei wurde ein CD91-unabhängiger Mechanismus vermutet (Tobian *et al.* 2004).

Insgesamt kann aus diesen, zum großen Teil sehr aktuellen Arbeiten geschlossen werden, dass HSPs wohl auch in der MHC II-vermittelten Antigenpräsentation und T-Zellaktivierung eine wichtige Rolle spielen. Die meisten dieser Studien wurden allerdings im murinen Modell oder mit T-Zellhybridomen bzw. -klonen durchgeführt.

Die hier vorgestellten Ergebnisse bestätigen und erweitern die Daten dieser Arbeiten. Zum ersten Mal wurde dabei in einem humanen, antigenspezifischen Versuchsaufbau die verstärkte Immunogenität von MHC II-restringierten Peptiden gezeigt, die mit dem humanen stress-induzierbaren Hsp70 komplexiert waren.

Dazu wurde ein Modell etabliert, in dem der Einfluss von Hsp70 auf die Aktivierung von antigenspezifischen Th-Gedächtniszellen untersucht werden konnte. Für die Versuche wurden gut untersuchte antigene Peptide aus Tetanus-Toxin und dem Influenza-Protein Hämagglutinin ausgewählt. Der Einfluss von Hsp70 auf die Proliferation von CD4<sup>+</sup> T-Zellen bei prä-immunisierten Donoren bekannten Haplotyps wurde untersucht. Ziel war es, den Einfluss von exogen zugeführten Hsp70-gebundenen Peptiden auf die antigenspezifische CD4<sup>+</sup> T-Zellproliferation im Kontext mit Donoren verschiedenen HLA-DR-Haplotyps (wenn möglich RA-prädisponierende und RA-protective) zu untersuchen. Die in dieser Arbeit verwendeten Peptide hatten eine geeignete Länge, um von den HLA-DR-Molekülen direkt präsentiert werden zu können, ein Prozessierungs-Schritt vor der Übertragung vom Hsp70-Molekül in die Peptid-Bindungsspalte des HLA-DR-Moleküls war nicht erforderlich.

Mit Hilfe der HLA-DR-Tetramer-Technologie war es möglich, den Einfluss von Hsp70 auf die Aktivierung von in vitro generierten, antigenspezifischen T-Zellen zu untersuchen. Von gesunden, gegen Influenza und/oder Tetanus geimpften, Spendern mit bekanntem HLA-DR-Haplotyp wurden PBMCs bzw. CD4<sup>+</sup> T-Zellen

isoliert. Es wurde die Aktivierung und Proliferation von CFSE-gefärbten CD4<sup>+</sup> Th-Gedächtniszellen mit antigenen Peptiden alleine oder mit Hsp70:Peptidkomplexen untersucht. Antigenpezifität der generierten CD4<sup>+</sup> T-Zellen wurde mittels der Färbung mit HLA-DR-Tetrameren nachgewiesen.

Mit mehreren Donoren der HLA-DRB1-Haplotypen \*1101, \*0401 und \*0101 konnte dabei gezeigt werden, dass Hsp70-gebundene Peptide die Proliferation von CD4<sup>+</sup> Th-Gedächtniszellen (CD45RO<sup>+</sup>, Daten nicht gezeigt) deutlich verstärken (s. Abb. 4.20 und 4.21). Die Stimulation mit Hsp70:Peptid-Komplexen war besonders in äußerst niedrigen Konzentrationen (0,01 bzw. 0,1 µg/ml) der Stimulation mit dem entsprechenden Peptid alleine deutlich überlegen. Mit hohen Peptid-Konzentrationen (1,0 µg/ml) hatte die Komplexierung des Peptides an Hsp70 keinen Vorteil gegenüber Peptid alleine. Diese verstärkte Proliferation von CD4<sup>+</sup> T-Zellen mit Hsp70-komplexierten Peptiden wurde mit dem Tetanus-Peptid TT<sub>947-966</sub> bei drei DRB1\*1101-positiven Spendern gezeigt, sowie mit dem Influenza-Peptid HA<sub>307-319</sub> bei zwei DRB1\*0401 Donoren und einem DRB1\*0101 Donor.

Hsp70 hat eine etwa 30-fach höhere Molekularmasse als das TT<sub>947-966</sub>-Peptid. Bei einer in dem in Abb. 4.21 gezeigten Experiment eingesetzten Peptidkonzentration von 0.001 µg/ml und einer Hsp70-Konzentration von 0.3 µg/ml entspricht dies einem Peptid:Hsp70-Verhältnis von ca. 1:10. Ein äquimolares Peptid:Hsp70-Verhältnis ist bei einer ungefähren Peptidkonzentration von 0,01 µg/ml Peptid erreicht, bei höheren Peptidkonzentrationen liegt ein Überschuss ungebundenen Peptides in der Mixtur vor. Dieses Experiment zeigte, dass bereits der Einsatz von Hsp70:Peptid-Verhältnissen kleiner 1 ausreicht, um eine starke CD4<sup>+</sup> T-Zellantwort auszulösen. In hohen Peptidkonzentrationen (1 µg/ml) hatte die Komplexierung des Peptides an Hsp70 keinen verstärkenden Effekt mehr auf die CD4<sup>+</sup> T-Zellproliferation. In dieser Peptidkonzentration liegt das Peptid im mehr als 100-fachen Überschuss zum Hsp70-Molekül vor und hat wohl eine Konzentration erreicht, die auch ohne Hsp70-Komplexierung ausreicht, um mit dem Peptid alleine eine vergleichbare Anzahl an CD4<sup>+</sup> T-Vorläufer-Zellen zu aktivieren.

Die eingesetzte Hsp70-Konzentration hatte bei diesen Experimenten einen Einfluss auf diesen Effekt: Eine Komplexierung von antigenem Peptid in niedriger Konzentration (0,01 µg/ml) mit ansteigenden Konzentrationen Hsp70 führte zu einer vermehrten Zahl von proliferierten CD4<sup>+</sup> T-Zellen, wohingegen die Komplexierung

von hohen Konzentrationen antigenem Peptid (1,0 µg/ml) mit verschiedenen Hsp70-Konzentrationen die Proliferation von CD4<sup>+</sup> T-Zellen nicht mehr steigern konnte (s. Abb. 4.22).

Auch die Zahl der APZs beeinflusste die HSP70-abhängige Proliferationsverstärkung: Mit abnehmender Zahl an APZs war die Stimulation der CD4<sup>+</sup> T-Zellen mit Hsp70:Peptid-Komplexen der Stimulation mit dem entsprechenden Peptid alleine zunehmend überlegen (s. Abb. 4.23). Dabei genügte ein APZ:CD4<sup>+</sup> T-Zellverhältnis von 1:10 bei den zwei DRB1\*1101 Spendern, um noch eine deutlich messbare CD4<sup>+</sup> T-Zellproliferation auszulösen. Weitere Versuche mit diesen Spendern wurden dann mit reduzierten APZ-Zahlen durchgeführt. Bei den DRB1\*0401 und DRB1\*0101-Spendern waren etwas größere Zahlen an APZs (APZ:CD4<sup>+</sup> 1:5 oder 1:2,5) für eine gut messbare CD4<sup>+</sup> T-Zellproliferation nötig, bei diesen Verhältnissen war die Stimulation mit Hsp70:Peptid-Komplexen der Stimulation mit Peptid alleine ebenfalls deutlich überlegen.

Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die Komplexbildung der antigenen Peptide an Hsp70 essentiell ist für die verstärkte T-Zellproliferation. Stimulation mit Peptid und Hsp70 ohne Vorinkubation führte zu keiner verstärkten T-Zellproliferation (s. Abb. 4.24 und 4.26). Vorinkubation des Peptides mit Kontrollproteinen wie dem Hsc70-ATPase-Fragment und Humanem Serum Albumin beeinflussten die Proliferation antigenspezifischer Zellen ebenfalls nicht (s. Abb. 4.25 und 4.28).

Die Färbung mit HLA-DR-Tetrameren erlaubt die Identifizierung antigenspezifischer T-Zellen in peripherem Blut bis zu einer Häufigkeit von etwa 0,003% (Danke und Kwok 2003). Mittels der HLA-DR-Tetramere konnte gezeigt werden, dass die mit Hsp70:Peptid-Komplexen proliferierten CD4<sup>+</sup> T-Zellen tatsächlich spezifisch auf das verwendete Antigen reagierten (s. Abb. 4.25 bis 4.29). Nicht alle der generierten T-Zellen waren dabei spezifisch für das Antigen, jedoch wurde in allen Experimenten mit einer verstärkten CD4<sup>+</sup> T-Zellproliferation durch Hsp70:Peptid-Komplexe auch eine stark erhöhte Zahl antigenspezifischer T-Zellen gefunden. Hsp70:Peptid-Komplexe verstärkten dabei die Aktivierung und Proliferation antigenspezifischer CD4<sup>+</sup> T-Gedächtniszellen vor allem unter Bedingungen mit sehr wenig Antigen und erniedrigten APZ-Zahlen. Mit den HLA-DR-Tetrameren konnten also die Ergebnisse aus den Versuchen bestätigt werden, bei denen nur die Gesamtproliferation CD4-positiver T-Zellen ermittelt wurde (Abb. 4.20 bis 4.24).

Durch Kombination von HLA-DR-Tetramer- und CFSE-Färbung konnte die Anzahl an aktivierten antigenspezifischen CD4<sup>+</sup> T-Vorläufer-Zellen bestimmt werden (Anzahl aktivierter Vorläufer-T-Zellen =  $X/2^n$ , s. 4.4.11). Dabei wurde in allen Versuchen mit niedrigen Antigen-Konzentrationen bei Stimulation mit Hsp70:Peptid-Komplexen eine um mindestens das 3,3-fache erhöhte Anzahl aktivierter antigenspezifischer Vorläufer-Zellen gefunden im Vergleich zur Stimulation mit dem Peptid alleine (s. Abb. 4.25 und 4.26). Vorinkubation des antigenen Peptide mit Kontrollproteinen wie Hsc70-ATP<sub>f</sub> und HSA führte hingegen zu keiner verstärkten Proliferation antigenspezifischer Zellen. Auch bei den Experimenten mit der Messung antigenspezifischer T-Zellen konnte deutlich gezeigt werden, dass die vorausgehende Komplexbildung des antigenen Peptides absolute Voraussetzung für den proliferationsverstärkenden Effekt von Hsp70 war. Bei dem in Abb. 4.26 gezeigten Experiment führte 0,01 µg/ml Hsp70-komplexiertes Peptid zur Aktivierung einer Vorläufer-T-Zelle in 3500 an Tag 0 stimulierten Zellen, Peptid plus Hsp70 ohne vorausgehende Komplexbildung aktivierten rechnerisch eine T-Zelle in 57500 eingesetzten Zellen.

Wie bereits erwähnt, werden verschiedene Mechanismen diskutiert, um den Effekt von Hsp70 auf die MHC I- und MHC II-vermittelte T-Zellproliferation zu erklären, z. B. eine verstärkte Aufnahme und Prozessierung von HSP-gebundenen Peptiden durch APZs (Castellino *et al.* 2000), ein direkter Effekt der HSP-Moleküle auf die APZs (Asea *et al.* 2000; Kuppner *et al.* 2001; Singh-Jasuja *et al.* 2000a; Vabulas *et al.* 2002) oder ein Effekt, der nur auf den mikrobiellen Verunreinigungen der HSP-Präparationen beruht (Bausinger *et al.* 2002; Gao und Tsan 2003; MacAry *et al.* 2004). Die rezeptor-vermittelte Aufnahme der HSP:Peptid-Komplexe wird zwar heute allgemein angenommen, allerdings sind immer noch viele Fragen, die HSP-Rezeptoren und den intrazellulären Weg der HSP:Peptid-Komplexe betreffend, ungeklärt (Basu *et al.* 2001; Becker *et al.* 2002; Binder *et al.* 2000; Binder *et al.* 2004; Castellino *et al.* 2000; Vabulas *et al.* 2002). CD91 und CD40 wurden als Rezeptoren in der MHC I-vermittelten „cross-presentation“ von Peptiden identifiziert, aber in einem murinen Modell hatte die Blockade von CD91 keinen Einfluss auf die Aufnahme und Präsentation eines MHC II-restringierten Peptides, das an bakterielles Hsp70 gebunden war (Tobian *et al.* 2004). Obwohl der Mechanismus nicht geklärt werden konnte, verstärkte mikrobielles Hsp70 die MHC II-vermittelte Peptid-

Präsentation, eine verstärkte Aufnahme und intrazelluläre Prozessierung des Peptides wurde angenommen.

Beachtet werden muss auch die Tatsache, dass HSP-Moleküle selbst die Reifung von professionellen APZs und die Produktion pro-inflammatorischer Zytokine stimulieren können (Asea *et al.* 2000; Kuppner *et al.* 2001; Singh-Jasuja *et al.* 2000a). Dieser HSP-Effekt muss allerdings vorsichtig abgegrenzt werden von dem Effekt mikrobieller Verunreinigungen wie LPS (Bausinger *et al.* 2002; Gao und Tsan 2003; MacAry *et al.* 2004). In den in dieser Arbeit durchgeführten Experimenten war die Komplexbildung von Hsp70 mit den antigenen Peptiden durch Vorinkubation eine absolute Voraussetzung für eine verstärkte Proliferation von CD4<sup>+</sup> T-Zellen. Wurden Hsp70 und Peptide ohne Vorinkubation (keine Komplexbildung möglich) zugegeben, wurde keine verstärkte Proliferation beobachtet. Ein direkter Einfluss von Hsp70 alleine auf die APZs kann daher als Ursache der verstärkten Proliferation mit Hsp70:Peptid-Komplexen ausgeschlossen werden.

Um einen Effekt durch mikrobielle Verunreinigungen auszuschließen, die in der Hsp70-Präparation enthalten sein können, wurde das antigene Peptid mit reinem LPS vorinkubiert. Zugabe von LPS alleine in einer Konzentration von 10 % der Hsp70-Konzentration führte bereits zu einer sehr starken T-Zellproliferation (ca. 40 % T-Zellproliferation, Daten nicht gezeigt). Durch Färbung mit HLA-DR-Tetrameren konnte gezeigt werden, dass die mit LPS generierten T-Zellen nicht antigenspezifisch waren (s. Abb. 4.28). Die Hsp70-Präparation alleine führte hingegen auch in deutlich höheren Konzentrationen nicht zu einer T-Zellproliferation (kein „Bystander“-Effekt durch Hsp70, s. Abb. 4.20 und nicht gezeigte Daten). Stimulation der T-Zellen mit Peptid, das zusammen mit LPS vorinkubiert wurde, führte nicht zu einer erhöhten Zahl proliferierter antigenspezifischer CD4<sup>+</sup> T-Zellen im Vergleich zur Stimulation mit Peptid alleine (s. Abb. 4.28). Nur Stimulation mit Hsp70:Peptid-Komplexen verstärkte die antigenspezifische T-Zellproliferation. Diese Ergebnisse zeigen, dass der Hsp70-Effekt auf die antigenspezifische T-Zellproliferation nicht als ein Artefakt durch mikrobielle Verunreinigungen erklärt werden kann. Auch mit der „low-endotoxin“-Präparation von Hsp70 wurde der proliferationsverstärkende Effekt gefunden, spätere Versuche wurden ausschließlich mit dem „low-endotoxin“-Hsp70-Protein durchgeführt.

Da antigenes Peptid alleine in hohen Peptidkonzentrationen zu einer ähnlichen Anzahl proliferierter  $CD4^+$  T-Zellen führt wie die Stimulation mit einer deutlich niedrigeren Konzentration an Hsp70:Peptid-Komplexen, ist es möglich, dass unkomplexiertes Peptid und Hsp70:Peptide-Komplexe  $CD4^+$  T-Gedächtniszellen aus dem selben „Pool“ an Vorläufer-Zellen aktivieren. Dabei senken Hsp70:Peptid-Komplexe die Grenze der T-Zell-Aktivierung deutlich ab in Richtung niedrigere Peptidkonzentrationen und geringere APZ-Zahlen. Ist die Konzentration an unkomplexiertem Peptid hoch genug, kann auch das Peptid alleine eine vergleichbare Anzahl an Zellen aus diesem Vorläufer-„Pool“ aktivieren, eine Komplexierung mit Hsp70 hat dann keinen zusätzlichen Effekt (s. Abb. 4.22). Dies könnte eine Erklärung dafür darstellen, warum bei Stimulation von  $CD4^+$  T-Zellen *in vitro* sehr hohe Peptidmengen benötigt werden, *in vivo* aber offensichtlich auch eine Aktivierung mit deutlich geringeren Peptidkonzentrationen möglich ist.

Ein weiteres Indiz für die Aktivierung von Zellen aus dem selben „Pool“ an Vorläufer-Zellen wäre, wenn die mit Hsp70:Peptid-Komplexen und mit Peptid alleine generierten  $CD4^+$  T-Zellen ein ähnliches Profil an sezernierten Zytokinen aufweisen würden. In weiteren Experimenten soll daher mittels Zytokin-Sekretionsassays die Zytokinproduktion der antigenspezifischen T-Zellen analysiert werden. In ersten Experimenten wurde eine stark erhöhte IFN $\gamma$ -Produktion der mit Hsp70:Peptid-Komplexen generierten antigenspezifischen T-Zellen gefunden, die Zellen produzierten kein IL-4 (Daten nicht gezeigt). Die mit Hsp70:Peptid-Komplexen generierten antigenspezifischen T-Zellen sollen im Anschluß an diese Arbeit weiter charakterisiert werden hinsichtlich ihrer Zytokinproduktion, T-Zellrezeptor-Affinität und des Einflusses regulatorischer Mechanismen wie  $CD4^+CD25^{high}$  T<sub>reg</sub>-Zellen oder dem Zytokin TGF- $\beta$ 1.

Die in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnisse konnten zum ersten Mal in einem humanen, antigenspezifischen System einen direkten Einfluß von Hsp70 auf die MHC II-vermittelte Antigenpräsentation und  $CD4^+$  T-Zellaktivierung zeigen. Die in der Literatur gezeigte rezeptorvermittelte Endozytose der HSP:Peptid-Komplexe in APZs und die MHC II-Beladungskompartimente sowie die Abgabe der Peptide bei dem dort erniedrigtem pH (s. o.) sind für diesen Effekt sicher von Bedeutung. Daneben passt die hier gezeigte direkte Interaktion von Hsp70 mit isolierten HLA-DR-Molekülen sehr gut in diese Hypothese von Hsp70 als Peptid-„Carrier“, auch wenn in dieser Arbeit



nicht untersucht wurde, ob eine direkte Interaktion und Peptidübertragung von Hsp70 auf HLA-DR in lebenden APZs stattfindet.

Nach den gezeigten Ergebnissen ist in bezug auf die Pathogenese von Autoimmunerkrankungen ein Szenario vorstellbar, in dem Hsp70, durch Stress-Faktoren wie Entzündung induziert, die CD4<sup>+</sup> T-Zellantwort auf ein autoantigenes Peptid erleichtern kann, indem es die Grenzkonzentration des Peptides für eine T-Zellaktivierung herabsetzt. Durch die direkte Interaktion von Hsp70 mit HLA-DR kann die Aktivierung von T-Zellen mit äußerst geringen Peptidmengen und reduzierten APZ-Zahlen erklärt werden, wenn das Peptid eine Affinität sowohl zu Hsp70 als auch HLA-DR hat. Diese Peptide wären unter Bedingungen, in denen kein Hsp70 vorliegt, nicht immunogen. Hsp70:Peptid-Komplexe verstärken dann die Aktivierung autoantigener T-Zellen und könnten, wie oben erwähnt, zu einer verstärkten Produktion von Th1-Zytokinen führen. Es wäre möglich, dass diese durch Hsp70:Peptid-Komplexe aktivierten Th1-Zellen dann auf körpereigene Regulationsmechanismen wie TGF- $\beta$ 1 oder T<sub>reg</sub>-Zellen nicht mehr ansprechen und es zur Pathogenese der Autoimmunerkrankung kommt. Da autoreaktive CD4<sup>+</sup> T-Zellen nach Entfernung der T<sub>reg</sub>-Zellen auch in gesunden Individuen detektiert wurden (Danke und Kwok 2003), wird es interessant sein, in zukünftigen Experimenten zu untersuchen, ob CD4<sup>+</sup> T-Zellen, die mit Hsp70-komplexierten autoantigenen Peptiden (z. B. aus dem „myelin basic protein“, MBP) generiert wurden, noch auf diese Regulationsmechanismen ansprechen.

Welche mögliche Konsequenzen können aus diesen Ergebnissen für die HLA-Assoziation der RA und anderer Autoimmunerkrankungen abgeleitet werden? In den Bindungsversuchen mit isolierten Molekülen (s. 4.3) konnte kein signifikant differentielles Bindungsmuster zwischen RA-prädisponierenden und RA-protektiven HLA-DR-Molekülen an Hsp70 belegt werden. Dadurch kann ein Einfluss von Hsp70 auf die HLA-Assoziation der RA nicht als Folge einer unterschiedlichen Interaktion von Hsp70 mit verschiedenen HLA-DR-Molekülen erklärt werden. Die HLA-Assoziation betreffend ist aber beispielsweise denkbar, dass ein autoantigenes Peptid, das an der RA-Pathogenese beteiligt ist, ein Hsp70-Bindungsmotiv besitzt. Hsp70 kann dann sowohl mit dem prädisponierenden DRB1\*0401 als auch mit dem protektiven DRB1\*0402 interagieren. Es wäre möglich, dass das Peptid auf Grund der unterschiedlichen AS-Reste in  $\beta$ 71 der HLA-DR-Moleküle aber nur in die

Bindungsspalte von DRB1\*0401 passt und auf DRB1\*0402 nicht übertragen werden kann, DRB1\*0402 wirkt dann RA-protektiv.

Eine proliferationsverstärkende Wirkung Hsp70-gebundener Peptide auf die T-Zellproliferation wurde in dieser Arbeit bei Donoren mit den Haplotypen HLA-DRB1\*1101, \*0101 und \*0401 gefunden. Dabei handelt es sich um ein RA-neutrales (DRB1\*1101) und zwei RA-prädisponierende (DRB1\*0101 und \*0401) HLA-DR-Moleküle. Nach den gezeigten Experimenten kann nicht völlig ausgeschlossen werden, dass vielleicht doch schwache Bindungsunterschiede zwischen RA-protektiven und RA-prädisponierenden HLA-DR-Molekülen an Hsp70 existieren (s. 4.3). Bisher konnten mangels geeigneter Donoren bzw. mangels Reaktivität auf ein geeignetes Peptid keine Versuche mit Donoren durchgeführt werden, die ein RA-protektives HLA-DR-Molekül (z. B. DRB1\*0402) exprimieren. Diese Frage kann nur endgültig beantwortet werden, wenn in zukünftigen Experimenten mit geeigneten Donoren untersucht wird, ob Hsp70-gebundene Peptide die CD4<sup>+</sup> T-Zellproliferation auch im Kontext mit RA-protektiven HLA-DR-Molekülen verstärken können.

## 6 ZUSAMMENFASSUNG

Autoimmunerkrankungen wie die Rheumatoide Arthritis (RA) gelten als T-Zellvermittelte Erkrankungen, deren Pathogenese eng mit der Expression definierter HLA (human leucocyte antigen) Klasse II-Moleküle assoziiert ist. Bei der RA wird zwischen prädisponierenden und protektiven HLA-DR-Molekülen unterschieden. Die genauen Mechanismen, die der Auslösung der Erkrankung zugrunde liegen, sind bis heute unklar. Vermutlich spielt die Aktivierung von CD4<sup>+</sup> T-Zellen, die autoantigene Peptide im Kontext mit bestimmten HLA-DR-Molekülen erkennen sowie das Versagen immunologischer Regulationsmechanismen eine Rolle.

Hitzeschockproteine (HSPs) schützen die Zelle vor Stress, indem sie reversibel mit „entarteten“ Proteinen und Peptiden interagieren und an deren Rückfaltung oder Abbau beteiligt sind. Daneben haben sie eine Funktion in der angeborenen und erworbenen Immunität und werden auch mit der Pathogenese der RA in Verbindung gebracht. 1996 wurde eine Interaktion von DnaK, dem HSP70-Molekül aus *E.coli* und Peptidfragmenten aus RA-prädisponierenden HLA-DR-Molekülen beschrieben. Ausgehend von dieser Erkenntnis wurde in der hier vorgestellten Arbeit die Interaktion von HSP70-Molekülen mit Peptidfragmenten aus einer besonders variablen Region der HLA-DR-Moleküle in qualitativen und quantitativen Bindungsstudien untersucht.

Qualitative Bindungsversuche wurden mit der sehr sensitiven Methode Fractogelgebundener Peptidfragmente aus HLA-DR und verschiedenen HSP70-Molekülen (dem stress-induzierbaren humanen Hsp70, dem konstitutiv exprimierten Hsc70 und DnaK) durchgeführt. Die HSP70-Interaktion mit allen natürlicherweise in HLA-DR-Molekülen vorkommenden Peptidsequenzen wurde untersucht. Im Gegensatz zur Literatur zeigten neben den Peptidsequenzen aus RA-prädisponierenden HLA-DR-Molekülen auch die meisten anderen Peptidsequenzen eine HSP70-Affinität. Einzig für eine Peptidsequenz, die ausschließlich in RA-protektiven HLA-DR-Molekülen vorkommt, wurde keine HSP70-Affinität gefunden. Dieses Bindungsmuster wurde für alle drei getesteten HSP70-Moleküle gefunden. In einem quantitativen Europium-Fluoreszenz-Assay wurde das differentielle Bindungsmuster HLA-DR-Peptidfragmenten an DnaK bestätigt und der K<sub>d</sub>-Wert der Interaktion bestimmt. Zu Hsp70 zeigten die Peptidfragmente eine geringere Affinität als zu DnaK, das differentielle Bindungsmuster war weniger stark ausgeprägt.

Des Weiteren wurde untersucht, ob HSP70 nur HLA-DR-Peptidfragmente bindet, oder ob auch intakte HLA-DR-Moleküle mit HSP70 interagieren. Aus Zelllinien isolierte und rekombinant hergestellte HLA-DR-Moleküle zeigten im Europium-Fluoreszenz-Assay eine spezifische hochaffine Interaktion mit humanem, stress-induzierbarem Hsp70. Die HLA-DR-Bindung an andere HSP-Moleküle war nur sehr schwach ausgeprägt. Ein signifikant differentielles Hsp70-Bindungsmuster zwischen RA-prädisponierenden und RA-protektiven HLA-DR-Molekülen konnte für die ganzen Moleküle nicht gezeigt werden.

Es ist bekannt, dass Hsp70-Moleküle z. B. durch Zellnekrosen freigesetzt werden und mit gebundenen (auto-) antigenen Peptiden rezeptorvermittelt in professionelle antigenpräsentierende Zellen (APZs) aufgenommen werden. Durch die hier gefundene direkte Interaktion mit HLA-DR-Molekülen könnte Hsp70 hypothetisch als Peptid-„Carrier“ in der MHC II-vermittelten Antigenpräsentation dienen und damit eine Rolle in der CD4<sup>+</sup> T-Zellaktivierung spielen. In einem humanen, antigenspezifischen System wurde der Einfluss von Hsp70 auf die CD4<sup>+</sup> T-Zellaktivierung untersucht. T-Zellen von Donoren mit verschiedenen HLA-DR-Haplotypen wurden mit Peptid alleine oder Hsp70:Peptid-Komplexen stimuliert und die Anzahl proliferierter CD4<sup>+</sup> T-Zellen bestimmt. Es wurden Peptide verwendet, die im Kontext mit dem HLA-Haplotyp des Donors als antigen beschrieben waren. Antigenpezifität proliferierter T-Zellen wurde mittels HLA-DR-Tetramer-Färbung gezeigt. Die Stimulation mit Hsp70:Peptid-Komplexen führte zu einer deutlich verstärkten Proliferation antigenspezifischer CD4<sup>+</sup> T-Zellen, insbesondere unter Bedingungen mit äußerst geringen Peptidmengen oder einer reduzierten Zahl antigenpräsentierender Zellen. Mit Hsp70:Peptid-Komplexen konnte eine antigenspezifische T-Zellproliferation in Konzentrationen gemessen werden, in denen Peptid alleine zu keiner Proliferation führte. Die vorausgehende Komplexierung von Hsp70 mit dem Peptid war essentiell für diese Hsp70-abhängige Proliferationsverstärkung, Kontrollproteine zeigten keinen Effekt.

Insgesamt konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass HSP70-Moleküle an HLA-DR-Peptidfragmente mit unterschiedlicher Affinität binden können. Intakte HLA-DR-Moleküle können spezifisch mit humanem Hsp70 interagieren. Eine verstärkte Immunogenität von Hsp70-gebundenen Peptiden bei der Stimulation humaner, antigenspezifischer CD4<sup>+</sup> T-Zellen wurde gefunden.

## 7 LITERATUR

- Albani S, Roudier J (1992) Molecular basis for the association between HLA DR4 and rheumatoid arthritis. From the shared epitope hypothesis to a peptidic model of rheumatoid arthritis. *Clin. Biochem.* 25:209-12
- Ang D, Liberek K, Skowrya D, Zylicz M, Georgopoulos C (1991) Biological role and regulation of the universally conserved heat shock proteins. *J. Biol. Chem.* 266:24233-6
- Arnold SD, Hanau D, Spehner D, Schmid C, Rammensee HG, De-La-Salle H, Schild H (1999) Cutting edge: Receptor-mediated endocytosis of heat shock proteins by professional antigen-presenting cells. *JOURNAL OF IMMUNOLOGY* 162:3757-60
- Asea A, Kraeft SK, Kurt-Jones EA, Stevenson MA, Chen LB, Finberg RW, Koo GC, Calderwood SK (2000) HSP70 stimulates cytokine production through a CD14-dependant pathway, demonstrating its dual role as a chaperone and cytokine. *Nat. Med.* 6:435-42
- Asea A, Rehli M, Kabingu E, Boch JA, Bare O, Auron PE, Stevenson MA, Calderwood SK (2002) Novel signal transduction pathway utilized by extracellular HSP70: role of toll-like receptor (TLR) 2 and TLR4. *J. Biol. Chem.* 277:15028-34
- Auger I, Escola JM, Gorvel JP, Roudier J (1996) HLA-DR4 and HLA-DR10 motifs that carry susceptibility to rheumatoid arthritis bind 70-kD heat shock proteins. *Nature Med.* 2:306-10
- Auger I, Lepecuchel L, Roudier J (2002) Interaction between heat-shock protein 73 and HLA-DRB1 alleles associated or not with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 46:929-33
- Auger I, Roudier J (1997) A function for the QKRAA amino acid motif: Mediating binding of DnaJ to DnaK - Implications for the association of rheumatoid arthritis with HLA-DR4. *J. Clin. Invest.* 99:1818-22
- Basu S, Binder RJ, Ramalingam T, Srivastava PK (2001) CD91 is a common receptor for heat shock proteins gp96, hsp90, hsp70, and calreticulin. *Immunity.* 14:303-13
- Basu S, Binder RJ, Suto R, Anderson KM, Srivastava PK (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.* 12:1539-46
- Bausinger H, Lipsker D, Ziylan U, Manie S, Briand JP, Cazenave JP, Muller S, Haeuw JF, Ravanat C, de la SH, Hanau D (2002) Endotoxin-free heat-shock protein 70 fails to induce APC activation. *Eur. J Immunol* 32:3708-13
- Becker T, Hartl FU, Wieland F (2002) CD40, an extracellular receptor for binding and uptake of Hsp70-peptide complexes. *J. Cell Biol.* 158:1277-85

- Benoist C, Mathis D (1990) Regulation of major histocompatibility complex class-II genes: X, Y and other letters of the alphabet. *Annu. Rev Immunol* 8:681-715
- Berwin B, Hart JP, Pizzo SV, Nicchitta CV (2002) Cutting Edge: CD91-Independent Cross-Presentation of GRP94(gp96)-Associated Peptides. *J Immunol* 168:4282-6
- Binder RJ, Han DK, Srivastava PK (2000) CD91: a receptor for heat shock protein gp96. *Nat. Immunol* 1:151-5
- Binder RJ, Vatner R, Srivastava P (2004) The heat-shock protein receptors: some answers and more questions. *Tissue Antigens* 64:442-51
- Blachere NE, Li ZH, Chandawarkar RY, Suto R, Jaikaria NS, Basu S, Udono H, Srivastava PK (1997) Heat shock protein-peptide complexes, reconstituted in vitro, elicit peptide-specific cytotoxic T lymphocyte response and tumor immunity. *J. Exp. Med.* 186:1315-22
- Bodmer JG, Marsh SGE, Albert ED, Bodmer WF, Bontrop RE, Dupont B, Erlich HA, Hansen JA, Mach B, Mayr WR, Parham P, Petersdorf EW, Sasazuki T, Schreuder GMT, Strominger JL, Svejgaard A, Terasaki PI (1999) Nomenclature for factors of the HLA system, 1998. *Tissue Antigens.* 53:407-46
- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72:248-54
- Brown JH, Jardetzky TS, Gorga JC, Stern LJ, Urban RG, Strominger JL, Wiley DC (1993) Three-dimensional structure of the human class II histocompatibility antigen HLA-DR1 [see comments]. *Nature* 364:33-9
- Buckner JH, Holzer U, Novak EJ, Reijonen H, Kwok WW, Nepom GT (2002) Defining antigen-specific responses with human MHC class II tetramers. *J Allergy Clin. Immunol* 110:199-208
- Carmichael P, Copier J, So A, Lechler R (1997) Allele-specific variation in the degeneracy of major histocompatibility complex (MHC) restriction. *Hum. Immunol* 54:21-9
- Castellino F, Boucher PE, Eichelberg K, Mayhew M, Rothman JE, Houghton AN, Germain RN (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.* 191:1957-64
- Chicz RM, Urban RG, Gorga JC, Vignali DA, Lane WS, Strominger JL (1993) Specificity and promiscuity among naturally processed peptides bound to HLA-DR alleles. *J. Exp. Med.* 178:27-47
- Cohen IR, Young DB (1991) Autoimmunity, microbial immunity and the immunological homunculus. *Immunol. Today* 12:105-10
- Danke NA, Koelle DM, Yee C, Beheray S, Kwok WW (2004) Autoreactive T Cells in Healthy Individuals. *J Immunol* 172:5967-72

- Danke NA, Kwok WW (2003) HLA Class II-Restricted CD4+ T Cell Responses Directed Against Influenza Viral Antigens Postinfluenza Vaccination. *J Immunol* 171:3163-9
- Davenport MP, Godkin A, Friede T, Stevanovic S, Willis AC, Hill AV, Rammensee HG (1997) A distinctive peptide binding motif for HLA-DRB1\*0407, an HLA-DR4 subtype not associated with rheumatoid arthritis. *Immunogenetics* 45:229-32
- Davis MM, Bjorkman PJ (1988) T-cell antigen receptor genes and T-cell recognition. *Nature* 334:395-402
- de Crouy CA, Kohiyama M, Richarme G (1996) Specificity of DnaK for arginine/lysine and effect of DnaJ on the amino acid specificity of DnaK. *J. Biol. Chem.* 271:15486-90
- De-Graeff-Meeder ER, Van-Eden W, Rijkers GT, Prakken BJ, Kuis W, Voorhorst OM, van-der-Zee R, Schuurman HJ, Helders PJ, Zegers BJ (1995) Juvenile chronic arthritis: T cell reactivity to human HSP60 in patients with a favorable course of arthritis. *J. Clin. Invest.* 95:934-40
- DeNagel DC, Pierce SK (1992) A case for chaperones in antigen processing. *Immunol. Today* 13:86-9
- Denzin LK, Cresswell P (1995) HLA-DM induces CLIP dissociation from MHC class II alpha beta dimers and facilitates peptide loading. *Cell* 82:155-65
- Dessen A, Lawrence CM, Cupo S, Zaller DM, Wiley DC (1997) X-ray crystal structure of HLA-DR4 (DRA\*0101, DRB1\*0401) complexed with a peptide from human collagen II. *Immunity* 7:473-81
- Diethelm-Okita BM, Raju R, Okita DK, Conti-Fine BM (1997) Epitope repertoire of human CD4+ T cells on tetanus toxin: identification of immunodominant sequence segments. *J. Infect. Dis.* 175:382-91
- Doody ADH, Kovalchin JT, Mihalyo MA, Hagymasi AT, Drake CG, Adler AJ (2004) Glycoprotein 96 Can Chaperone Both MHC Class I- and Class II-Restricted Epitopes for In Vivo Presentation, but Selectively Primes CD8+ T Cell Effector Function. *J Immunol* 172:6087-92
- Feldmann M, Brennan FM, Maini RN (1996) Rheumatoid arthritis. *Cell* 85:307-10
- Fields GB, Noble RL (1990) Solid phase peptide synthesis utilizing 9-fluorenylmethoxycarbonyl amino acids. *Int. J. Pept. Prot. Res.* 35:161-214
- Flaherty KM, DeLuca FC, McKay DB (1990) Three-dimensional structure of the ATPase fragment of a 70K heat-shock cognate protein [see comments]. *Nature* 346:623-8
- Flynn GC, Chappell TG, Rothman JE (1989) Peptide binding and release by proteins implicated as catalysts of protein assembly. *Science* 245:385-90

Gao B, Tsan MF (2003) Endotoxin Contamination in Recombinant Human Heat Shock Protein 70 (Hsp70) Preparation Is Responsible for the Induction of Tumor Necrosis Factor alpha Release by Murine Macrophages. *J. Biol. Chem.* 278:174-9

Gething MJ, Blond ES, Buchner J, Fourie A, Knarr G, Modrow S, Nanu L, Segal M, Sambrook J (1995) Binding sites for Hsp70 molecular chaperones in natural proteins. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 60:417-28

Gething MJ, Sambrook J (1992) Protein folding in the cell. *Nature* 355:33-45

Gonzalez GM, Nabozny GH, Bull MJ, Zanelli E, Douhan J, Griffiths MM, Glimcher LH, Luthra HS, David CS (1994) Protective role of major histocompatibility complex class II Ebd transgene on collagen-induced arthritis. *J. Exp. Med.* 180:1559-64

Gonzalez GM, Zanelli E, Khare SD, Krco CJ, Zhou P, Inoko H, Griffiths MM, Luthra HS, David CS (1996) Human leukocyte antigen-DRB1\*1502 (DR2Dw12) transgene reduces incidence and severity of arthritis in mice. *Hum. Immunol.* 50:54-60

Gonzalez GM, Zanelli E, Krco CJ, Nabozny GH, Hanson J, Griffiths MM, Luthra HS, David CS (1995) Polymorphism of the MHC class II Eb gene determines the protection against collagen-induced arthritis. *Immunogenetics* 42:35-40

Gorga JC, Horejsi V, Johnson DR, Raghupathy R, Strominger JL (1987) Purification and characterization of class II histocompatibility antigens from a homozygous human B cell line. *J. Biol. Chem.* 262:16087-94

Gragerov A, Gottesman ME (1994) Different peptide binding specificities of hsp70 family members. *J. Mol. Biol.* 241:133-5

Gregersen PK, Silver J, Winchester RJ (1987) The shared epitope hypothesis. An approach to understanding the molecular genetics of susceptibility to rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 30:1205-13

Hammer J, Gallazzi F, Bono E, Karr RW, Guenot J, Valsasnini P, Nagy ZA, Sinigaglia F (1995) Peptide binding specificity of HLA-DR4 molecules: correlation with rheumatoid arthritis association [see comments]. *J. Exp. Med.* 181:1847-55

Hanyecz A, Bardos T, Berlo SE, Buzas E, Nesterovitch AB, Mikecz K, Glant TT (2003) Induction of arthritis in SCID mice by T cells specific for the "shared epitope" sequence in the G3 domain of human cartilage proteoglycan. *Arthritis Rheum.* 48:2959-73

Harrison CJ, Hayer-Hartl M, Di Liberto M, Hartl F, Kuriyan J (1997) Crystal structure of the nucleotide exchange factor GrpE bound to the ATPase domain of the molecular chaperone DnaK. *Science* 276:431-5

Hartl FU (1996) Molecular chaperones in cellular protein folding. *Nature* 381:571-9

James P, Pfund C, Craig EA (1997) Functional specificity among Hsp70 molecular chaperones. *Science* 275:387-9



Javid B, MacAry PA, Oehlmann W, Singh M, Lehner PJ (2004) Peptides complexed with the protein HSP70 generate efficient human cytolytic T-lymphocyte responses. *Biochem. Soc. Trans.* 32:622-5

Kalbacher H, Beck H (1999) A Tentacle -type Peptide Resin Allows The Simultaneous Synthesis Of peptide Antigens and of an Affinity Matrix for Antipeptide Antibodies. In: Bajusz and Hudecz (ed), pp 98-9

Kingston AE, Hicks CA, Colston MJ, Billingham ME (1996) A 71-kD heat shock protein (hsp) from *Mycobacterium tuberculosis* has modulatory effects on experimental rat arthritis. *Clin. Exp. Immunol.* 103:77-82

Klohe EP, Watts R, Bahl M, Alber C, Yu WY, Anderson R, Silver J, Gregersen PK, Karr RW (1988) Analysis of the molecular specificities of anti-class II monoclonal antibodies by using L cell transfectants expressing HLA class II molecules. *J Immunol* 141:2158-64

Kuppner MC, Gastpar R, Gelwer S, Nossner E, Ochmann O, Scharner A, Issels RD (2001) The role of heat shock protein (hsp70) in dendritic cell maturation: hsp70 induces the maturation of immature dendritic cells but reduces DC differentiation from monocyte precursors. *Eur. J. Immunol.* 31:1602-9

Kwok WW, Liu AW, Novak EJ, Gebe JA, Ettinger RA, Nepom GT, Reymond SN, Koelle DM (2000) HLA-DQ Tetramers Identify Epitope-Specific T Cells in Peripheral Blood of Herpes Simplex Virus Type 2-Infected Individuals: Direct Detection of Immunodominant Antigen-Responsive Cells. *J Immunol* 164:4244-9

Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-5

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

Li Z, Menoret A, Srivastava P (2002) Roles of heat-shock proteins in antigen presentation and cross-presentation. *Curr. Opin. Immunol.* 14:45-51

Liberek K, Marszalek J, Ang D, Georgopoulos C, Zylicz M (1991) *Escherichia coli* DnaJ and GrpE heat shock proteins jointly stimulate ATPase activity of DnaK. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 88:2874-8

Lindquist S (1986) The heat-shock response. *Annu. Rev. Biochem.* 55:1151-91

Lipsker D, Ziylan U, Spehner D, Proamer F, Bausinger H, Jeannin P, Salamero J, Bohbot A, Cazenave JP, Drillien R, Delneste Y, Hanau D, de la SH (2002) Heat shock proteins 70 and 60 share common receptors which are expressed on human monocyte-derived but not epidermal dendritic cells. *Eur. J. Immunol.* 32:322-32

MacAry PA, Javid B, Floto RA, Smith KG, Oehlmann W, Singh M, Lehner PJ (2004) HSP70 peptide binding mutants separate antigen delivery from dendritic cell stimulation. *Immunity.* 20:95-106

Maier JT (2004) Über die Möglichkeit einer Assoziation zwischen dem Nicht-Binden von Hitze-Schock-Proteinen an Peptidsequenzen aus HLA-DRB1 und der Protektion

vor rheumatoider Arthritis. Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin der Medizinischen Fakultät der Eberhard-Karls-Universität Tübingen

Maier JT, Haug M, Foll JL, Beck H, Kalbacher H, Rammensee HG, Dannecker GE (2002) Possible association of non-binding of HSP70 to HLA-DRB1 peptide sequences and protection from rheumatoid arthritis. *Immunogenetics* 54:67-73

Marsh SGE, Parham P, Barber LD (2000), *The HLA Facts Book*, Academic Press

Marsh SGE (1998) HLA class II region sequences, 1998. *Tissue Antigens*. 51:467-507

McClellan AJ, Frydman J (2001) Molecular chaperones and the art of recognizing a lost cause. *Nat. Cell Biol.* 3:E51-E53

Mycko MP, Cwiklinska H, Szymanski J, Szymanska B, Kudla G, Kilianek L, Odyniec A, Brosnan CF, Selmaj KW (2004) Inducible Heat Shock Protein 70 Promotes Myelin Autoantigen Presentation by the HLA Class II. *J Immunol* 172:202-13

Neefjes J (1999) CIIV, MIIC and other compartments for MHC class II loading. *Eur. J. Immunol.* 29:1421-5

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

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

Ollier B, (1996) Shock revelations about HLA-DR4- a shortcut to rheumatoid arthritis? *Nat. Med.* 3:279-280

Palleros DR, Reid KL, Shi L, Fink AL (1993) DnaK ATPase activity revisited. *FEBS Lett.* 336:124-8

Panjwani N, Akbari O, Garcia S, Brazil M, Stockinger B (1999) The HSC73 molecular chaperone: Involvement in MHC class II antigen presentation. *J Immunol* 163:1936-42

Ragno S, Colston MJ, Lowrie DB, Winrow VR, Blake DR, Tascon R (1997) Protection of rats from adjuvant arthritis by immunization with naked DNA encoding for mycobacterial heat shock protein 65. *Arthritis Rheum* 40:277-83

Rammensee H, Bachmann J, Emmerich NP, Bachor OA, Stevanovic S (1999) SYFPEITHI: database for MHC ligands and peptide motifs. *Immunogenetics* 50:213-9

Rammensee HG (1995) Chemistry of peptides associated with MHC class I and class II molecules. *Curr. Opin. Immunol.* 7:85-96

Reece JC, Geysen HM, Rodda SJ (1993) Mapping the major human T helper epitopes of tetanus toxin. The emerging picture. *J. Immunol.* 151:6175-84

Reichstetter S, Ettinger RA, Liu AW, Gebe JA, Nepom GT, Kwok WW (2000) Distinct T Cell Interactions with HLA Class II Tetramers Characterize a Spectrum of TCR Affinities in the Human Antigen-Specific T Cell Response. *J Immunol* 165:6994-8

Reviron D, Perdriger A, Toussirot E, Wendling D, Balandraud N, Guis S, Semana G, Tiberghien P, Mercier P, Roudier J (2001) Influence of shared epitope-negative HLA-DRB1 alleles on genetic susceptibility to rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 44:535-40

Rich T, Gruneberg U, Trowsdale J (1998) Heat shock proteins, HLA-DR and rheumatoid arthritis. *Nature Med.* 4:1210

Ritossa F (1962) A new puffing pattern induced by temperature shock and DNP in *Drosophila*. *Experientia* 18:571-3

Roth S, Willcox N, Rzepka R, Mayer MP, Melchers I (2002) Major differences in antigen-processing correlate with a single Arg71<-->Lys substitution in HLA-DR molecules predisposing to rheumatoid arthritis and with their selective interactions with 70-kDa heat shock protein chaperones. *J. Immunol.* 169:3015-20

Rudiger S, Buchberger A, Bukau B (1997a) Interaction of Hsp70 chaperones with substrates. *Nat. Struct. Biol.* 4:342-9

Rudiger S, Germeroth L, SchneiderMergener J, Bukau B (1997b) Substrate specificity of the DnaK chaperone determined by screening cellulose-bound peptide libraries. *EMBO JOURNAL* 16:1501-7

Rudiger S, Schneider-Mergener J, Bukau B (2001) Its substrate specificity characterizes the DnaJ co-chaperone as a scanning factor for the DnaK chaperone. *EMBO J.* 20:1042-50

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* 155:1151-64

Schenning L, Larhammar D, Bill P, Wiman K, Jonsson AK, Rask L, Peterson PA (1984) Both alpha and beta chains of HLA-DC class II histocompatibility antigens display extensive polymorphism in their amino-terminal domains. *EMBO J* 3:447-52

Schild H, Arnold SD, Lammert E, Rammensee HG (1999) Stress proteins and immunity mediated by cytotoxic T lymphocytes. *Curr. Opin. Immunol.* 11:109-13

Sebzda E, Wallace VA, Mayer J, Yeung RS, Mak TW, Ohashi PS (1994) Positive and negative thymocyte selection induced by different concentrations of a single peptide. *Science* 263:1615-8

SenGupta D, Norris PJ, Suscovich TJ, Hassan-Zahraee M, Moffett HF, Trocha A, Draenert R, Goulder PJR, Binder RJ, Levey DL, Walker BD, Srivastava PK, Brander C (2004) Heat Shock Protein-Mediated Cross-Presentation of Exogenous HIV Antigen on HLA Class I and Class II. *J Immunol* 173:1987-93

- Singh-Jasuja H, Hilf N, Arnold-Schild D, Schild H (2001) The role of heat shock proteins and their receptors in the activation of the immune system. *Biol. Chem.* 382:629-36
- Singh-Jasuja H, Scherer HU, Hilf N, Arnold-Schild D, Rammensee HG, Toes RE, Schild H (2000a) The heat shock protein gp96 induces maturation of dendritic cells and down-regulation of its receptor. *Eur. J. Immunol.* 30:2211-5
- Singh-Jasuja H, Toes RE, Spee P, Munz C, Hilf N, Schoenberger SP, Ricciardi-Castagnoli P, Neefjes J, Rammensee HG, Arnold-Schild D, Schild H (2000b) Cross-presentation of glycoprotein 96-associated antigens on major histocompatibility complex class I molecules requires receptor-mediated endocytosis. *J. Exp. Med.* 191:1965-74
- Smith DR, Rossi CA, Kijek TM, Henchal EA, Ludwig GV (2001) Comparison of Dissociation-Enhanced Lanthanide Fluorescent Immunoassays to Enzyme-Linked Immunosorbent Assays for Detection of Staphylococcal Enterotoxin B, *Yersinia pestis*-Specific F1 Antigen, and Venezuelan Equine Encephalitis Virus. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 8:1070-5
- Snijders A, Elferink DG, Geluk A, Der Zanden A.L, Vos K, Schreuder GM, Breedveld FC, de Vries RR, Zanelli EH (2001) An HLA-DRB1-derived peptide associated with protection against rheumatoid arthritis is naturally processed by human APCs. *J. Immunol.* 166:4987-4993.
- Srivastava P (2002a) Roles of heat-shock proteins in innate and adaptive immunity. *Nat. Rev. Immunol.* 2:185-94
- Srivastava PK, Menoret A, Basu S, Binder RJ, McQuade KL (1998) Heat shock proteins come of age: primitive functions acquire new roles in an adaptive world. *Immunity.* 8:657-65
- Srivastava P (2002b) Interaction of Heat Shock Proteins with Peptides and Antigen Presenting Cells: Chaperoning of the Innate and Adaptive Immune Responses. *Ann. Rev. Immunol.* 20:395-425
- Stastny P (1978) Association of the B-cell alloantigen DRw4 with rheumatoid arthritis. *N. Engl. J. Med.* 298:869-71
- Stern LJ, Brown JH, Jardetzky TS, Gorga JC, Urban RG, Strominger JL, Wiley DC (1994) Crystal structure of the human class II MHC protein HLA-DR1 complexed with an influenza virus peptide. *Nature* 368:215-21
- Suto R, Srivastava PK (1995) A mechanism for the specific immunogenicity of heat shock protein-chaperoned peptides. *Science* 269:1585-8
- Takenaka IM, Leung SM, McAndrew SJ, Brown JP, Hightower LE (1995) Hsc70-binding peptides selected from a phage display peptide library that resemble organellar targeting sequences. *J. Biol. Chem.* 270:19839-44
- Tamura Y, Peng P, Liu K, Daou M, Srivastava PK (1997) Immunotherapy of Tumors with Autologous Tumor-Derived Heat Shock Protein Preparations. *Science* 278:117-20

- Tavaria M, Gabriele T, Anderson RL, Mirault ME, Baker E, Sutherland G, Kola I (1995) Localization of the gene encoding the human heat shock cognate protein, HSP73, to chromosome 11. *Genomics* 29:266-8
- Tobian AAR, Canaday DH, Harding CV (2004) Bacterial Heat Shock Proteins Enhance Class II MHC Antigen Processing and Presentation of Chaperoned Peptides to CD4+ T Cells. *J Immunol* 173:5130-7
- Todryk S, Melcher AA, Hardwick N, Linardakis E, Bateman A, Colombo MP, Stoppacciaro A, Vile RG (1999) Heat shock protein 70 induced during tumor cell killing induces Th1 cytokines and targets immature dendritic cell precursors to enhance antigen uptake 100. *J. Immunol.* 163:1398-408
- Tompkins SM, Rota PA, Moore JC, Jensen PE (1993) A europium fluoroimmunoassay for measuring binding of antigen to class II MHC glycoproteins. *J. Immunol. Methods* 163:209-16
- Trowsdale J, Ragoussis J, Campbell RD (1991) Map of the human MHC. *Immunol Today* 12:443-6
- Udono H, Srivastava PK (1993) Heat shock protein 70-associated peptides elicit specific cancer immunity. *J Exp. Med.* 178:1391-6
- Vabulas RM, Braedel S, Hilf N, Singh-Jasuja H, Herter S, Ahmad-Nejad P, Kirschning CJ, da Costa C, Rammensee HG, Wagner H, Schild H (2002) The Endoplasmic Reticulum-resident Heat Shock Protein Gp96 Activates Dendritic Cells via the Toll-like Receptor 2/4 Pathway. *J. Biol. Chem.* 277:20847-53
- van Eden W, Holoshitz J, Nevo Z, Frenkel A, Klajman A, Cohen IR (1985) Arthritis induced by a T-lymphocyte clone that responds to *Mycobacterium tuberculosis* and to cartilage proteoglycans. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 82:5117-20
- van Eden W, Thole JE, van der ZR, Noordzij A, van Embden JD, Hensen EJ, Cohen IR (1988) Cloning of the mycobacterial epitope recognized by T lymphocytes in adjuvant arthritis. *Nature* 331:171-3
- van-Roon JA, Van-Eden W, van-Roy JL, Lafeber FJ, Bijlsma JW (1997) Stimulation of suppressive T cell responses by human but not bacterial 60-kD heat-shock protein in synovial fluid of patients with rheumatoid arthritis. *J. Clin. Invest.* 100:459-63
- Verbruggen LA, Dumarey N, Van de Velde H, Rebmann V, Flament J, Van Wayenberge C, Grosse-Wilde H, Demanet C (2000) Soluble HLA-DR antigen levels in serum correlate with rheumatoid arthritis disease activity and the presence of disease-associated epitopes. *Tissue Antigens* 56:436-440
- Wang Y, Kelly CG, Singh M, McGowan EG, Carrara AS, Bergmeier LA, Lehner T (2002) Stimulation of Th1-polarizing cytokines, C-C chemokines, maturation of dendritic cells, and adjuvant function by the peptide binding fragment of heat shock protein 70 46. *J. Immunol.* 169:2422-9
- Wells AD, Malkovsky M (2000) Heat shock proteins, tumor immunogenicity and antigen presentation: an integrated view. *Immunol. Today* 21:129-32

Wendling U, Paul L, van der ZR, Prakken B, Singh M, van Eden W (2000) A conserved mycobacterial heat shock protein (hsp) 70 sequence prevents adjuvant arthritis upon nasal administration and induces IL-10-producing T cells that cross-react with the mammalian self-hsp70 homologue. *J. Immunol.* 164:2711-7

Zanelli E, Breedveld FC, de Vries RR (2000a) Hla class II association with rheumatoid arthritis. Facts and interpretations. *Hum. Immunol.* 61:1254-61

Zanelli E, Breedveld FC, de Vries RRP (2000b) HLA association with autoimmune disease: a failure to protect? *Rheumatology.* 39:1060-6

Zanelli E, Gonzalez GM, David CS (1995) Could HLA-DRB1 be the protective locus in rheumatoid arthritis? *Immunol. Today* 16:274-8

Zanelli E, Krco CJ, Baisch JM, Cheng S, David CS (1996) Immune response of HLA-DQ8 transgenic mice to peptides from the third hypervariable region of HLA-DRB1 correlates with predisposition to rheumatoid arthritis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93:1814-9

Zanelli E, Krco CJ, David CS (1997) Critical residues on HLA-DRB1\*0402 HV3 peptide for HLA-DQ8-restricted immunogenicity: implications for rheumatoid arthritis predisposition. *J. Immunol.* 158:3545-51

Zhu X, Zhao X, Burkholder WF, Gragerov A, Ogata CM, Gottesman ME, Hendrickson WA (1996) Structural analysis of substrate binding by the molecular chaperone DnaK. *Science* 272:1606-14

# VERÖFFENTLICHUNGEN

## Originalarbeiten

Haug M, Dannecker L, Schepp CP, Kwok WW, Wernet D, Buckner JH, Rammensee, HG, Dannecker GE and Holzer U. Heat Shock Protein Hsp70 Enhances antigen specific proliferation of human CD4<sup>+</sup> memory T cells. *Zur Publikation eingereicht*

Haug M, Schepp CP, Kalbacher H, Holzer U, Rammensee HG and Dannecker GE. Interaction of 70 kDa Heat Shock Proteins with HLA-DR molecules and their peptide fragments. *Manuskript in Vorbereitung*

Volz T, Schwarz G, Fleckenstein B, Schepp CP, Haug M, Roth J, Wiesmuller KH, and Dannecker GE (2004) Determination of the peptide binding motif and high-affinity ligands for HLA-DQ4 using synthetic peptide libraries. *Human Immunology* 65:594-601.

Schepp CP, Dannecker L, Haug M, Kummerle-Deschner J, Beck H, Kotter I, Holzer U and Dannecker GE (2004) Autoantibodies in juvenile idiopathic arthritis: glucose-6-phosphate isomerase is not a specific target. *J Rheumatol.* 31:1630-1638.

Maier JT, Haug M, Foll JL, Beck H, Kalbacher H, Rammensee HG and Dannecker GE (2002) Possible association of non-binding of HSP70 to HLA-DRB1 peptide sequences and protection from rheumatoid arthritis. *Immunogenetics* 54:67-73.

## Publizierte Kongressbeiträge

Haug M, Dannecker L, Schepp CP, Wernet D, Kwok WW, Dannecker, GE and Holzer U (2004) Hsp70-chaperoned antigenic peptides facilitate the presentation of MHC II-restricted epitopes and CD4<sup>+</sup> memory T cell-activation. Joint Annual Meeting of the German and Dutch Societies for Immunology (JAMI), Maastricht, The Netherlands, 20.–23.10.2004, *Immunobiology* 209:301

Schepp CP, Haug M, Kuemmerle-Deschner J, Hospach A, Dannecker GE and Holzer U (2004) Effect of TGF- $\beta$ 1 on T cells in Juvenile Idiopathic Arthritis. Joint Annual Meeting of the German and Dutch Societies for Immunology (JAMI), Maastricht, The Netherlands, 20.–23.10.2004, Immunobiology 209:432

Haug M, Schepp CP, Hesse NC, Kalbacher H, Holzer U and Dannecker GE (2003) Heat shock proteins: Interaction with HLA-DR-molecules and the influence on the class II dependent antigen presentation. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Immunologie, Berlin, 24.-27.09.2003, Immunobiology 208:140

Schepp CP, Haug M, Hermann B, Holzer U and Dannecker GE (2003) Antibodies directed against glucose-6-phosphate isomerase in patients with juvenile idiopathic arthritis. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Immunologie, Berlin, 24.-27.09.2003, Immunobiology 208:149

Haug M, Maier JT, Schepp CP, Kalbacher H and Dannecker GE (2002) Interaction of 70 kDa heat shock proteins with HLA-DR molecules and its peptide fragments in rheumatoid arthritis. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Immunologie, Marburg, 25.-28.09.2002, Immunobiology 206:163

Schepp CP, Haug M, Beck H and Dannecker GE (2002) Juvenile idiopathic arthritis: Is it one autoantibody? Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Immunologie, Marburg, 25.-28.09.2002, Immunobiology 206:170

Haug, M, Maier JT, Föll JL, Beck H, Kalbacher H, Rammensee H-G and Dannecker GE (2001) Does non-binding of 70 kDa heat shock proteins to HLA-DR derived peptides mediate protection from rheumatoid arthritis? Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Immunologie, Dresden, 26.-29.09.2001; Immunobiology 204:216

## **Preise**

1. Preis, gestiftet von der Firma Essex-Pharma, beim Kongress der Rheumaforschungsinitiative Tübingen (Poster und Vortrag, *RfiT Tübingen 19.–20.10.2001*)



**Meine akademischen Lehrer waren die Damen und Herren:**

Ammon, Dannecker, Döring, Drews, Gauglitz, Grabmayr, Häfelinger, Hanack, Heide, Kovar, Lindner, Nagel, Pommer, Rammensee, Safayhi, Schmidt, Schultz, Strähle, Wahl, Wankmüller

# LEBENS LAUF

## MARKUS HAUG

13. Juni 1973	Geboren in Sindelfingen
1980 – 1984	Grundschule Schafhausen
1984 – 1993	Johannes-Kepler-Gymnasium, Weil der Stadt
1993	Allgemeine Hochschulreife
1993 – 1994	Zivildienst, Gemeinde Ehningen
Okt. 1994 – Okt. 1998	Studium der Pharmazie an der Eberhard-Karls-Universität Tübingen
April 1997	1. Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung
Okt. 1998	2. Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung
Okt. 1998 – April 1999	Pharmaziepraktikum, öffentliche Apotheke, Reutlingen
Mai 1999 – Okt. 1999	Pharmaziepraktikum, Bayer AG, Pharma-Forschungszentrum, Wuppertal-Elberfeld
Nov. 1999	3. Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung, Approbation zum Apotheker
Dez. 1999 – Juni 2000	Vertretungstätigkeiten in verschiedenen Apotheken
Seit Juli 2000	Wissenschaftlicher Angestellter an der Klinik für Kinder- und Jugendmedizin der Universität Tübingen, Abteilung I.  Anfertigung der Dissertation mit dem Titel „Hitzeschockproteine: Interaktion mit HLA-DR-Molekülen und Einfluss auf die MHC II-vermittelte T-Zellantwort“ unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. Günther Dannecker und Herrn Prof. Dr. Hans-Georg Rammensee.  Förderung durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft: Bis Dez. 2004: Sonderforschungsbereich 510, „Stammzellbiologie und Antigenprozessierung“, Teilprojekt D3 Seit Jan. 2005: DFG-Einzelförderung
März 2003	Forschungsaufenthalt am Benaroya Research Institute (BRI) at Virginia Mason, Seattle, USA