INAUGURAL-DISSERTATION

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

vorgelegt von

Sandra Zitzler

aus Mannheim

Tag der mündlichen Prüfung:

Anbindung und Aufnahme von Hitzeschockprotein-Antigenkomplexen durch Antigenpräsentierende Zellen

Gutachter: Prof. Dr. Felix Wieland

Prof. Dr. Michael Brunner

Für meine Eltern

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis……..4
1. Zusammenfassung 7
Abstract 9
2. Einleitung 11
2.1 Das Immunsystem 11
Die angeborene und adaptive Immunität 11
2.2 Antigenpräsentation 14
2.2.1 MHC Moleküle 14
2.2.2 Antigenerkennung durch T-Zellen 15
2.3 Antigenprozessierung 16
2.3.1 Klassischer MHC-I Weg 16
2.3.2 Klassischer MHC-II Weg 17
2.3.3 Cross presentation und Cross priming 18
2.4 Endozytose 19
2.4.1 Übersicht der verschiedenen Endozytosemechanismen 20
2.4.2 Clathrin-vermittelte Endozytose 20
2.4.3 Detergens-Resistente Membranen (DRM) und Caveolae-vermittelte Endozytose 22
2.4.4 Phagozytose 23
2.4.5 Makropinozytose 25
2.5 Molekulare Chaperone und Hitzeschockproteine 26
2.5.1 Proteinfaltung und Protein-Qualitätskontrolle 26
2.5.2 Molekulare Chaperone 28
2.5.3 Immunogene Eigenschaften von Chaperonen 30
2.6 Zielsetzung der Doktorarbeit 36
3. Ergebnisse 37
3.1 Darstellung von gereinigten, rekombinatem Hsp70, N70 und C70 37
3.1.1 Expression und Aufreinigung 37
3.1.2 Fluoreszenz-Markierung 41
3.2 Bindungsstudien 42
3.2.1 Professionell antigenpräsentierende Zellen binden sowohl extrazelluläres Hsp70* als auch N70* und C70* 42
3.2.2 Die Anbindung von N70* und C70* erfolgt unabhängig voneinander 45
3.2.3 N- und C- Domäne von Hsp70 binden an distinkte Mikrodomänen auf der Plasmamembran 49
3.3 Untersuchungen zur Anbindung von Hsp70 und seinen Domänen an putative Hsp70-Rezeptoren 51

3.3.1 CD 91 als Hsp70 Rezeptor 51
3.3.2 LOX-1 und CD40 als Hsp70 Rezeptoren 59
3.4 Anbindung und Aufnahme von Hsp70-Peptid Komplex 62
3.4.1 Die Aufnahme von beladenem Hsp70 und C70 erfolgt schnell und effizient 62
3.4.2 Auch die ATPase Domäne von Hsp70 wird schnell internalisiert 65
3.4.3 Hsp70 assoziiertes Peptid lokalisiert in PDI und Rab5 positiven Strukturen 66
3.4.4 Unbeladenes Hsp70 wandert in die Lysosomen 70
3.4.5 Sowohl Hsp70- als auch C70-assoziiertes Peptid wird kreuzpräsentiert 71
3.4.6 Die Hsp70 vermittelte Antigenpräsentation erfolgt über die Aufnahme durch den C70 Rezeptor 73
3.5 Steigerung der Aufnahme von freiem Peptid nach Inkubation mit Hsp70 an Raw264.7 Makrophagen 75
4. Diskussion 77
Modell zur Anbindung und Aufnahme von extrazellulärem beladenem und unbeladenem Hsp70 an antigenpräsentierenden Zellen 89
5. Material und Methoden 91
5.1 Materialien 91
5.1.1 Bakterienstämme 91
5.1.2 Medien für Bakterien 91
5.1.3 Zelllinien und Medien 92
5.1.4 Puffer und Lösungen 93
5.1.5 Plasmide 94
5.1.6 Primärantikörper 95
5.1.7 Peptid 96
5.1.8 Markierung von Proteinen 97
5.1.9 Herstellung von Hsp70/C70-Peptid-Komplexen 97
5.2 Biochemische Methoden 98
5.2.1 SDS- PAGE Gelelektophorese nach Lämmli (Lämmli, 1970) 98
5.2.2 Färbemethoden für Proteine 100
5.2.3 Proteinbestimmung nach Bradford 100
5.2.4 Western Blot Analyse 101
5.2.5 Gelfiltration 102
5.3 Herstellung von rekombinaten Proteinen 103
5.3.1 Expression in *E.coli* 103
5.3.2 Aufreinigung von hHsp70 104
5.4 Zellbiologische Arbeiten 107
5.4.1 Fluoreszenz-Mikroskopie 107
5.4.2 Durchflusszytometrie (FACS) 109

5.4.3 CD91 Nachweis 110
5.4.4 Separierung von Detergens- Resistenten Mikrodomänen (DRM)..... 111
5.4.5 Stimulations- Experimente an Raw264.7 Zellen 112
5.4.6 Kreuzpräsentations-Test 113
Literaturverzeichnis……...114
Danksagung……130

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildungen
acLD	Lacetyliertes *low-densitity lipoprotein*
ADP	Adenosin-5´-diphosphat
APC	antigenpräsentierende Zellen
AS	Aminosäure
ATP	Adenosin-5´-triphosphat
Bag	*Bcl12-associated anthanogene*
BSA	Rinderserumalbumin
CD	*clusters of differentiation*
CDR	*complemantarity determining regions*
CHO	*chinese hamster ovary*
CLIP	*class II associated invariant chain peptide*
CpG	Cytosin-phosphatidyl-Guanosin
CTL	cytotoxische T-Lymphozyt
DC	Dendritische Zellen
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DRiPs	*defective ribosomal products*
E.coli	*Escherischa coli*
ECL	*enhanced chemiluminescence*
EDTA	Ethylendiamin-tetraessigsäure
EEA1	*early endosomal antigen* 1
EGF	*epidermal growth factor*
ER	Endoplasmatisches Retikulum
FACS	*fluorescence activated cells sorting*
FKS	fötales Kälberserum
g	Erdbeschleunigung
GEM	*glycosphingolipid enriched embranes*
GM-CSF	Granulozyten-Makrophagen koloniestimuliernder Faktor
GPI	Glykosylphosphoinositol
GRP	g*lucose-regulated protein*

HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-1-ethansulfonsäure
HLA	*Human Leukocyte Antigen* → die einzelnen Genloci werden durch Großbuchstaben gekennzeichnet
HRP	*Horseradish peroxidase*
Hsc	konstitutiv expremiertes Hitzeschockprotein
Hsp	Hitzeschockprotein
HspBP	Hitzeschockprotein-*binding protein*
Ig	Immunglobulin → die verschiedenen Isotypen sind IgM, IgD, IgG, IgA und IgE
IL	Interleukin
IPTG	Isopropyl-ß-D-thiogalactopyranosid
ITAM	*immunoreceptor tyrosine based activation motifs*
kD	Kilodalton
KLH	*Keyhole Limpet Hemocyanin*
LAL	Limulus Amöbozyten Lysat
LB	Luria -Bertani
LBP	*Lipopolysaccharid binding protein*
LDL	*low-densitity lipoprotein*
LPS	Lipopolysaccharid
LRP	LDL-*receptor related protein*
MAPK	m*itogen-activated protein Kinase*
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex
NAC	*nascent chain*-assozierter Komplex
NEF	Nukleotidaustausch-Faktor
NF-κB	*nuclear factor- κB*
NK	natürliche Killerzellen
nm	nanometer
OD	optische Dichte
Ova	Ovalbumin
OvaBiP	$Ovalbumin_{257-264}$ gekoppelt über GSG-linker an Sequenzen vom Cochaperon BiP
ox-LDL	oxidiertes *low-densitity lipoprotein*

PAGE	Polyacrylamid-Gelektrophorese
PAMP	*pathogen-associated molecular pattern*
PDI	Protein-Disulfid-Isomerase
PFA	Paraformaldehyd
PFD	Prefoldin
PI3K	*Phosphoinositid 3-Kinase*
PLAD	*preligand assembly domain*
PRR	*Pattern Recognition*- Rezeptoren
PVDF	Polyvinylidendifluorid
RT	Raumtemperatur
rpm	*rounds per minute*
SDS	Natriumdodecylsulfat
SR	*Scavanger receptor*
SRCR	*Scavanger*-Rezeptor Cystein- reichen Domäne
TAP	*transporter associated with antigen processing*
TB	Terific Broth
TCR	T-Zellrezeptor
TEMED	N,N,N´,N´-Tetramethylethylendiamin
TF	*trigger factor*
T_H	T-Helfer Zellen
TLR	*toll-like receptor*
TNF	Tumornekrosefaktor
Tris	Tris-(hydroxyl)-aminoethan
Tween20	Polyoxyethylen-sorbitat Monolaureat
UPS	Ubiquitinin-Proteasom System
v/v	Volumenverhältnis
w/v	Gewicht/Volumenverhältnis

Zusammenfassung/Abstract

1. Zusammenfassung

Hsp70 sowie verschiedene andere molekulare Chaperone finden mehr und mehr einen wirkungsvollen Einsatz in der Tumortherapie. Dabei kommt Hsp70 eine wesentliche Rolle als Adjuvans in der Aktivierung von antigenpräsentierenden Zellen (APCs) und der Kreuzpräsentation extrazellulärer Antigene auf MHC-I Molekülen zu. Für die Bindung und Aufnahme von Hsp70 gebundenem Antigen wurden verschiedene Rezeptoren auf der Zelloberfläche antigenpräsentierender Zellen postuliert.

CD91 wurde als erster Zelloberflächenrezeptor für die Hitzeschockproteine Hsp90, GRP94, Hsp70 und Calreticulin auf Raw264.7 Zellen beschrieben. Unter den in der vorliegenden Arbeit verwendeten Bedingungen exprimierten Raw264.7 Zellen sowohl vor als auch nach LPS Stimulation funktionelles CD91, wobei die Fähigkeit Hsp70 zu binden nach Stimulation verloren ging. Konträr zu den bereits publizierten Daten exprimierten unstimulierte Raw309 Cr.1 Zellen funktionelles CD91 ohne jedoch Hsp70 spezifisch zu binden, wohingegen nach LPS Stimulation eine spezifische Hsp70 Anbindung beobachtet wurde. CHO-Zellen, die funktionelles CD91 überexprimierten, zeigten keine spezifische Bindung von Hsp70.

Für humanes und mykobakterielles Hsp70 wurden neben CD91 die Zelloberflächenrezeptoren LOX-1 und CD40 beschrieben. Unter Verwendung für CD40 und LOX-1 spezifischer Liganden konnte in Kompetitionsexperimenten an Raw264.7 Zellen weder eine Inhibierung der N70 noch eine Inhibierung der C70 Anbindung festgestellt werden.

Zusammenfassend können daher anhand der vorliegenden Daten die beschriebenen Rezeptoren CD91 sowie LOX-1 in dem verwendeten System als HSP70 Rezeptoren ausgeschlossen werden. Hinsichtlich des CD40 Rezeptors konnte keine Inhibierung der Subdomänen von Hsp70 unter Verwendung des CD40 Antikörpers beobachtet werden. Folglich kommt das Epitop, welches vom CD40 Antikörper erkannt wird, nicht als putative Bindungsstelle für Hsp70 in Frage. Darüber hinaus geht eine

erhöhte Expression von CD40 auf der Plasmamembran von Raw264.7 Zellen nicht mit einer verstärkten Anbindung von Hsp70 einher, was CD40 als “Massenrezeptor“ in diesen Zellen mit großer Wahrscheinlichkeit ausschließt. Die in dieser Arbeit vorgestellten Daten zeigen die Existenz mehrerer, mindestens aber von zwei Rezeptoren für Hsp70, wobei diese Rezeptoren unterschiedliche Domänen des Hsp70-Moleküls erkennen. Raw264.7 Zellen, aber auch D2.4 Zellen binden den Hsp70-Antigen Komplex an bestimmten Bereichen der Zelloberfläche. Dabei erfolgt die spezifische Bindung der Untereinheiten C70 und N70 an deutlich voneinander getrennten Mikrodomänen auf der Zelloberfläche, wobei C70 an Detergens-resistente Domänen und N70 außerhalb dieser Bereiche bindet. Unter physiologischen Bedingungen (37°C) wird der Hsp70-Antigen-Komplex rasch und effizient aufgenommen, wobei früh eine Trennung von beladenem und unbeladenem Hsp70 stattfindet. Kurz nach der Aufnahme des Hsp70-Antigen-Komplexes lokalisiert beladenes Hsp70 in Rab5 positiven retikulären Strukturen, wo es auch im beobachteten Zeitraum auch verbleibt, wohingegen unbeladenes Hsp70 nach 20 min in lysosomalen Kompartimenten zu finden ist.

Letztlich konnte mit Hilfe des $CD8^+$ T-Zell Hybridom System B3Z gezeigt werden, dass Hsp70- aber auch C70 assoziiertes Antigen effektiv auf MHC-Klasse I Molekülen kreuzpräsentiert wird, d.h die beobachtete Bindung und Internalisierung funktionell für die Kreuzpräsentation ist. Die Anbindung von N70 führt hingegen zu einer erhöhten makropinozytotischen Aufnahme von freiem antigenem Peptid, was für diese Domäne eine neue Funktion aufzeigt.

Abstract

Heat shock protein 70 (HSP70) and other molecular chaperones are used more and more for increasingly effective in tumor immunotherapy. HSP70 has a significant role in activating the APC and working as a carrier protein to deliver extracellular antigens to MHC class I molecules. Although the nature of high affinity receptors for HSP70 binding to the APC cell surface has still not been fully defined, four main classes of cell surface structure have been suggested, including the CD91 receptors, LOX-1 and CD40.

CD91 has been proposed as a receptor for HSP70, GRP94, HSP90 and calreticulin on the cell surface of Raw264.7 cells. Both LPS-treated and non-treated Raw264.7 cells express CD91 on their cell surface, but the capacity to bind Hsp70 was abolished in these cells. Contrary to previously published data, untreated Raw309 Cr.1 cells did express CD91 on the cell surface, however no specific Hsp70 binding was observed. Upon treating the cells with LPS, binding of HSP70 was observed. CHOs expressing functional CD91 did not bind Hsp70.

To address the question of CD40 and LOX-1 as putative receptors, competition experiments were performed. By using specific ligands no inhibition of N70 or C70 was observed.

The data therefore indicate that CD91 and LOX-1 can be excluded as receptors for HSP70 binding. Consequently, the epitope of the CD40 antibody is not recognized as a putative connection domain for Hsp70. In addition, the expression of CD40 on the cell surface of Raw264.7 macrophages does not correlate with the binding of Hsp70. Therefore, CD40 can be excluded for Raw264.7 macrophages as mass receptor.

The data introduced in this work show the existence of several, at least two, receptors for HSP70. APCs bind the HSP70-antigen-complex in certain domains of the cell surface. The subunit C70 and N70 bind specifically in clear microdomains separate of each other on the cell surface. In addition, C70 binds raft domains, whereas N70 binds outside these areas. Under physiological conditions (37°C), the HSP70-antigen-complex is taken up quickly and efficiently and an early separation of loaded and unloaded Hsp70 was observed. Shortly after the uptake of the Hsp70-antigen-complex loaded HSP70 was found to be localised in Rab5-positive

reticular structures, whereas after 20 min the unloaded Hsp70 was found in lysosomal compartments.

Finally, results from $CD8^+$ T-cell hybridoma system B3Z show that Hsp70 as well as C70- associated antigen, is presented on MHC class I molecules. The binding of N70 leads to an increase in the macropinocytosis of extracellular antigen, thus describing a new function for this domain.

2. Einleitung

2.1 Das Immunsystem

Die Artenvielfalt der Natur erfordert von jedem Organismus die Fähigkeit zur Verteidigung des eigenen Lebensraums. Bei den Vertebraten hat sich im Laufe der Evolution ein komplexes und hochspezifisches Abwehrsystem entwickelt, welches den Organismus gegen Viren, Bakterien, Pilze und Parasiten sowie gegen entartete Zellen zu schützen versucht. Hierbei liegt der Schwerpunkt auf der spezifischen Erkennung körperfremder Substanzen und Strukturen und deren selektive Bekämpfung. Durch ein sensibles Gleichgewicht von Aktivierung und Unterdrückung dieses Immunsystems wird dabei verhindert, dass es sich gegen körpereigene Strukturen wendet.

Die angeborene und adaptive Immunität

Bei der Entwicklung von Immunität eines Organismus gegen einen Infektionserreger oder ein Antigen wird zwischen der angeborenen und der adaptiven, erworbenen Immunantwort unterschieden, wobei sich beide Systeme unterscheiden und Hand in Hand arbeiten. Der angeborene Teil der Immunität ist phylogenetisch alt. Viele der daran beteiligten Gene sind nicht nur in Vertebraten, sondern auch in Invertebraten und Pflanzen zu finden (Medzhitov and Janeway, 2000a). Für die Antigenerkennung wird dabei ein relativ kleines Repertoire an Rezeptoren für konservierte mikrobielle Strukturen schnell und unmittelbar nach einer Infektion eingesetzt. Zu den Effektoren zählen Lysozym, phagozytierende Zellen (Aderem and Underhill, 1999), die alternative Komplementkaskade sowie natürliche Killerzellen.

Den phagozytierenden Zellen kommt mit ihrer Fähigkeit zur professionellen Antigenpräsentation und der Sekretion von Botenstoffen (Zytokine, Chemokine) die Vermittlerrolle als Akteure in der adaptiven Immunantwort (T- und B- Lymphozyten) zu, welche sich durch die Erkennung spezifischer Antigene, Fremd-Selbst-Erkennung

und ein immunologisches Gedächtnis (Zinkernagel, 2000) auszeichnet. Hierbei wird mit einer großen Vielfalt an Rezeptoren (Diversität) gearbeitet.

I. Angeborene Immunität:

Die angeborene Immunantwort wird durch verschieden molekulare und zelluläre Spieler vermittelt. Zunächst verfügt der Organismus über physikalische und chemische Barrieren, wie Epithelien (z.B. Hornschicht der Haut mit Säureschutzmantel) und antimikrobielle Substanzen (Podolsky, 1999), welche an solchen epithelialen Oberflächen sezerniert werden, wie z.B. das Lysozym in der Tränenflüssigkeit.

Auf zellulärer Ebene spielen besonders phagozytierende Zellen, Makrophagen und neutrophile Granulozyten, eine große Rolle. Sie erkennen vordefinierte Muster, die für Pathogene spezifisch sind. Die Reaktionszeit ist dabei extrem schnell, da keinerlei Adaption stattfindet, wodurch schon viele Infektionen im Vorfeld verhindert werden können. Erkannt werden Pathogene an wenig konservierten Strukturen (*pathogen-associated molecular pattern, PAMP*) für die sie entsprechende Rezeptoren (*pathogen-recognition receptor,PRRs*) besitzen. Zu diesen größtenteils von mikrobiellen Pathogenen produzierten Strukturen zählen Lipopolysaccharid (LPS), Peptidoglykane, Lipoteichonsäure, Mannane, bakterielle DNA, doppelsträngige RNA sowie Glykane (Medzhitov and Janeway, 2000a). Die Rezeptoren besitzen meist Leucin-reiche Domänen, Calcium-abhängige Lectin Domänen und *Scavanger*-Rezeptoren Protein Domänen (Fearon and Locksley, 1996; Shi et al., 2001).

Die so genannte Toll-Rezeptor Familie, erstmals in der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* entdeckt, erkennen *PAMP* Motive, was zur Folge hat, dass der Transkriptionsfaktor NF-κB (nuclear factor- κB), für den es wiederum viele immunologisch wichtige Promotorbindungsstellen gibt, aktiviert wird. In der Maus ist TLR 4 zusammen mit einem LPS-Bindungsprotein (*Lipopolysaccharid binding protein; LBP*) im Serum, sowie den löslichen und membrangebundenen CD14 und MD-2 auf Makrophagen und B-Zellen essentiell an der Erkennung von LPS beteiligt (Dziarski et al., 2000; Lien et al., 2000; Means et al., 1999; Takeuchi et al., 1999; Viriyakosol et al., 2000). Dieser Rezeptorfamilie wird zunehmend eine Bedeutung für

die Erkennung von körpereigenen sowie fremder extrazellulärer Hitzeschockproteinen zugesprochen.
Zu den molekularen Spielern zählen die von aktivierten Makrophagen sezernierten Cytokine und Chemokine sowie die im Blut vorkommenden Komplementproteine.
Hierbei handelt es sich um ein System von Plasmaproteinen, die an der Oberfläche von Mikroorganismen eine Kaskade proteolytischer Reaktionen auslösen.

II. Adaptive Immunität:

Der Name “adaptive“ Immunantwort verdeutlicht, dass es sich hier um eine zweite Verteidigungslinie handelt, die speziell auf einen Erreger abgestimmt wird und seine charakteristische Antigene im “Gedächtnis“ behält.
Es wird zwischen einer humoralen und einer zellvermittelten Immunantwort unterschieden. Die humorale Immunantwort wird durch B-Lymphozyten getragen, die nach Aktivierung zu Plasmazellen differenzieren. Nach der Infektion sezernieren diese nach fünf bis sieben Tage Antikörper, die gegen Pathogene im extrazellulären Raum gerichtet sind. T- Lymphozyten vermitteln die zelluläre Immunantwort, indem sie sich gegen intrazelluläre Krankheitserreger sowie gegen infizierte und onkogen-transformierte Zellen richten.
T-Zellen lassen sich anhand ihrer Oberflächenrezeptoren in zwei Klassen einteilen: $CD8^+$- und $CD4^+$ positive T-Lymphozyten. $CD8^+$ positive T-Zellen werden auch als cytotoxische T-Lymphozyten (CTL) bezeichnet, welche in der Lage sind, infizierte und onkogen-transformierte Zellen abzutöten. $CD4^+$ positive T-Zellen können zu zwei Arten von Effektor T-Zellen differenzieren: Inflammatorische T-Zellen (T_H 1-Zellen), die infizierte Makrophagen dazu aktivieren, ihre intrazellulären Erreger zu töten, und T-Helfer Zellen (T_H 2-Zellen), die durch Ausschüttung bestimmter Cytokine B-Lymphozyten veranlassen, Antikörper zu produzieren und freizulassen.
Eine adaptive Immunantwort erfolgt antigen-spezifisch nach einer vorausgegangenen Antigenpräsentation durch antigenpräsentierende Zellen (APCs, z.B. dendritische Zellen (DC), Makrophagen und B-Lymphozyten). Es muß gewährleistet werden, dass eindringende Pathogene erkannt und bekämpft werden, körpereigenes Gewebe jedoch nur dann, wenn es entartet ist. Hierbei postuliert die klassische Immunologie, das Immunsystem erkenne “fremd“ und ignoriere “eigen“ (Janeway,

2002; Medzhitov and Janeway, 2000b). Entsprechend einer neueren Hypothese unterscheidet das Immunsystem zwischen “gefährlich“ und “harmlos“, wobei die Gefahr vom Gewebe signalisiert wird (Matzinger, 2002).

2.2 Antigenpräsentation

2.2.1 MHC Moleküle

Major histocompatibility complex (MHC)-Moleküle sind spezifische Rezeptoren für Peptidfragmente aus dem intrazellulären Proteinabbau und dem Abbau phagozytierten Materials (Rammensee et al., 1993).

Aufgrund der Struktur und der Peptidbindungseigenschaften wird zwischen MHC-I und MHC–II Molekülen unterschieden. MHC-I Molekülen kommen ubiquitär auf allen kernhaltigen Zellen vor und werden von $CD8^+$, zytotoxischen T-Zellen erkannt. MHC-II Moleküle werden lediglich auf antigenpräsentierenden Zellen, aktivierten T-Zellen und Epithelzellen des Thymus exprimiert und von $CD4^+$, T-Helferzellen erkannt. In Anwesenheit von Interferon-γ können auch andere Zellen MHC-II exprimieren (Klein and Sato, 2000a; Klein and Sato, 2000b).

MHC-I Moleküle bestehen aus einer membranständigen α-Kette sowie einer nichtkovalent assoziierten β-Kette, deren Gen (β_2 – Mikroglobulin-Gen) auf Chromosom 15 liegt. Die α-Kette besteht aus fünf Domänen: zwei peptidbindenden Domänen (α_1,α_2), einer immunglobulinähnlichen Domäne (α_3), einer Transmembranregion und einem zytoplasmatischen Schwanz. Die Peptidbindetasche wird durch einen Boden in β- Faltblattstruktur und zwei α-helikalen Wänden gebildet. An beiden Enden der länglichen Tasche konvergieren die α-Helices und verschließen die Tasche mit großen Aminosäuren wie Tyrosin und Tryptophan (Fruci et al., 1993; Madden et al., 1991; Madden et al., 1992). Die MHC-I Liganden werden fest in diese Tasche gebunden und haben eine Länge von 8-10 Aminosäuren (Rammensee et al., 1993).

Die MHC-II Moleküle bestehen aus einer α- und einer β-Kette. Beide Ketten sind in der Membran verankert und bilden zusammen die Peptidbindungstasche. Die Tasche wird von den α_1- und β_1-Domänen gebildet und besitzt eine ähnliche Struktur wie die der Klasse-I Tasche. Jedoch sind die Enden der Tasche offen, so dass MHC-II Peptidliganden sowohl C- wie auch N-terminal über die Taschen hinausragen können. In der Regel besitzen sie eine Länge von 12 bis 25 Aminosäuren, wobei nur 9 Aminosäuren direkt an der Bindung beteiligt sind.

2.2.2 Antigenerkennung durch T-Zellen

Durch die Diversität der an MHC-Peptid- Komplexen präsentierten Antigene wird eine Vielzahl von Rezeptoren auf T-Zellen erforderlich. Der T-Zellrezeptor (TCR) ist ein heterodimeres, membranständiges Molekül bestehend aus einer α- und einer β-Kette. Ähnlich wie bei Immunglobulinen, besitzen die α- und β-Ketten eine N-terminale variable Region, eine konstante Region, einen beweglichen Hinge-Bereich, eine Transmembranregion sowie einer zytoplasmatischen Domäne.
Die Vielzahl an TCRs wird, wie bei den von B-Zellen hergestellten Antikörper durch Kombination mehrerer Gensegmente, der Insertion und Deletion von Verbindungsbereichen (*junctions*) sowie die zufällige Kombination der fertigen Ketten erreicht, wodurch sich eine geschätzte Diversität von $10^{16.}$ ergibt (Germain and Stefanova, 1999; Marrack et al., 1983; Rupp et al., 1987).
Die Selektion im menschlichen Thymus führt zu einer Reduktion von naiven T-Zellklonen auf ca. 25-100 Millionen unterschiedlichster Spezifität (Garboczi et al., 1996). Die Antigenbindestelle des TCR wird aus drei Bereichen (*complemantarity determining regions*, CDR) der beiden Ketten gebildet, von denen die äußeren CDR1 und CDR2 das MHC-Molekül binden und somit wenige Variationen aufweisen. Die CDR3 Region, die Peptid erkennende Region, weist die höchste Variabilität auf (Garcia et al., 1998).
Der Kontakt vom MHC-Peptid Komplex mit dem TCR führt zu einem eher schwachen Signal, so dass eine hohe Antigenkonzentration zur T-Zellaktivierung notwendig ist. Dieses Signal wird durch die Korezeptoren CD4 auf T-Helferzellen und CD8 auf zytotoxischen T-Zellen um das 100fache verstärkt. Ein weiteres wichtiges

kostimulatorisches Signal für die $CD4^+$ T-Zellaktivierung wird durch CD40 auf APC und B-Zellen und CD40-Liganden (CD154) auf T-Helferzellen vermittelt. Die Aktivierung von DCs für das “priming“ von cytotoxischen T-Zellen sowie die Antikörperproduktion durch B-Zellen sind abhängig von diesem Signal. Darüber hinaus werden reife T-Zellen nur dann aktiviert, wenn zusätzlich zum MHC-Peptid-Komplex kostimulatorische Moleküle wie CD80 und CD86 exprimiert werden. Normale Körperzellen sind dazu nicht in der Lage, und auch APC expremieren diese nur nach Kontakt mit pathogenen Strukturen.

2.3 Antigenprozessierung

Die auf MHC-I und MHC–II Molekülen präsentierten intrazellulären oder extrazellulären Proteinantigene müssen für eine erfolgreiche Beladung dieser Moleküle prozessiert werden. Auf MHC-I Molekülen werden Proteinantigene präsentiert, die aus dem Proteinmetabolismus einer Zelle stammen. Diese können auch viralen oder entarteten Ursprungs sein. Extrazelluläres von APC aufgenommenes Antigen wird klassischerweise auf MHC-II Molekülen präsentiert.

2.3.1 Klassischer MHC-I Weg

Im Endoplasmatischen Retikulum (ER) einer Zelle befinden sich zunächst nicht Peptid-beladene MHC-I Moleküle. Diese sind ohne Peptid instabil, so dass sie mit molekularen Chaperonen wie Calnexin, Calreticulin, ERp57 sowie dem Protein Tapasin interagieren (Berwin and Nicchitta, 2001; Farmery et al., 2000; Turnquist et al., 2004; Williams et al., 2002; Williams and Watts, 1995). Damit wird verhindert, dass leere MHC-Moleküle an die Zelloberfläche gelangen und dort extrazelluläre Peptidantigene binden (Rock and Goldberg, 1999).
Die Peptidgenerierung aus zellulären Proteinen erfolgt hauptsächlich durch einen Multienzymkomplex, das Proteasom, im Zytosol der Zelle. Von dort aus gelangen sie über einen dimeren Transporter-Komplex TAP-1/-2 (*transporter associated with antigen processing*) in das ER. Als Quelle dienen zum einen gealterte Proteine, zum

anderen auch neue, jedoch fehlerhaft synthetisierte Proteine (ca. 30%), welche als DRiPs (*defective ribosomal products*) zum Proteasom und damit als Peptid auf MHC-I Molekülen gelangen.
Zur proteasomalen Degradation werden viele Proteinen enzymatisch mit Ubiquitin-Molekülen markiert. Diese Markierung scheint jedoch nicht essentiell für den Abbau eines Proteins zu sein, ist jedoch notwendig für eine regulierte Proteolyse und Generierung von MHC-I Liganden in vivo (Glickman, 2000; Ichihara and Tanaka, 1995; Michalek et al., 1993; Peters, 1994; Rock and Goldberg, 1999). Daneben sind jedoch Modellsysteme beschrieben, in denen trotz Inhibierung der Ubiquitinierung MHC-I Liganden präsentiert werden (Glas et al., 1998). Es ist daher vorstellbar, dass die Ubiquitinierung zumindest für manche Proteine den Abbau durch das Proteasom lediglich beschleunigt.

2.3.2 Klassischer MHC-II Weg

MHC-II Moleküle werden im Endoplasmatischen Retikulum aus drei neu synthetisierten αβ-MHC-II Dimeren zunächst mit drei invarianten Ketten (*invariant chains*, Ii) zu Nonameren zusammen formiert. Die Peptibindungstasche wird durch eine zur invarianten Kette gehörenden CLIP (*class II associated invariant chain peptide*) Region geschützt (Cresswell, 1996; Stumptner-Cuvelette and Benaroch, 2002). Bis auf die CLIP Region wird die invariante Kette in den endosomalen-lysosomalen Kompartimenten des Prozessierungswegs enzymatisch abgebaut. Das MHC codierte Molekül HLA-DM (Mensch) oder H-2M (Maus) löst CLIP aus der Bindungstasche und unterstützt zusammen mit dem nicht-klassischen MHC-Molekül HLA-DO dessen Austausch gegen das antigene Peptid.
Extrazelluläres Antigen wird von professionell antigenpräsentierenden Zellen (*antigen presenting cells*, APC) mittels Phagocytose, Rezeptor-vermittelter Endozytose oder Makropinozytose (die Aufnahme extrazellulärer Flüssigkeit) aufgenommen. Das Antigen gelangt dadurch über frühe und späte Endosomen in Lysosomen, saure Kompartimente mit zunehmend abfallendem pH-Wert, in denen es enzymatisch katabolisiert wird. Hierbei sind die Aspartatproreasen Cathepsin D und E sowie die Cysteinproteasen Cathepsin B,L,S und H (van der Drift et al., 1990;

Watts, 1997; Watts, 2004) beteiligt. Die Peptide treffen in einem noch nicht genau lokalisierten MHC-II Beladungskompartiment**,** welches nicht endosomalen bzw. lysosomalen Ursprungs ist (Amigorena et al., 1994)**,** auf neusynthetisierte MHC-II Moleküle. Diese werden, in Vesikeln vom Golgi-Apparat kommend, in die MHC-II Beladungskompartimente aufgenommen. Daneben werden auch MHC-II Moleküle von der Zelloberfläche durch Endozytose rezyklisiert und auf diesem Weg der Antigenprozessierung eingeschleust. Beladene MHC-II Komplexe gelangen über Vesikel an die Zelloberfläche, wo sie, abhängig von der Beschaffenheit des Peptids, mehrere Tage lang stabil sind (Nelson et al., 1994).

2.3.3 Cross presentation und Cross priming

Der Begriff der Kreuzpräsentation (*cross presentation*) bezieht sich auf die unkonventionelle Aktivierung zytotoxischer T-Zellen durch zelluläre, exogene Antigene, welche von APC aufgenommen, prozessiert und auf MHC-I Molekülen präsentiert werden (Arnold-Schild et al., 1999; Heath and Carbone, 1999; Rock and Shen, 2005). Hierbei liegt die Bedeutung nicht allein im Übertritt exogenen Antigens in den MHC-I Prozessierungsweg, sondern in der Existenz eines eigenen Prozessierungswegs für zelluläre Antigene wie apoptotische Zellen, Exosome oder Antigenträgerproteine in spezialisierten APC. Somit aktivieren die APCs zytotoxische T-Zellen über Antigene, welche aus einer anderen Zelle stammen. Die T-Zellaktivierung kann sowohl Effektor-Funktion (*cross priming*) als auch Toleranz, d.h. die Deletion autoreaktiver T-Zellen (*cross tolerance*) auslösen (Kurts et al., 1997). Aus dem Knochenmark stammende professionell antigenpräsentierende Zellen sind die Protagonisten des *cross primings*. Diese exprimieren bestimmte Rezeptoren, welche ihnen die Phagozytose apoptotischer Zellen, antigentragender Hitzeschockproteine und anderen zellulären Materials erlauben. Die genaue Identität der kreuzpräsentierenden APC ist noch unklar, jedoch sind dendritische Zellen und Makrophagen die potentesten Kanditaten, wobei nach wie vor die meisten Untersuchungen an frisch isolierten dendritischen Zellen von Mensch und Maus gemacht werden. Von dendritischen Zellen weiß man, dass sie eine hohe Potenz besitzen, exogenes Antigen aufzunehmen. Hierbei kann die Internalisierung über

verschiedene Prozesse ablaufen, wobei diese von der Beschaffenheit des Antigens abhängen (Brode and Macary, 2004): so wird lösliches Antigen über Pinozytose zusammen mit extrazellulärer Flüssigkeit in neugebildeten Endosomen aufgenommen. Kleine partikuläre Antigene induzieren diesen Prozess durch die Bindung an spezifische Oberflächenrezeptoren (Mellman, 1996). Große Partikel von apoptotischen oder nekrotischen Zellen können über den Weg der Phagozytose aufgenommen werden.
Somit können dendritische Zellen sowohl Immunkomplexe (den Haan and Bevan, 2002), als auch lösliche Proteine (Pooley et al., 2001), und zelluläre Antigene (Ramirez and Sigal, 2002) aufnehmen.

Die Herkunft des Antigens zur Kreuzpräsentation

Lösliches extrazelluläres Peptidantigen führt zu keiner effizienten CTL- Antwort. Dagegen findet nach Injektion von partikulärem Protein (gezeigt am Ovalbumin, OVA) eine robuste CTL- Antwort statt. Dies zeigt, dass in vivo extrazelluläres Protein als Grundlage für die Kreuzpräsentation von Antigen auf MHC-I Molekülen dienen kann. Hierbei werden unterschiedliche Quellen des für das *cross priming* verantwortlichen Proteins in Betracht gezogen. Es werden sowohl zelluläre, intakte cytosolische Proteine (Rock and Shen, 2005; Shen and Rock, 2004), als auch Antigene komplexiert an Hitzeschockproteine (Binder and Srivastava, 2005; Srivastava et al., 1994) als Quelle für die Antigenpräsentation auf MHC-I Molekülen beschrieben.

2.4 Endozytose

Als Endozytose bezeichnet man die Aufnahme von Stoffen in das Innere einer Zelle, sofern diese nicht durch die Zellmembran hindurch, sondern über die Bildung von Vesikeln (Endozytosevesikeln) erfolgt. Dabei wird das eintretende Material von der zum Zellinneren hin einstülpenden Zellmembran umschlossen und ins Cytoplasma transportiert.

2.4.1 Übersicht der verschiedenen Endozytosemechanismen

Die bis heute am besten untersuchte und verstandene Form der Endozytose ist die Clathrin-vermittelte Endozytose, welche durch ihren ersten Schritt, der Internalisierung von extrazellulärem Material an spezialisierten Bereichen der Zellmembran, den sogenannten *Clathrin-coated pits*, charakterisiert ist. Eine weitere Art der Endozytose ist die Caveolae-vermittelte Endozytose (Pelkmans et al., 2004), ein Prozess bei dem das Protein Caveolin eine bedeutende Rolle spielt. Darüber hinaus gibt es noch so genannte *Clathrin-independent pathways*, welche Material weder über *Clathrin-coated pits* noch über Caveolae aufnehmen (*non-Clathrin non-Caveolae* vermittelte Endozytose). Des Weiteren gibt es spezialisierte Immunzellen, die in der Lage sind, große Mengen an extrazellulärer Flüssigkeit via Makropinozytose oder große Partikel über Phagozytose aufzunehmen (Gagescu et al., 2000; Mellman, 1996; Mukherjee et al., 1997).

2.4.2 Clathrin-vermittelte Endozytose

Roth und Porter identifizierten 1964 *Clathrin-coated pits* als spezialisierte Regionen der Zellmembran, welche für die selektive Aufnahme von extrazellulärem Material verantwortlich sind (Roth and Porter, 1964). Bei diesen *Clathrin-coated pits* handelt es sich um Membranabschnitte, welche leicht nach innen eingebuchtet sind und auf der Zytoplasmaseite von einem Clathrin-Mantel überzogen sind (Mousavi et al., 2004).

Die Clathrin-vermittelte Endozytose ist sowohl für die Rezeptor vermittelte Aufnahme wichtiger Transportproteine wie LDL und Transferrin verantwortlich, als auch für die Aufnahme von Wachstumsfaktoren und Peptid-Hormonen (Goldstein and Brown, 1985; Norkin et al., 2002; Pelkmans and Helenius, 2002; Wang et al., 1993). Die Makromoleküle müssen zunächst an einen spezifischen Rezeptor auf der Zelloberfläche binden. Durch "*Self-assembly*" wird der Rezeptor-Makromolekül-Komplex in der Zellmembran zusammen gedrängt. Das cytosolische Protein Clathrin (180 000 Da) gewährleistet diesen "*Self-assembly*" Prozess, an welchem es auf der zytosolischen Seite beteiligt ist (Brodsky et al.,

2001). Das *coated pit* (ø 300nm) senkt sich ein, bis sich ein Vesikel abschnürt, welches als *coated vesicle* bezeichnet wird. Mit Hilfe einer *uncoating* ATPase löst sich der Clathrin-Mantel sofort wieder ab und die Clathrin Monomere werden wieder zur Membran zurückgeführt und erneut eingebaut. Abb. 1 verdeutlicht diesen Prozess.

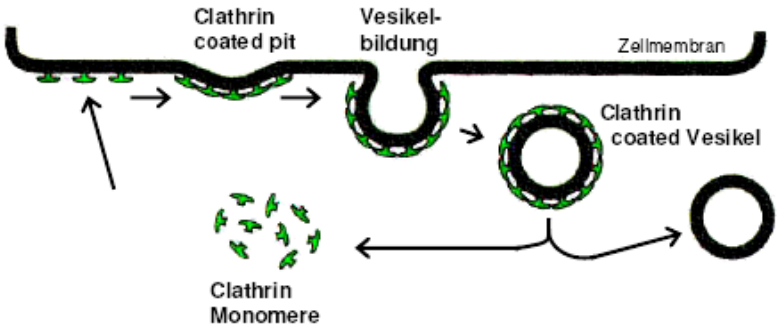

Abb.1: Clathrin abhängige Endozytose. Bildung von *Clathrin-coated pits* und Abschnürung der Zellmembran als *Clathrin coated vesicle.* Dieses stößt aktiv seinen Clathrin-Mantel ab. Es verbleibt ein nackter Vesikel mit Rezeptor-Ligand Komplex. Graphik adaptiert (Alberts et al., 2002)

Frühe Endosomen

Nach dem Entfernen der Clathrinhülle maturiert das Vesikel unter Bindung an Mikrotubuli sowie unter Vermittlung des frühen endosomalen Antigens 1 (*early endosomal antigen* 1, EEA1) und Rab 5 zum frühen Endosom (Zerial and McBride, 2001). Das frühe Endosomen stellt eine Sortierungsstation dar, die dafür sorgt, dass nicht alle internalisierten Substanzen lysosomal abgebaut werden. Hierbei werden verschiedene Wege unterschieden:

1. die Substanz wird rezyklisiert und gelangt über intermediäre Recycling-Endosomen wieder zur Zellmembran zurück (zum Beispiel der LDL-Rezeptor oder Transferrin Rezeptor) oder sie wird durch die Zellen hindurch an einen anderen Ort der Zellmembran transportiert (Transzytose).
2. Abbau in Lysosomen. Ein Beispiel hierfür ist der *epidermal growth factor* (EGF).

Späte Endosomen und Lysosomen

Am Ende des Abbau Weges stehen die späten Endosomen, die nach der Fusion von Hydrolase-haltigen Transportvesikeln aus dem trans Golgi-Netzwerk sowie einem vATPase gesteuerten Ansäuerungsvorgang zu Lysosomen werden. Die Ansäuerung

führt meist zur Dissoziation von Rezeptor und Ligand und ist für die Aktivität verschiedener lysosomaler Hydrolasen, essentiell (Mellman, 1996).
Im Gegensatz zu den späten Endosomen enthalten Lysosomen Hydrolaseenzyme für die kontrollierte intrazelluläre Verdauung. Lysosomen enthalten ca. 40 Arten von Hydrolasen darunter Proteasen, Nukleasen und Lipasen (Alberts et al., 2002).

2.4.3 Detergens-Resistente Membranen (DRM) und Caveolae-vermittelte Endozytose

Das ursprüngliche Modell der Plasmamembran, bei dem davon ausgegangen wurde, dass die membranaufbauenden Lipide und Proteine innerhalb der Membran homogen verteilt sind, wurde in den letzten Jahren modifiziert. Es konnte gezeigt werden, dass sich innerhalb der Membran vorübergehend Bereiche ausbilden können, in denen aufgrund eines höheren Anteils an Glykoshingolipiden, Cholesterol und GPI (Glykosylphosphoinositol, z.B GM_1) verankerter Proteine eine verringerte Fluidität vorherrscht (Jacobson and Dietrich, 1999; Simons and Ikonen, 1997). Die Existenz solcher Membranbereiche wurde erstmals 1988 beschrieben, wobei die heute unter dem Namen “Caveolae“ bekannten Mikrodomänen schon zu einem früheren Zeitpunkt beobachtet wurden (Palade, 1953). Caveolae sind ca 50-80 nm breite Invaginationen der Plasmamembran, welche eine Sonderform von DRM, so genannte “intrazelluläre Caveolae“ darstellen (Yamada, 1955). Hierbei ist das in der Membran verankerte Protein Caveolin der Hauptbestandteil der Mikrodomänen. Obwohl diese spezialisierte Domäne mittlerweile als DRM-Domäne anerkannt ist (Jacobson and Dietrich, 1999), herrschen Irritationen, was die Klassifikation dieser Mikrodomänen anbelangt. Es scheint drei Arten zu geben: (a) Caveolae (b) Glykosphingolipid reiche Membranen (*glycosphingolipid enriched embranes*, GEM) und (c) phosphoinositol reiche DRM-Domänen. DRM-Domänen werden mit einer Vielzahl von Funktionen in Verbindung gebracht, unter anderem mit dem Transport von Cholesterol, der Endozytose und den Signaltransduktionskaskaden. Darüber

hinaus dienen DRM als Plattform für die Verankerung des Zytoskeletts (Funatsu et al., 2000).
Der Prozess der Phagozytose ist ein komplexer Vorgang, der verschiedene Komponenten der Plasmamembran mit einbezieht, einschließlich den PRRs, Elementen des Zytoskeletts und DRM. Wang et al. (2006) zeigte eine durch Hsp70 induzierte Phagozytose von partikulärem Antigen mit einer verstärkten MHC-II Präsentation (Wang et al., 2006a). Neueste Daten zeigen, dass Hsp70 innerhalb von Minuten an Lipid rafts bindet und die Signaltransduktionskaskaden p38 MAPK und PI3K hochreguliert (Wang et al., 2006b).

2.4.4 Phagozytose

Unter Phagozytose versteht man die Aufnahme von extrazellulären partikulären Substanzen. Im klassischen Sinne wird nach Metchnikoff (Karnovsky, 1981) unter Phagozytose das Umschlingen (Pseudopodien) von partikulären Substanzen mit der Plasmamembran, wobei diese gleichzeitig die Membran des neu gebildeten Phagosoms bildet, verstanden. Schon in der Evolution haben sich Organismen, angefangen bei den Invertebraten, diesen Mechanismus zu Nutze gemacht, um Pathogene abzutöten. Dieser einfache Abwehrmechanismus geht darauf zurück,
dass Phagosomen auf den Abbau von komplexen Molekülen spezialisiert sind, um diese dann zu recyceln oder metabolisch zu verwerten.
Der genaue Mechanismus der Phagozytose, d.h die Aufnahme toter, vor allem apoptotischer Zellen ist Gegenstand aktueller Forschung. Eine Vielzahl von möglichen Signalen auf apoptotischen Zellen und Rezeptoren auf Phagozyten sind bereits identifiziert worden.

<u>Phagozytose in der Kreuzpräsentation</u>
Zahlreiche Studien deuten darauf hin, dass der Prozess der Phagozytose, neben der klassischen MHC-II Beladung mit extrazellulären partikulären Antigenen, auch im Zusammenhang mit der “Kreuzpräsentation“ steht.

Proteomics-Studien zeigen, dass isolierte Phagosomen zahlreiche retikuläre Proteine aufweisen, die bekanntlich eine Rolle in der MHC-I vermittelten Antigenpräsentation spielen (Garin et al., 2001). Neuere Erkenntnisse deuten darauf hin, dass die Fusion von Phagosomen samt aufgenommenes Antigenmaterial mit Vesikeln aus dem Endoplasmatischen Retikulum (ER) den Beginn dieses alternativen Präsentationsweges darstellt (Guermonprez et al., 2003; Houde et al., 2003; Jutras and Desjardins, 2005). Dieses neugebildete Kompartiment enthält sowohl MHC-I Moleküle als auch sämtliche Komponenten, die zur Beladung dieser Oberflächenmoleküle notwendig sind: Transporter, die mit Antigenpräsentation assoziert sind (TAP), Tapasin, Calreticulin und Erp57 (Cresswell et al., 1999). Von dort aus werden die phagozytierten Antigene auf bisher nicht genau bekannte Weise in Zytosol re-transloziert. (Desjardins, 2003; Desjardins et al., 2005). Es wird vermutet, dass Sec61 für die Translokation des Antigens vom ER ins Zytosol verantwortlich ist (Houde et al., 2003). Derlin1, ein neu entdecktes ER-Membranprotein, scheint an der Re-translokation vom ER ins Zytosol beteiligt zu sein (Lilley and Ploegh, 2004; Ye et al., 2004). Abb.2 spiegelt diesen alternativen Weg der Kreuzpräsentation von extrazellulärem Antigen auf MHC-1 Molekülen wider.

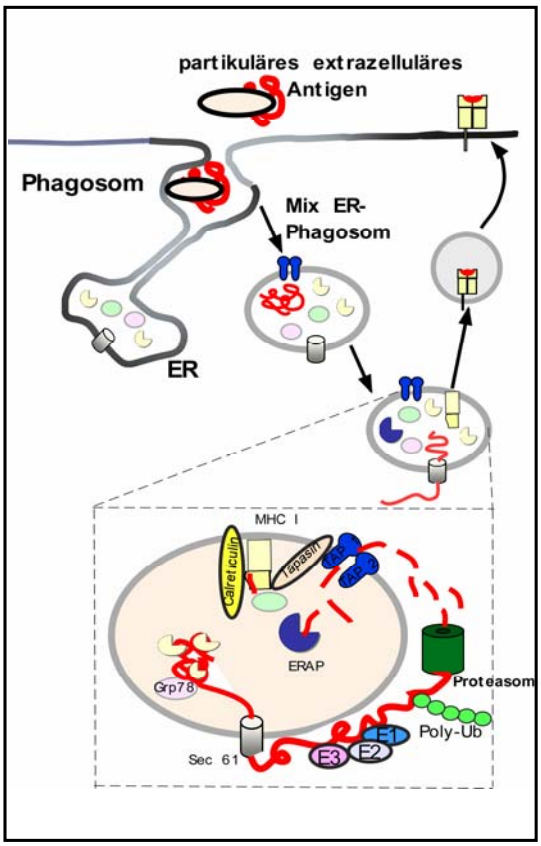

Abb.2: Antigen Prozessierung und Beladung auf MHC-1 Molekülen im ER-Phagosom. Extrazelluläres partikuläres Antigen wird mittels ER vermittelter Phagozytose in ein Mischkompartiment aufgenommen, welches die Maschinerie für eine MHC-I Beladung enthält. Die Kreuzpräsentation von Antigen setzt eine Re-Translokation des Antigens vom Phagosom zurück ins Zytosol voraus, entweder über das Sec 61 Translokon oder Derlin-1. Die retranslokierten Peptide werden im Zytosol polyubiquitiniert, und via TAP zurück ins Phagosom transportiert, wo die Beladung von MHC-I Molekülen stattfindet. Graphik adaptiert. (Jutras and Desjardins, 2005).

Eine eindeutige Klärung der Frage nach dem Mischkompartiment und deren Bedeutung für die Kreuzpräsentation ist bislang nicht erfolgt.

2.4.5 Makropinozytose

Die Makropinozytose beschreibt die Aufnahme von größeren Mengen an extrazellulärer Flüssigkeit mit darin gelösten Nährstoffen und Makromolekülen (Cardelli, 2001; Hacker et al., 1997; Zenni et al., 2000).

Makropinozytose in Zellen des Immunsystems

Die ersten Beobachtungen der Makropinozytose machte Sallusto et al. (1995) in dendritischen Zellen, welche stündlich über 40% ihres eigenen Zellvolumens an extrazellulärer Flüssigkeit aufnehmen konnten. Stimulationsfaktoren wie TNF-α, Lipopolysaccharid oder IL-1, welche zur Maturierung von DC führen können, führten zu einer verminderten Aufnahme durch Makropinozytose. Dies zeigte, dass mit dem Einsetzten der Maturierung von DCs die Aufnahme von Flüssigkeit durch Makropinozytose irreversibel blockiert wird. Interessanterweise blieb die Rezeptor vermittelte Endozytose hierbei unbeeinflusst. Im Zusammenhang mit der Antigenpräsentation kann für das über Makropinozytos aufgenommene Antigen die konventionelle Präsentation auf MHC-Klasse II Molekülen beobachtet werden. Auch eine Beladung auf MHC-Klasse I Molekülen ist möglich (Norbury et al., 1995).
Durch die Beobachtungen eines makropinozytotischen Weges in der Immunantwort nahmen auch die Forschungen hinsichtlich der Aufnahme von Antigen über diesen Mechanismus zu. Doch viele Studien scheiterten, da sie nur schwer zwischen der Aufnahme von Antigenen via Makropinozytose, Mikropinozytose sowie der Rezeptor vermittelten Endozytose unterscheiden konnten. Daher war für die Makropinozytose die Visualisierung des Makropinosoms ansich eine wichtige Entdeckung (Norbury, 2006). Makropinosomen sind in ihrer Größe sehr heterogen, sind aber im Gegensatz zu *clathrin-coated* Vesikel (ø100nm) um einiges größer (bis zu 5µm).

Für die Phagozytose wurde die Notwendigkeit des ER für maturierende Phagosomen gezeigt. Im Zusammenhang mit der Makropinozytose ist die Rolle des ER noch nicht eindeutig geklärt.

2.5 Molekulare Chaperone und Hitzeschockproteine

2.5.1 Proteinfaltung und Protein-Qualitätskontrolle

Molekulare Chaperone unterstützen die Faltung von Proteinen. Allgemein werden molekulare Chaperone als Proteine definiert, die vorübergehend an andere Proteine binden und dabei eine instabile Konformation dieser Polypeptidkette stabilisieren. Durch wiederholtes Binden und anschließendes Freisetzten (Bukau and Horwich, 1998) werden neusynthetisierte Proteine solange stabilisiert bis sie entweder ihre native Struktur erreicht haben, oder entsprechend andere Chaperone gefunden haben (Abb.3).

Unvollständig oder nur partiell gefaltete Proteine weisen hydrophobe Regionen auf der Oberfläche auf, die im nativen Zustand im Innern des Proteins eingeschlossen sind. Diese Bereiche neigen einerseits zu Interaktionen mit anderen zellulären Molekülen und andererseits zur Bildung von Proteinaggregaten, wodurch die Zellfunktionen erheblich gestört werden können. In diesem Kontext spielen molekulare Chaperone eine wesentliche Rolle, da sie spezifisch mit aggregationsanfälligen Proteinen interagieren und somit in direkter Konkurrenz mit den Aggregationsreaktionen treten können. (Ellis et al., 1989; Frydman, 2001; Hartl, 1996).

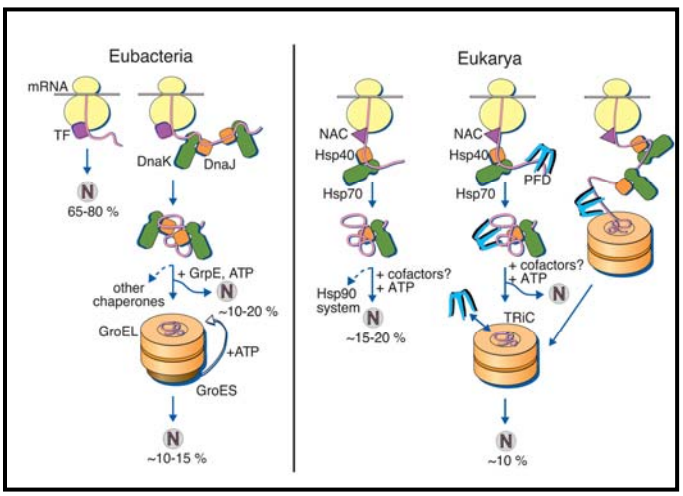

Abb.3: Modell der *de novo* Faltung von Proteinen:
In Bakterien und Eukaryonten bilden cytosolische Chaporene die Faltungsmaschinerie für neusynthetisierte Proteine. Hierbei werden diese nur solange von verschiedenen Chaperonen stabilisiert und in der Faltung unterstüzt, bis sie ihre native Struktur erreichen.
N: native Proteinstruktur; **TF**: Trigger Faktor; **NAC**: nascent chain-assozierter Komplex; **PFD**: Prefoldin (Hartl and Hayer-Hartl, 2002)

Molekulare Chaperone haben neben der unterstützenden Funktion der Proteinfaltung eine zusätzliche Qualitätskontrollfunktion, die sehr stark mit der als Faltungshelfer korreliert. Hier entwickelte die Evolution effiziente Protein-Qualitätskontrollsysteme, die die Akkumulation faltungsdefekter Proteine verhindern. Diese wurden im ER, in Mitochondrien, im Sekretorischen Weg, im Nukleus und im Cytosol identifiziert (Gardner et al., 2005; Hampton, 2002; Langer and Neupert, 1996; McDonough and Patterson, 2003; Trombetta and Parodi, 2003).

In eukaryontischen Zellen wird die Protein-Qualitätskontrolle durch die molekularen Chaperone und das Ubiquitin-Proteasom System (UPS) sichergestellt.

Abb. 4 stellt ein Modell dar, welches die Funktion der beiden Systeme in der zytosolischen Qualitätskontrolle beschreibt (Wickner et al., 1999).

Dieses Modell schlägt eine kinetische Aufteilung der entfalteten Polypeptidkette zwischen den molekularen Chaperonen und dem UPS vor, die beide in direkter Konkurrenz um die Substratbindung stehen.

Durch zyklische Assoziationen der entfalteten Proteine mit molekularen Chaperonen kann die Rückfaltung in den nativen Zustand ermöglicht werden. Misslingt diese Rückfaltung, so wird das entfaltete Protein freigelassen und durch das UPS zu Peptiden abgebaut. Hierbei wird eine aktive Beteilung der Chaperone am Abbau falsch gefalteter Proteine ausgeschlossen (Abb.4A).

Durch die Identifizierung und Charakterisierung des Chaperon assoziierten Cofaktors CHIP wurde dieses Modell in Frage gestellt. Es konnte gezeigt werden, dass CHIP mit den Chaperonen der Hsp70 und Hsp90 Familie interagiert und die vermittelte Proteinfaltung unterdrücken kann (Ballinger et al., 1999; Connell et al., 2001; McDonough and Patterson, 2003). Diese Beobachtung favorisiert ein neueres Modell, bei dem die Chaperone aktiv am Abbau der falsch gefalteten Proteine beteiligt sind. Die Aufgabe des Chaperons liegt hier zum einen in der spezifischen Erkennung entfalteter Proteine und deren Rückfaltung zur nativen Konformation, als auch im Abbau durch das UPS. Die Entscheidung über die Faltung oder den Abbau des Proteins wird über Chaperon-assozierte Cofaktoren bestimmt (Abb.4B) (Esser et al., 2004).

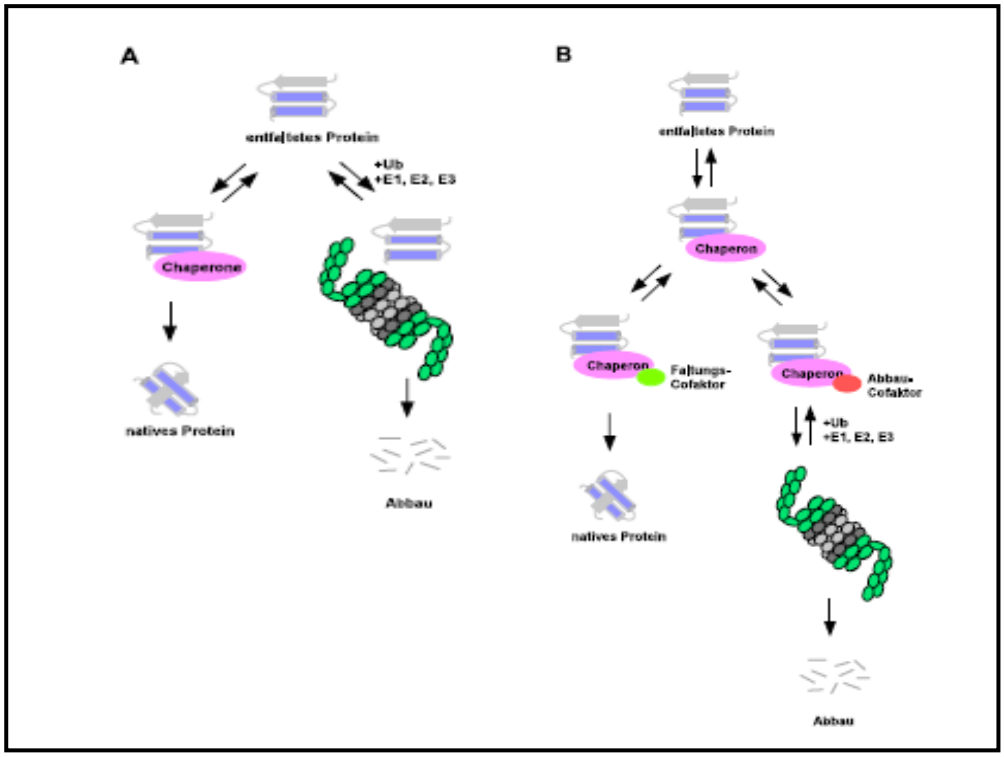

Abb.4: Modell der Protein-Qualitätskontrolle

(A) Die molekularen Chaperone und das Proteasom System konkurrieren um die Substratbindestelle. Durch die Assoziation des Substratproteins mit den molekularen Chaperonen kann die native Konformation erreicht werden, während die Interaktion des Substratpeptids mit dem UPS Komplex zu dessen Abbau führt.

(B) Die molekularen Chaperone sind aktiv an der Faltung und Abbau der Substratproteine beteiligt. Die Entscheidung für die Faltung oder Abbau wird durch einen Chaperon-assoziierten Cofaktor bestimmt. Die Assoziation des "Faltungs-Cofaktors" führt zur Induktion der Faltung, wohingegen der Abbau-Cofaktor zur Rekrutierung des UPS Komplexes führt und zum Abbau des entfalteten Proteins führt (Esser et al., 2004).

2.5.2 Molekulare Chaperone

Molekulare Chaperone sind im Zusammenhang mit ihrer Funktion als Stressproteine entdeckt worden, da sie zu einer Klasse gehören, die unter Stressbedingungen ihre Expression steigern (Lindquist, 1986; Morimoto, 1998). Dies führte zu dem Begriff Hitzeschock-Proteine (HSPs; engl. h*eat shock proteins*). In der letzten Dekade hat sich der Fokus auf die HSPs als molekulare Chaperone gerichtet, da sie einen großen Anteil am Schutz der zellulären Proteine vor Stresswirkungen haben.

Da Chaperone in aller Regel nicht Teil des Proteins sind, dessen Faltung sie unterstützen, haben viele Chaperone Mechanismen entwickelt, die es ermöglichen, sich von seinem Substratprotein wieder zu lösen. Hierbei handelt es sich um so genannte ATPasen, deren Aktivität durch unterschiedliche Cofaktoren reguliert werden kann. Die Bindung und Hydrolyse spielt bei der Ausübung dieser Funktion

eine wesentliche Rolle. Auf diese Weise werden strukturelle Veränderungen ausgelöst, die eine Freilassung des Substrates erlauben.
Untersuchungen hinsichtlich der Homologie zeigen, dass sich die meisten molekularen Chaperone in fünf Klassen gliedern lassen, welche nahezu ubiquitär vertreten sind. Gemeinsam ist diesen Proteinen, dass sie hydrophobe Oberflächen erkennen und unter zellulären Stressbedingungen, wie zum Beispiel Hitzestress, vermehrt synthetisiert werden (Ellis, 1987; Hendrick et al., 1993).

Die Hsp70 Familie:

Die Hsp70 Proteine bilden die umfangreichste und die am besten charakterisierte Hitzeschock-Protein Familie. Mit Ausnahme von einigen Archaeenarten wurde diese Proteinfamilie in allen Organismen nachgewiesen.
Hsp70 Proteine besitzen eine hoch konservierte, nukleotidbindende Domäne und eine wenig konservierte, proteinbindende Domäne, die sich in ihren Aktivitäten gegenseitig beeinflussen (Bukau and Horwich, 1998).
Die Kristallstruktur der substratbindenden Domäne zeigt, dass die Geometrie dieser Bindestelle vorwiegend für hydrophobe, lineare Peptidsequenzen geschaffen ist (Zhu et al., 1996). DnaK, das bakterielle Homolog zu Hsp70, erkennt als Substrat 7 Aminosäure lange Abschnitte, deren Mitte hydrophobe Reste, darunter vor allem Leucin und Isoleucin, enthält (Rudiger et al., 1997).

Für eine Vielzahl von zellulären Prozessen wurde nachgewiesen, dass die Anwesenheit von Hsp70 erforderlich ist. Hierzu gehört die Faltung von neusynthetisierten Proteinen, die Translokation durch Membranen sowie der Abbau von Proteinen (Goloubinoff et al., 1999; Kang et al., 1990; Langer and Neupert, 1991; Ungermann et al., 1994; Wagner et al., 1994).
Die Aktivität von Hsp70 wir dabei von verschiedenen Cochaperonen reguliert. Hierzu zählt Hsp40 (in Bakterien: DnaJ) welches Hsp70 an neusynthetisierte Polypeptidketten rekrutiert und diese stabilisiert, bis die Polypeptidkette an so genannte Chaperonine oder Hsp90 weitergegeben wird.
Abhängig von der Art des gebundenen Peptids liegt das Hsp70-Protein in zwei verschiedenen Konformationen vor. Im ADP-Zustand werden stabile, langlebige

Komplexe mit Peptiden gebildet, während im ATP-Zustand nur eine temporäre recht instabile Bindung auftritt (Bukau and Horwich, 1998; Zhu et al., 1996)
Die Proteine, die die Hydrolyse von ADP zu ATP katalysieren, werden als Nukleotidaustausch-Faktoren (*nucleotide exchange factor, NEF*) bezeichnet, zu denen auch das *E.coli* Protein GrpE sowie die Säugetierproteine Bag1 und HspBP1 gehören (Gassler et al., 2001; Hartl and Hayer-Hartl, 2002; Raynes and Guerriero, 1998).
Die ATP-Hydrolyse der Hsp70 Chaperone, und damit der Übergang zum ADP Zustand, wird durch das Cochaperon Hsp40 stimuliert.

2.5.3 Immunogene Eigenschaften von Chaperonen

Wenn aus Tumorgewebe isolierte Zellen in Mäuse appliziert werden, wird eine spezifische Immunität gegenüber Zellen dieses Tumors ausgelöst, nicht aber gegenüber andersartigen Tumoren (Berwin and Nicchitta, 2001). Folglich besitzen die Tumorzellen individuelle Marker, die jedem Tumor immunogene Eigenschaften im eigenen Organismus verleihen. Durch Fraktionierung immunisierender Tumorzellpräparate stießen Srivastava et al. auf die Hitzeschockproteine Hsp70, Hsp90 und Gp96 (Srivastava et al., 1998). Später wurde die Gruppe um Calreticulin, Hsp110 und Grp170 erweitert (Basu and Srivastava, 1999; Wang et al., 2001a). Die aus Tumoren isolierten Chaperone lösten eine spezifische CTL-vermittelte Immunantwort in den tumortragenden Mäusen, aus deren (autologen) Tumoren sie isoliert wurden, aus (Udono et al., 1994).
Eine derartige Immuntherapie bzw. Vakkzinierung bei unterschiedlichen Tumoren (chemisch oder physikalisch) führte zur Tumorimmunität, Rückgang von Metastasen, verlangsamtem Wachstum bestehender Tumoren sowie zur Verlängerung der Überlebenszeit (Tamura et al., 1997). Zusätzlich kommt der beobachteten immunisierenden Hsp-Wirkung eine weitere physiologische Bedeutung zu: Intrazelluläres GRP94, Hsp70 und Hsp90 werden von nekrotischen, nicht jedoch von apoptotischen Zellen freigesetzt (Basu et al., 2000).

Die beschriebenen Phänomene der Immunogenität extrazellulärer Hitzeschockproteine werden derzeit auf vier Merkmale zurückgeführt. Diese umfassen die Fähigkeit, als Chaperon Peptide zu binden, die rezeptorvermittelte Endozytose durch antigenpräsentierende Zellen, deren Stimulation zur Zytokinproduktion sowie die Reifung dendritischer Zellen durch die Hsp-Bindung (Basu and Srivastava, 2000; Singh-Jasuja et al., 2000).

Rezeptoren für Hitzeschockproteine (Hsps):

Mit der Entdeckung, dass Chaperone immunogene Eigenschaften besitzen, nimmt auch die Anzahl an Hsp-Rezeptoren zu. Bis jetzt wurden als Zelloberflächen-Rezeptoren die *Scavanger*-Rezeptoren (SR) LOX-1, CD94, der *Scavanger*-Rezeptor A (SR-A), der LDL- Rezeptor CD91, die *toll-like* Rezeptoren -2 und -4 sowie der TNF-Rezeptor CD40 beschrieben.

Die Mehrheit der beschrieben Hsp-Rezeptoren gehört zu der Familie der *Scavanger*-Rezeptoren, die sich durch die Fähigkeit auszeichnen, Lipoproteine zu binden. Dadurch kommt ihnen eine wichtige Rolle in der Entwicklung von Blut-Gefäßkrankheiten zu (Platt et al., 1999). Durch ihre Multifunktionalität besitzen sie ein großes Spektrum an Liganden, wobei aufgrund der Struktur und der spezifischen Bindungseigenschaften dieser Rezeptorfamilie eine Unterteilung in fünf Klassen vorgenommen werden kann (Platt et al., 1999).

LOX-1 gehört zu den S*cavanger*-Rezeptoren der Klasse E und ist vorwiegend auf der Zelloberfläche von dendritischen Zellen zu finden. Mit 45 kD ist LOX-1 ein Kalzium abhängiger Typ-II SR, und wird darüber hinaus auch zu den C-Typ Lektin-ähnlichen Rezeptoren gezählt, zu denen eine Reihe anderer Rezeptoren wie DC-SIGN, CD94 sowie DECTIN-1 zählen.

Für LOX-1 wurden essentielle immunologische Funktionen beschrieben, unter anderem die Vermittlerrolle zwischen Leukozyten und Endothelzellen. LOX-1 bindet und internalisiert oxidiertes LDL (ox-LDL), welches vor allem im Serum von Arteriosklerose-Patienten vermehrt vorkommt (Kume and Kita, 2001). Dieser Rezeptor wird transkriptionell über TNF-α, Angiotensin-II und ox-LDL (Kita et al., 2000) reguliert. Durch die Expression des Rezeptors werden intrazelluläre Prozesse

induziert, die zur Expression wichtiger Adhesionsmoleküle sowie zur Endothelzell-Aktivierung führen (Kita, 1999). Delneste et al. zeigten über Kompetitionsexperimente, dass humane und murine DCs humanes Hsp70 binden, nicht aber T-Lymphozyten. Interessanterweise wird CD94, ein zum C-Typ gehörender lektin-ähnliche Rezeptor, auf der Zelloberfläche natürlicher Killerzellen (NK) ebenfalls durch Hsp70 gebunden (Gross et al., 2003).

Der *Scavanger*-Rezeptor der Klasse A (SR-A) ist unterteilt in 3 Unterklassen, SR-A Typ-I und Typ–II und dem Rezeptor MARCO. SR-A Typ-I und Typ–II sind trimere membranständige Glykoproteine, welche transkriptionell unterschiedlich von einem Gen-Lokus entstehen. Typ-I und Typ–II bestehen aus Multi-Domänen und unterscheiden sich nur im Vorhandensein einer *Scavanger*-Rezeptor Cystein-reichen Domäne (SRCR) im Typ-I Molekül. Der restliche extrazelluläre Teil dieser Rezeptoren ist identisch und besteht aus einer Spacer- Region, einer α-*coiled-coil* Domäne, welche für die Trimerisierung wichtig ist, sowie aus einer Kollagen-ähnlichen Domäne, die Bindungsstelle für acetyliertes LDL (ac-LDL) (Kodama et al., 1990).
SR-A wird auf Makrophagen und dendritischen Zellen exprimiert. Spätere Arbeiten zeigen, dass ihnen eine wichtige Rolle in der angeborenen Immunität zukommt, einschließlich der Rezeptor vermittelten Phagozytose von Bakterien und die Internalisierung von Lipopolysaccharid (Hampton et al., 1991; Peiser and Gordon, 2001). Darüber hinaus kommt dem SR-A eine wichtige Funktion in der Signaltransduktion einer Zelle zu, die Signalaktivierung über G(i/o) Proteine (Whitman et al., 2000), sowie über die Tyrosin Kinase Lyn (Miki et al., 1996). Die Arbeit von Berwin et al. zeigt, dass SR-A auf murinen antigenpräsentierenden Zellen (primär Makrophagen) die Internalisierung von GRP94 und Calreticulin vermittelt.
CD91/LRP, ein multifunktionaler *Scavanger*-Rezeptor, wird ebenfalls als potentieller Hsp70 Rezeptor postuliert (Basu et al., 2001). Darüber hinaus wurde zusätzlich gezeigt, dass CD91, neben Hsp70, ein gemeinsamer Rezeptor für die Chaperone Hsp90, GRP94 und Calreticulin darstellt (Basu et al., 2001; Binder et al., 2000a; Binder et al., 2004).

CD91/LRP *(LDL-receptor-related protein*) wird als 600 kDa großes Protein synthetisiert, welches sich aus einer 515 kDa α-Untereinheit und einer 85 kD großen β- Untereinheit zusammensetzt. Die extrazelluläre 515 kDa große β- Untereinheit bindet nicht-kovalent die 85 kDa große Untereinheit, welche die Transmembran-Domäne besitzt (Li et al., 1997). Wie alle Mitglieder der LDL- Rezeptor Familie besitzt CD91/LRP fünf Elemente: (a) cysteinreiches Bindungscluster für Liganden, (b) cysteinreicher *Epidermal-Growth-Factor* (EGF)- Rezeptor, (c) YWTD Domänen, (d) eine Transmembrandomäne, (e) cytoplasmatische Domäne.
Für CD91 sind mehr als 30 extrazelluläre Liganden beschrieben, zu denen Lipoproteine, Proteasen, Proteaseninhibitoren, Endotoxine, Viren und intrazelluläre Proteine zählen (Herz and Strickland, 2001). Eines dieser bakteriellen Toxine ist das Exotoxin A von *Pseudomonas aeruginosa* (FitzGerald et al., 1995), das durch ADP-Ribosylierung des Elongationsfaktor die Proteinsynthese hemmt. Dadurch kann es als Nachweis von funktionellem CD91 verwendet werden.

Die *Toll-like* Rezeptoren TLR-2 und -4 wurden als Rezeptoren für Hsp70 und das mikobakterielle Hsp60 beschrieben. Hierbei konnte eine Hsp70 abhängige pro-inflammatorische Induktion gezeigt werden, welche vom Myd88/IRAK/NF-κB Signaltransduktionsweg sowie von der Existenz der TLR-2 und -4 abhängt (Asea et al., 2002; Ohashi et al., 2000). TLR-2 und -4 gehören zu den *Pattern Recognition*-Rezeptoren (PRR), wie auch CD14, CD11/18, der Komplementrezeptor CR1/CD35 sowie die L-Typ Lektine. Diese Rezeptorfamilie erkennt körperfremde Substanzen, die sich auf eine Infektion zurückführen lassen. Diese besitzen sogenannte PAMP-Motive (*pathogen assiciated molecular patterns*), zu denen Makromoleküle wie LPS, Peptidoglykane, nicht methylierte CpG DNA und bakterielles Lipoprotein zählen (McCoy et al., 2004; Schneeberger et al., 2004).

Das zur Familie der TNF –(*tumor necrose factor*) Rezeptoren (Bodmer et al., 2002) gehörende CD40 wird als Rezeptor für das mykobakterielle Hsp70 beschrieben (Wang et al., 2001b). Hierbei wird die Interaktion über die C-terminale Domäne des mykobakteriellen Hsp70 vermittelt. Diese Bindung löst die Sekretion von Cytokinen (RANTES) aus, was eine Stimulation des Immunsystems zur Folge hat. Neueste Ergebnisse zeigen eine Wechselwirkung zwischen dem mykobakteriellem Hsp70 und

dem CCR5 Chemokin-Rezeptor. Hierbei konnte eine verstärkte Interaktion von Hsp70 mit doppeltransfizierten Zellen $CD40^+/CCR5^+$ beobachtet werden (Whittall et al., 2006). Darüber hinaus wurde für das humane Hsp70 eine über die ATPase vermittelte CD40 Interaktion aufgezeigt (Becker et al., 2002).

CD40, ein 40 kD Typ-I Membranprotein wird von verschiedenen Zellen des Immunsystems sowie von Tumorzellen exprimiert (Nguyen and Benveniste, 2002). Aufgrund seiner PLAD- (*preligand assembly domain*) Domäne kommt es zu Bildung eines trimeren Komplexes (Chan et al., 2000), welcher in Verbindung mit seinem trimeren CD40-Liganden einen heterogenen hexameren Komplex darstellt. Dies löst intrazellulär Signaltransduktionskaskaden aus, mit der Aktivierung von NF-κB und den dadurch bedingten Expression und Sekretion von Cytokinen (GM-CSF, IL 1/4/6/8/10/12, RANTES, TNF-α) (Tone et al., 2001).

Rezeptorvermittelte Endozytose von Hsps

Die an Hsp- Molekülen assozierte Peptidmenge wird mit 1-2 ng/pro Zelle als sehr gering angenommen (Blachere et al., 1997). Da trotz dieser geringen Antigenmenge effiziente T-Zellantworten induziert werden, wurden spezifische endozytotische Rezeptoren für Hsp auf APC postuliert (vgl. Rezeptoren für Hsps), für die es früh die ersten Hinweise gab: Das ER-ständige petidbindende Chaperon Calretikulin besitzt wie GRP94 immunogene Wirkung. Dagegen sind Immunisierungen mit PDI, dem Haupakzeptor TAP-translozierter Peptide, noch nicht gelungen (Nair et al., 1999). Untersuchungen an Makrophagen zeigten zudem, dass lediglich eine Subpopulation von Makrophagen in der Lage ist, Hsp-Peptid-Komplexe effektiv zu repräsentieren. Diese Beobachtungen deuten darauf hin, dass eine selektive Expression eines oder mehrerer Hsp-Rezeptoren vorhanden sein muß.

Für Hsp70 konnte zunächst die Existenz mehrer Endozytose Rezeptoren gezeigt werden (vgl. Rezeptoren für Hsps). In der Arbeit von Castellino et al. (2000) wird eine rezeptorvermittelte Endozytose für Hsp70 gezeigt, die abhängig von der Sequenz des gebundenen Peptids unterschiedliche Wege verfolgt. Unterschieden wird zwischen einem TAP -abhängigen und -unabhängigen Weg, wobei C-terminal verlängerte Peptide aus dem Endosom ins Zytosol abgegeben werden und von dort über das Protaesom und TAP in den MHC-I Präsentationsweg gelangen.

Ähnlich wie für Hsp70 wurde für GRP94 eine rezeptorvermittelte Endozytose gezeigt (Arnold-Schild et al., 1999). In Experimenten mit Gold-markiertem GRP94 wurde im Elektronenmikroskop eine Bindung des Hsp an Clathrin-reiche Oberflächenregionen (clathrin-coated pits) von Makrophagen und Monozyten beobachtet (Arnold-Schild et al., 1999). Darüber hinaus wird für GRP94 ein Transferrin-positives frühes endosomales Kompartiment beschrieben, wobei hier zu späteren Zeitpunkten (nach 20 min) partielle Lokalisationen in lysosomalen Strukturen zu beobachten waren (Wassenberg et al., 1999).

2.6 Zielsetzung der Doktorarbeit

Hitzeschockproteine wie Hsp70, Hsp90, GRP94 und Calreticulin spielen eine wichtige Rolle in der Proteinsynthese, der Proteinfaltung und der Translokation von neu synthetisierten Proteinen. Neben diesen konventionellen Funktionen wurde den Hitzeschockproteinen wie Hsp70 die Eigenschaft als *Adjuvans* bezüglich einer zytotoxischen T- Zell Aktivierung zugeschrieben. Dabei führt an Hsp70 gebundenes Peptid zu einer spezifischen MHC-I vermittelten zytotoxischen $CD8^+$ T-Zellantwort (*cross priming*). Für diesen Effekt wurden in unterschiedlichen Arbeiten verschiedene Rezeptoren auf der Zelloberfläche von antigenpräsentierenden Zellen beschrieben.

Ziel dieser Arbeit war es, die Interaktion zwischen dem Hsp70-Peptid-Komplex und der Zelloberfläche antigenpräsentierender Zellen zu untersuchen. Dabei lag ein Schwerpunkt, im Zusammenhang mit der Kreuzpräsentation, auf der bereits beschriebenen Interaktion von Hsp70 mit dem CD91 Rezeptor. Des Weiteren sollten die Hsp70 Untereinheiten N70 und C70 hinsichtlich ihrer Oberflächenanbindung an Makrophagen charakterisiert werden. Parallel zu den Anbindungsstudien wurde die Internalisierung des Hsp70-Peptid Komplexes, mit Schwerpunkt auf der Identifizierung der daran beteiligten subzellulären Kompartimente, untersucht. Ferner sollte auch das Verhalten von unbeladenem Hsp70 analysiert werden. Die Funktionalität der Anbindung und Internalisierung von *full length* Hsp70 und seinen Domänen in Hinblick auf die MHC-I Präsentation, wurde von Alice Levin (MPI für Biochemie Martinsried) mit Hilfe des B3Z T- Zell Hybridom Systems untersucht.

3. Ergebnisse

3.1 Darstellung von gereinigten, rekombinatem Hsp70, N70 und C70

Rekombinantes humanes Hsp70, N70 und C70 wurden als N-terminal His-getagte Proteine im *E.coli* Stamm BL21 Star exprimiert. Die Proteine wurden zunächst über den His-tag aus Bakterienlysat mittels einer Ni-NTA Affinitätschromatographie isoliert. In einem zweiten Aufreinigungsschritt wurden Hsp70 sowie N70 mittels ATP-Affinitätschromatographie weiter angereichert.
Im Folgenden wird anhand von Hsp70 die Aufreinigung repräsentativ für N70 und C70 aufgezeigt.

3.1.1 Expression und Aufreinigung

Nach Transformation des Konstruktes pProEx-His-Hsp70 in *E.coli* BL21 Star und Anzucht der Bakterienkultur, erfolgte die Induktion der Proteinexpression durch Zugabe von IPTG. Nicht lysierte Zellen, Zelltrümmer und Proteinaggregate wurden durch Ultrazentrifugation entfernt.
In Abb. 5 ist eine Aufreinigung von Hsp70 nach der Ni-NTA Affinitätschromatographie dargestellt. Fraktionen die Hsp70 enthielten wurden vereint und gegen einen Puffer, der 50mM KCl und 10mM ß-Mercaptoethanol enthielt, dialysiert. Durch Ultrazentrifugation wurden vorhandene Aggregate abgetrennt und der Überstand über eine ATP-Affinitätschromatographie weiter aufgereinigt (Abb. 6). Dieser Schritt erlaubt die Anreicherung aktiven Proteins, da die Affinitätsgrundlage aus dem physiologischen Substrat ATP besteht.

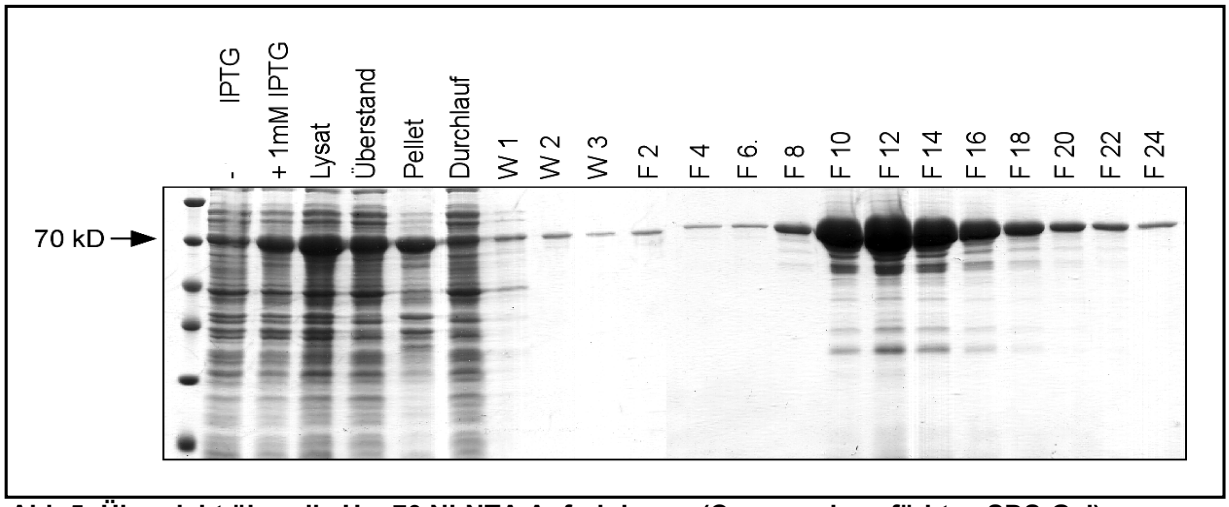

Abb.5: Übersicht über die Hsp70 Ni-NTA Aufreinigung (Coomassie gefärbtes SDS-Gel).
-/+ IPTG: jeweils 0,08 OD_{600} der Bakterienkultur vor und nach Induktion mit 1 mM IPTG; Lysat: nach Zellaufschluß; Überstand: nach 100.000 x g Zentrifugation; Pellet: unlösliche Bestandteile nach Ultrazentrifugation; Durchlauf: nicht gebundenes Material; W1-W3: Waschfraktionen; F2- F24: Elutionsfraktionen (1ml Fraktionen) des Imidazol-Gradienten (10→500mM in 40ml). Von jeder Fraktion wurden 1 µl (≈ 3 µg in Fraktion F12) aufgetragen.

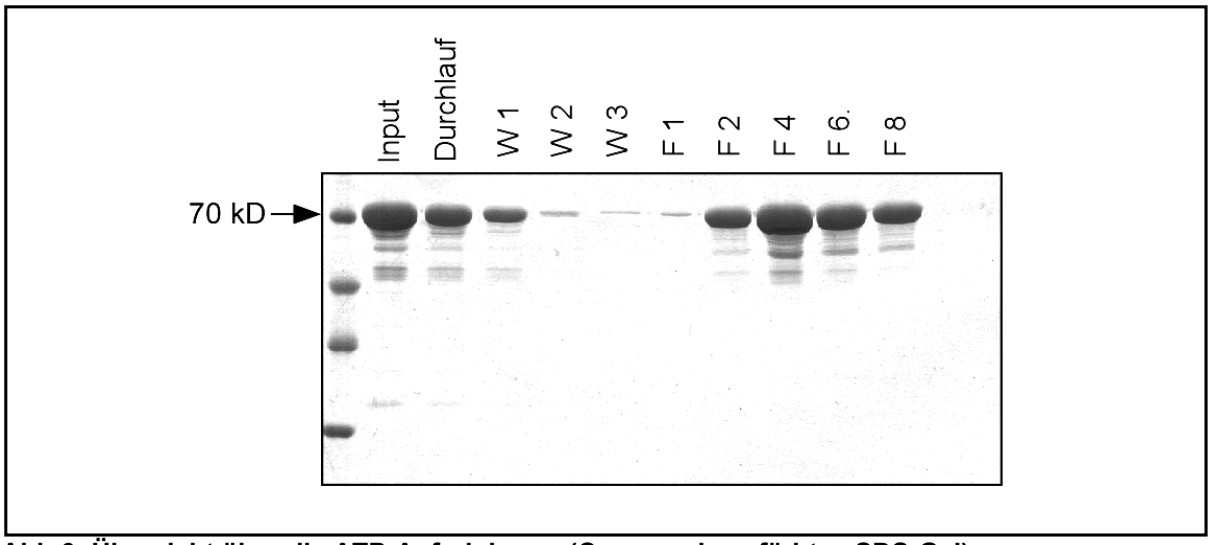

Abb.6: Übersicht über die ATP-Aufreinigung (Coomassie gefärbtes SDS-Gel).
Input: Dialysat nach Ultrazentrifugation; Durchlauf: nicht gebundenes Material; W1-W3: Waschfraktionen; F1-F8: Elution (1ml Fraktionen) von Hsp70 mit 10 mM ATP. Es wurde von jeder Fraktion 0,8 µl (= 3 µg in Fraktion F4) aufgetragen.

Der Reinheitsgrad des aufgereinigten Hsp70 betrug nach der ATP-Affinitätschromatographie ca. 95%.

Durch Zugabe von 10 mM β-Mercaptoethanol nach der Ni-NTA Aufreinigung konnte die Ausbeute an Hsp70 um ca. 50% erhöht werden. Die Fraktionen die Hsp70

enthielten wurden vereint, gegen PBS dialysiert und mittels Zentricon auf 1 ml aufkonzentriert.

Die Endotoxinkonzentration wurde mittels Limulus Amöbozyten Lysat-Test (LAL) bestimmt. Der LAL-Test wird als quantitativer Nachweis von bakteriellem Endotoxin eingesetzt. Um bakterielles Endotoxin zu entfernen, wurde in einem weiteren Schritt das Hsp70 mittels einer Polymixin B Säule dekontaminiert. Dadurch konnte der Endotoxingehalt um 90% auf unter 0,05 EU/µg Protein gesenkt werden.

Der Oligomerisierungsgrad des gereinigten Hsp70 wurde anschließend in einer analytischen Gelfiltration untersucht (Abb. 7).

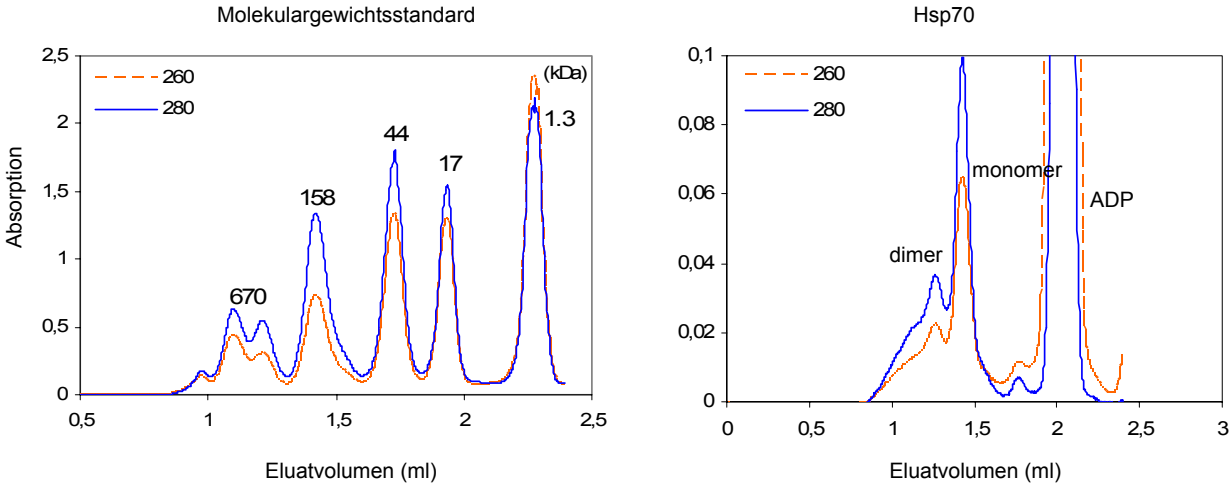

Abb.7: Analytische Gelfiltration von Hsp70 mit Hilfe einer Superdex 200- Säule (Pharmacia). (links): Molekulargewichtsstandard. (rechts): Hsp70-Probe. Jedes Marker- Protein ist in kDa angegeben.

Nach Inkubation mit 100 µM ADP für 30 min bei 37°C liegt der Hauptteil an Hsp70 als Monomer vor (Abb.7; rechtes Bild). Dimeres Hsp70 mit einem Molekulargewicht von ca. 150 kDa ist zu ca. 25% vorhanden. Dies lässt sich über die Tendenz der Substrat-bindenden Domäne von Hsp70, sich selbst als Substrat zu erkennen und zu binden, erklären.

Durch die aufeinander folgenden Aufreinigungsschritte, sowie die Charakterisierung mittels Gelfiltration, konnte sichergestellt werden, dass die nachfolgenden zellbiologischen Experimente mit niedrigem Endotoxin-Gehalt und überwiegend monomerem Hsp70-ATP/ADP durchgeführt wurden.

N70 und C70 wurden wie Hsp70 über den His_6-tag mittels Ni-NTA Affinitätschromatographie isoliert. Aufgrund der fehlenden ATPase Domäne wurde C70 direkt gegen PBS dialysiert, wohingegen N70 über die ATP-Affinitätschromatographie weiter aufgereinigt wurde. Mit Hilfe der Polymyxin B- Säule wurden sowohl N70 als auch C70 vom bakteriellen Endotoxin dekontaminiert.
In einer analytischen Gelfiltration wurden beide Proteine auf ihren Oligomerisierungszustand hin untersucht (Abb.8).

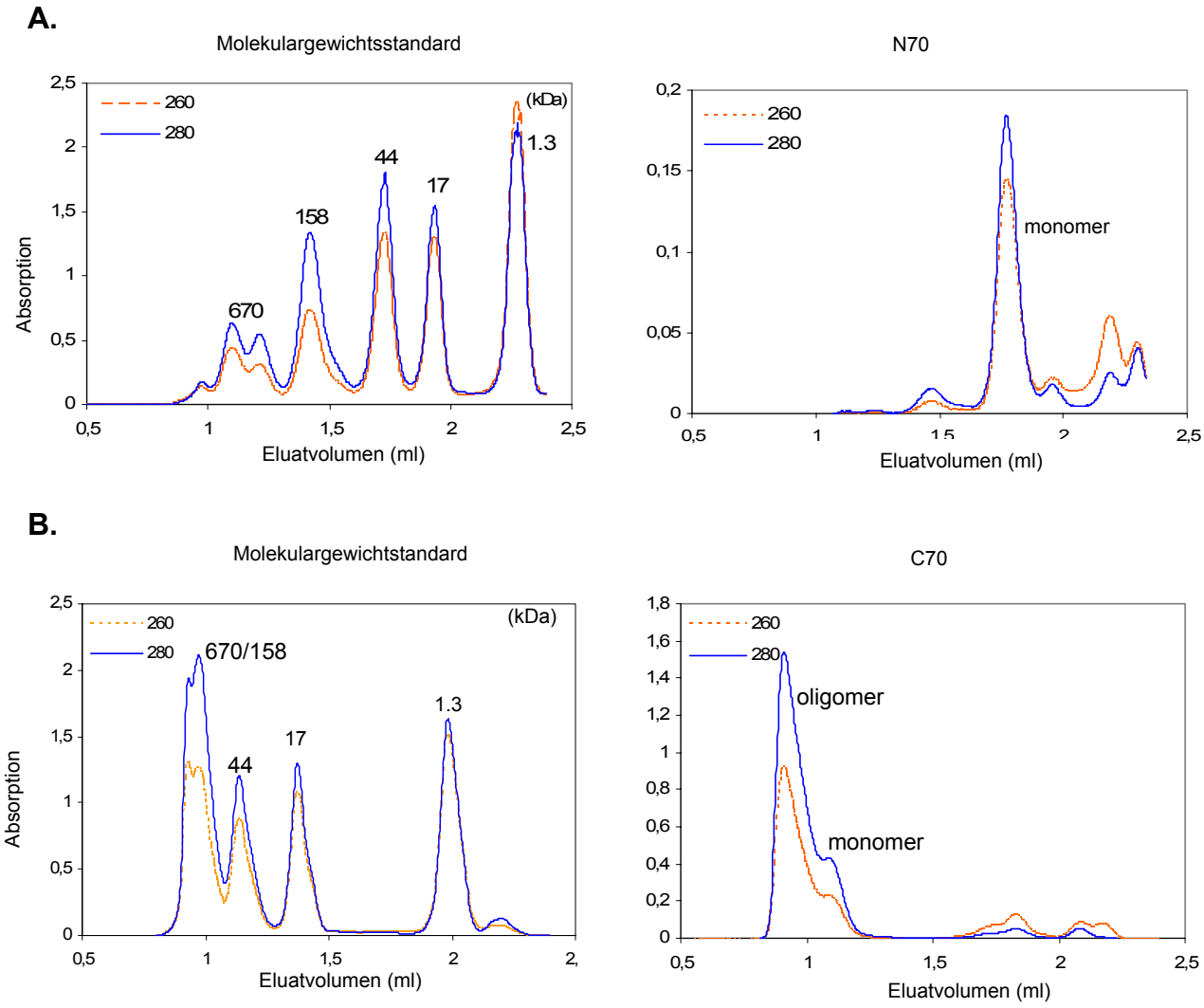

Abb.8: Analytische Gelfiltration von N70 und C70. (A) Molekulargewichtsstandard (links). N70 (rechts) N70-Probe. Hierbei erfolgte eine Vorinkubation von N70 mit 100 µM ADP. **(B)** Molekulargewichtsstandard (links). C70-Probe (rechts). Jedes Marker- Protein ist in kDa angegeben.

Das Elutionsprofil von N70 zeigt, dass der Hauptteil an N70 als Monomer mit einer Größe von 45 kDa vorliegt. Bei C70 ist auffällig, dass der Hauptpeak bei einem

Molekulargewicht von > 158 kDa läuft, und nur ca. 25 % als monomeres C70 (ca. 35 kDa) vorliegt. Der Oligomerisierungszustand konnte durch Vorinkubation mit Peptid in Richtung monomerem C70 verschoben werden. Für die darauf folgenden zellbiologischen Experimente wurde das monomere C70 aus den entsprechenden Fraktionen der Gelfiltration eingesetzt.

3.1.2 Fluoreszenz-Markierung

Je 1 mg Hsp70, N70 und C70 wurden nach Vorschrift des Herstellers (Molecular Probes) mit entweder Alexa 488, Alexa 546 oder Alexa 633-Farbstoff direkt markiert und mittels SDS-PAGE und anschließender Färbung mit Coomassie blue (Abb. 9) analysiert.

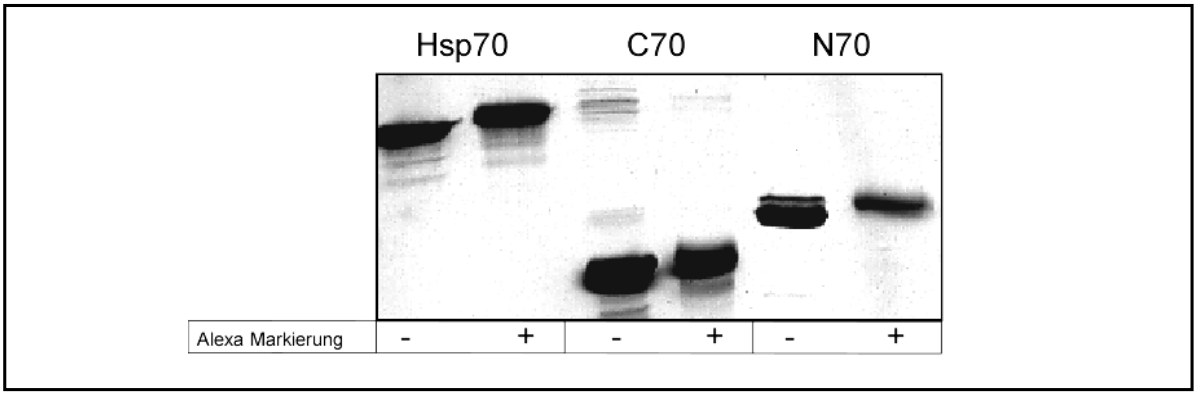

Abb.9: Direktmarkierung von Hsp70, N70 und C70 mit Alexa 488 (Coomassie gefärbtes SDS-Gel). Jeweils ca. 1µg Hsp70, N70 oder C70 wurden im Coomassie-gefärbten SDS-Gel analysiert. (-): vor der Direktmarkierung; (+): nach der Direktmarkierung

Wie in Abb. 9 zu sehen ist, verändert sich die Mobilität der Proteine nach Markierung, wodurch die Banden um ca. 2 kDa zu höheren Massen verschoben werden.
Die Effizienz der Markierung wurde unter Verwendung des für den jeweiligen Farbstoff spezifischen molaren Extinktionskoeffizienten ε mittels Spektrophotometrie bestimmt.
Für Hsp70 ergab sich eine Stöchiometrie von 3,5 Mol Farbstoff pro Mol Protein, wohingegen N70 und C70 mit jeweils 2 Farbstoffmolekülen markiert wurden.

Als Kontrolle wurde 1 mg BSA mit Alexa 488 Farbstoff markiert, wobei ein Verhältnis von 4 Mol Farbstoff zu 1 Mol Protein ermittelt wurde.

3.2 Bindungsstudien

3.2.1 Professionell antigenpräsentierende Zellen binden sowohl extrazelluläres Hsp70* als auch N70* und C70*

Bisher wurde gezeigt, dass sowohl humanes als auch mykobakterielles Hsp70 an murine Monozyten/Makrophagen und Dendriten bindet (Becker et al., 2002; Noessner et al., 2002; Wang et al., 2001b). Indirekt wurde die Anbindung der mykobakteriellen ATPase (N70) Domäne sowie der Substrat-bindenden Domäne (C70) an murinen Monozyten, durch Aktivierung der CC-Chemokinen, gezeigt (Wang et al., 2001b). Hierbei führte nur die C-terminale nicht aber die N-terminale Domäne zur Ausschüttung von Chemokinen. Dagegen postulierte Zimmer et al. (2002), dass beide Hsp70 Domänen für die Anbindung und Aufnahme notwendig seien. Um diese widersprüchlichen Ergebnisse zu analysieren, wurde Hsp70 sowie die N- und C-terminale Domäne getrennt expremiert, aufgereinigt und fluoreszenz markiert (im weiteren Text als * markiert). Je 1 µM Hsp70*, N70* und C70* wurden mit der murinen Makrophagen Zelllinie Raw264.7 für 30 min bei 4°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen gewaschen, um ungebundenes Protein zu entfernen und die Zellen im konfokalen Mikroskop analysiert. Sowohl Hsp70* als auch N70* und C70* zeigen eine Anbindung an die Zelloberfläche von Raw264.7 Zellen (Abb. 10; Bilder 1-3). Als weiteres wurde die murine dendritische Zelllinie D2.4 auf ihre Bindungseigenschaft hin analysiert. Diese Zelllinie wurde verwendet, da mit ihr die später beschriebenen funktionellen Präsentationsassays durchgeführt wurden. Auch hier wurde sowohl die Anbindung von Hsp70* als auch N70* und C70* an die Zelloberfläche beobachtet (Abb. 10; Bilder 4-6). Die Spezifität der Hsp70* Anbindung wurde mit der murinen Makrophagen Zelllinie Raw309 Cr.1 untermauert. Wie in der Literatur (Basu et al., 2001) bereits beschrieben, konnte keine Hsp70* Anbindung an die Zelloberfläche dieser Zelllinie beobachtet werden (Abb.10 Bild 7), d.h die

Anbindung ist Zell-Typ spezifisch. Um einen eventuellen Einfluss des His_6-tag auf die Hsp70 Anbindung zu untersuchen, wurde dieser vorher proteolytisch entfernt.

Nach Entfernung des His_6-tags durch Verdau mit TEV-Protease und Markierung mit Alexa 546, konnte keine Beeinflussung der Hsp70* Anbindung an die Zelloberfläche der Raw264.7 Zellen beobachtet werden (Abb. 10; Bild 8), d.h der His-tag ist nicht verantwortlich für die Anbindung. Zur Untermauerung der spezifischen Hsp70* Anbindung wurden Raw264.7 Zellen mit Alexa 488 markiertem BSA für 30 min bei 4°C inkubiert, intensiv gewaschen und im konfokalen Mikroskop analysiert. Bild 9 der Abbildung 10 zeigt keine Zelloberflächenanbindung von BSA an Raw264.7 Zellen. Folglich kann für die Anbindung die Fluoreszenz-Markierung nicht verantwortlich sein.

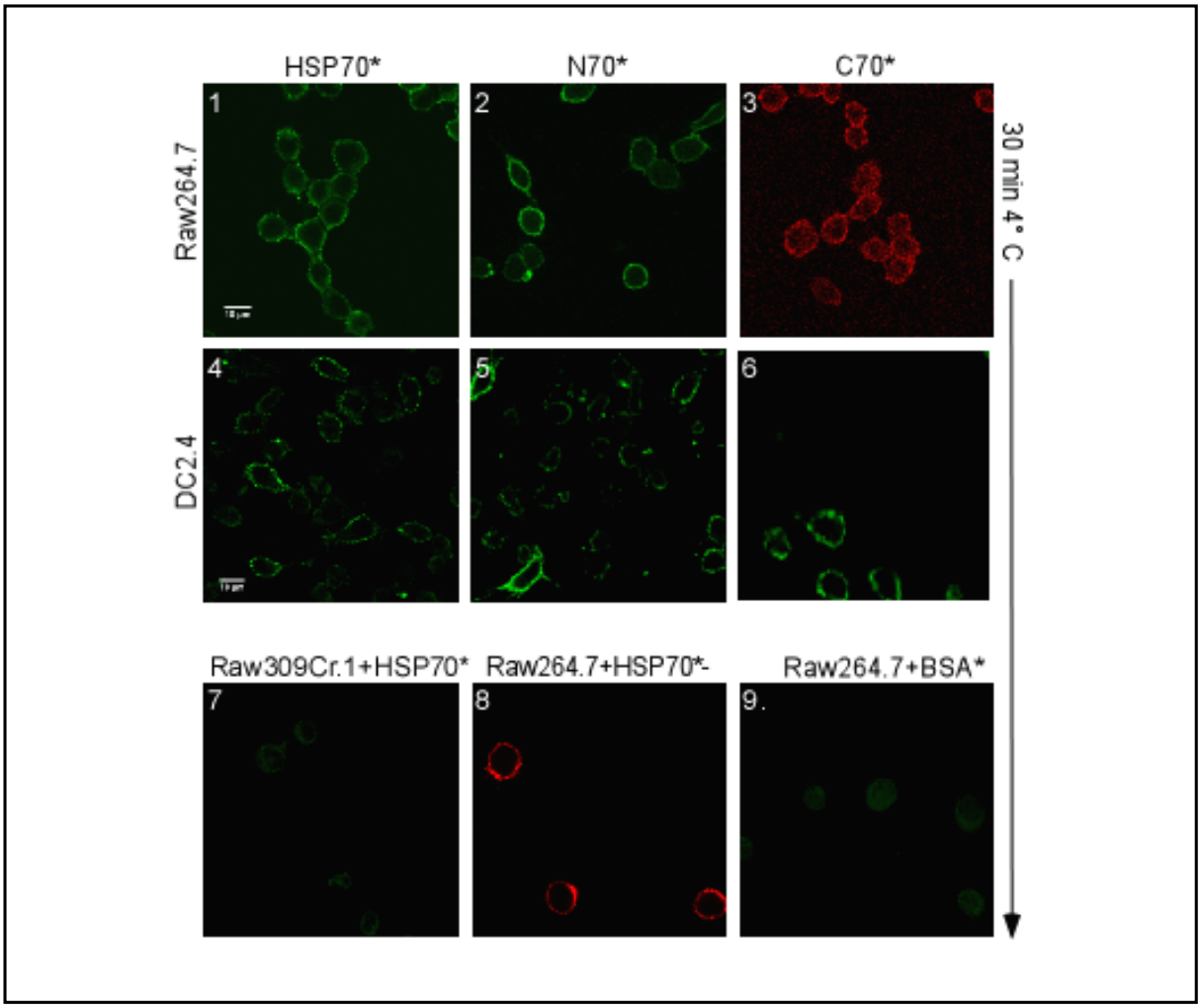

Abb.10: Professionell antigenpräsentierende Zellen binden Hsp70*, N70* und C70*. Gezeigt werden Raw 264.7 Zellen (Bild 1-3) oder D2.4 Zellen (Bild 4-6) mit 1 µM fluoreszenz-markiertem

Hsp70, N70 oder C70. Als Kontrolle wurden Raw309 Cr.1 Zellen mit fluoreszenz-markiertem Hsp70 inkubiert (Bild 7), sowie Raw264.7 Zellen mit TEV-Protease behandeltem fluoreszenz-markiertem Hsp70 (Bild 8) oder Alexa 488-markiertem BSA (Bild 9).

Im Zuge der Untersuchungen zur Zell-Spezifität der Hsp70-Bindung wurden außer Makrophagen (Raw264.7), dendritische Zellen (D2.4 aus Maus) auch T-Lymphozyten unterschiedlicher Spezies (RMA-Maus; Jurkat-Mensch) getestet.
Hierzu wurden die angegebenen Zelllinien mit fluoreszenzmarkiertem Hsp70 inkubiert. Die Oberflächenanbindung wurde mittels FACS analysiert und als Histogramm dargestellt. Alle Experimente wurden in Gegenwart von 1% BSA durchgeführt.

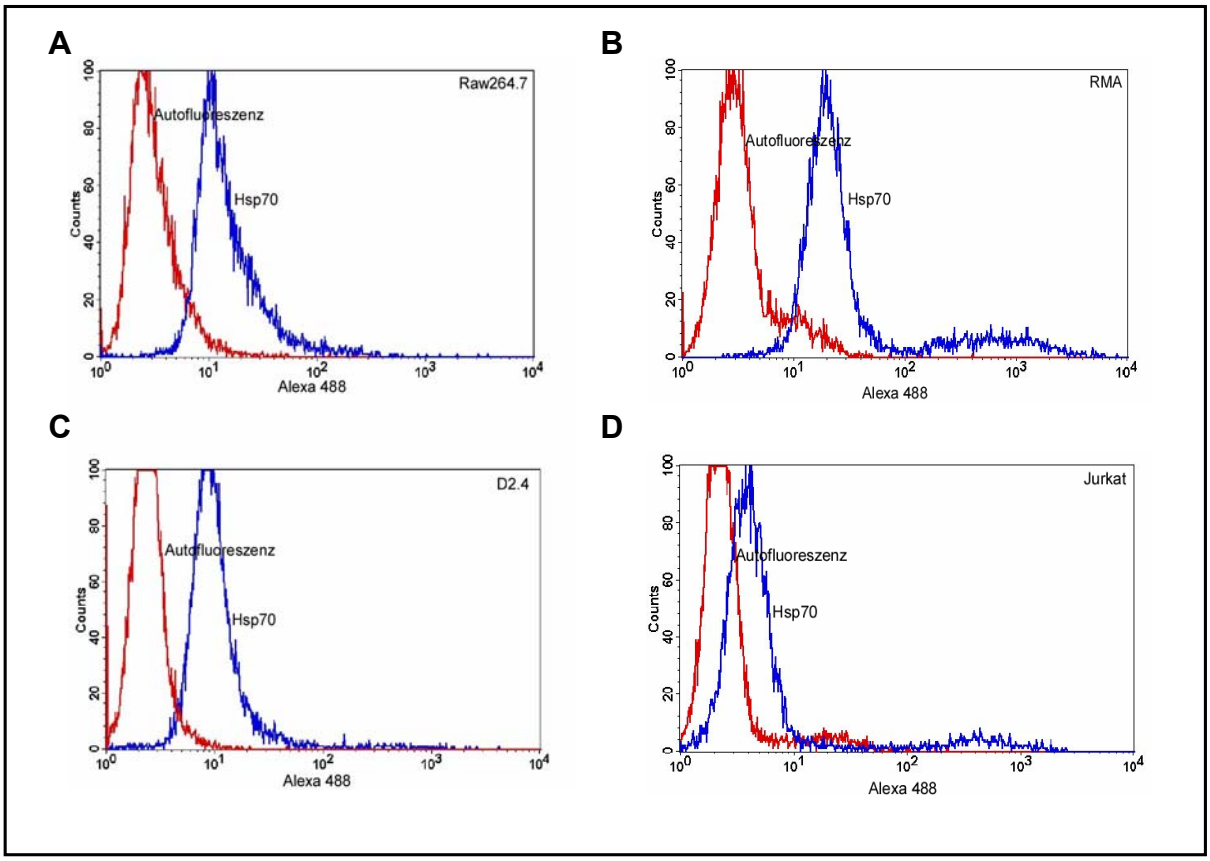

Abb.11: Spezifische Anbindung von Hsp70* an unterschiedliche Zelllinien verschiedenen Ursprungs. Zum Vergleich wurden je 5x 10^5 Raw 264.7 **(A)**, RMA **(B)**, D2.4 **(C)** oder Jurkat **(D)** Zellen mit fluoreszenz-markiertem Hsp70 inkubiert und mittels FACS analysiert.

Die als Histogramm dargestellten FACS Messungen zeigen, dass Hsp70* von der Dendriten-Zelllinie D2.4 (Abb.11C) sowie von der Makrophagen-Zelllinie Raw264.7

(Abb.11A) gleichermaßen gebunden wird. Auffällig ist, dass die stärkste Anbindung bei der murinen T-Lymphozyten Zelllinie RMA (Abb.11B) zu beobachten ist,

wohingegen die menschliche T-Lymphozyten Zelllinie Jurkat (Abb.11D), wie in der Literatur bereits beschrieben, keine Anbindung aufweist.

3.2.2 Die Anbindung von N70* und C70* erfolgt unabhängig voneinander

Im Vergleich zur einheitlichen Anbindung von Hsp70* (Abb. 12; Bild 1) an die Zelloberfläche von Raw264.7 Zellen konnte für N70* und C70* ein punktuelles Muster beobachtet werden (Abb.12; Bild 2+3).

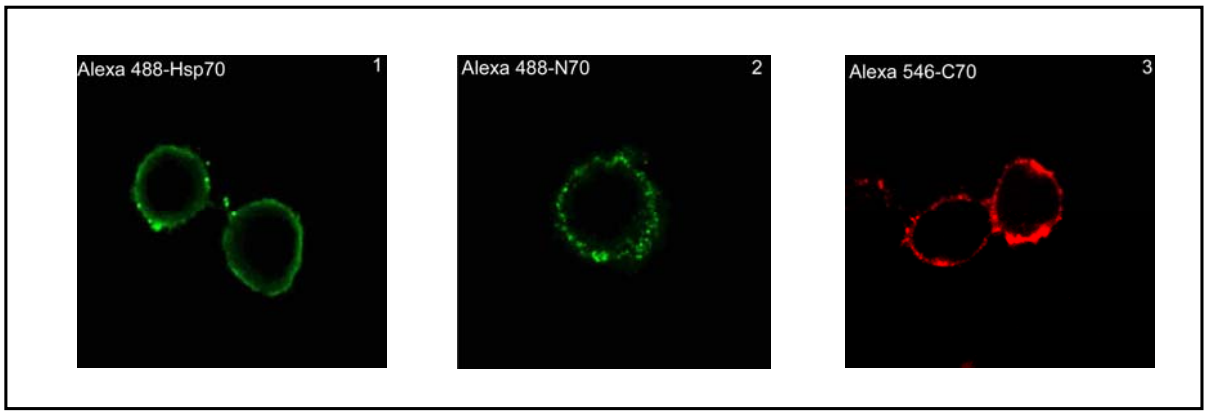

Abb.12: Anbindung von Hs70*, N70* und C70*. (1) Raw264.7 Zellen mit gebundenem Hsp70*. **(2)** Raw264.7 Zelle mit gebundenem N70*. **(3)** Raw264.7 Zellen mit gebundenem C70*

Um dies näher zu untersuchen, wurden Kompetitionsexperimente durchgeführt. Hierzu wurden Standard-Bindungsassays an Raw264.7 Zellen mit fluoreszenz-markiertem Hsp70 in Gegenwart eines 10 fachen Überschusses von unmarkiertem Hsp70, N70 oder C70 durchgeführt. Die Anbindung von 1µM Hsp70* an Raw264.7 Zellen diente als Referenz. Die Zugabe von 10 µM unmarkiertem Hsp70 reichten aus, um die Anbindung von 1 µM Hsp70* vollständig zu kompetitieren. Im Gegensatz dazu konnte durch die Zugabe eines 10 fachen Überschusses an unmarkiertem N70 bzw. C70 jeweils nur eine partielle Kompetition von Hsp70* beobachtet werden. Erst

die gleichzeitige Zugabe eines 10 fachen Überschusses an unmarkiertem N70 und C70 kompetitierte die Hsp70* Anbindung wie unmarkiertes f*ull-length* Hsp70. Dies

waren die ersten Hinweise, dass die Anbindung von Hsp70 sowohl über die ATPase Domäne als auch über die Substrat-bindende Domäne stattfinden kann.

Um diesen Effekt näher zu untersuchen, wurde 1 µM N70* in Gegenwart eines 10 fachen Überschusses an unmarkiertem Hsp70 bzw. N70 mit Raw264.7 Zellen inkubiert und im konfokalen Mikroskop analysiert. Wie in Abb. 13 (Bild 7/8) zu sehen ist, wird sowohl durch Hsp70 als auch durch N70 die Anbindung von N70* vollständig aufgehoben. Im Gegensatz dazu konnte bei Zugabe von einem 10 fachen Überschuss an unmarkiertem C70 keine Kompetition der Anbindung von N70* beobachtet werden (Abb. 13, Bild 9).

.

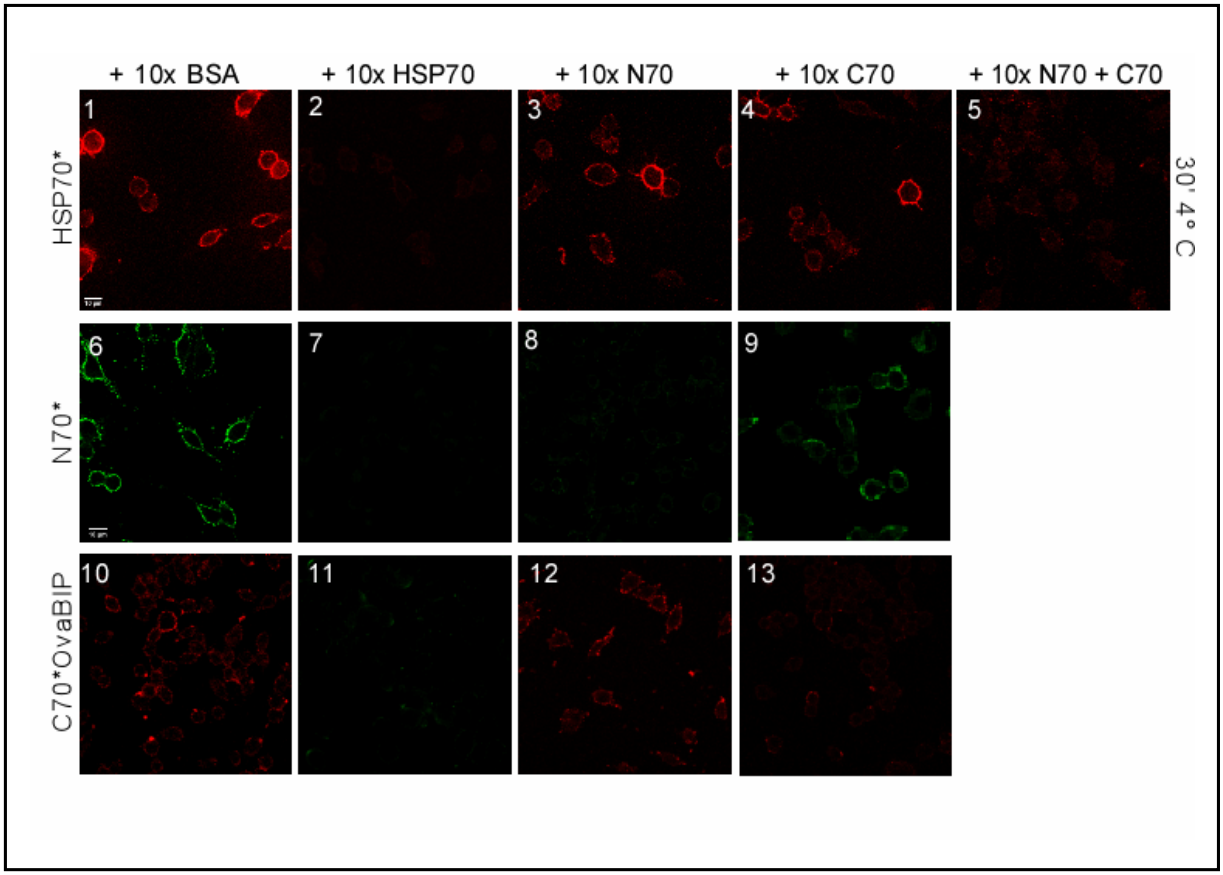

Abb.13: Die Anbindung von Hsp70* wird durch seine Domänen nur partiell kompetitiert. Raw 264.7 Zellen wurden mit 1 µM fluoreszenz-markiertem Hsp70, N70 und C70 in Gegenwart eines 10 fachen Überschusses an unmarkiertem BSA, Hsp70, N70, C70 oder eine Mischung aus N70 und C70 inkubiert.

Die Kompetitionsexperimente von C70* lieferten entsprechende Ergebnisse. Durch einen 10 fachen Überschuss an unmarkiertem Hsp70 oder C70 konnte die Anbindung vollständig kompetitiert werden (Abb.13, Bild 11/13), wohingegen kein

Kompetitionseffekt von C70* bei Zugabe von unmarkiertem N70 zu beobachten war (Abb. 13, Bild 12). Alle Experimente wurden in Gegenwart eines 10 fachen Überschusses an Rinderserumalbumin durchgeführt, wobei hier kein Einfluss festzustellen warIn einer anschließenden FACS Analyse wurden die Kompetitionsexperimente quantifiziert. Die Ergebnisse sind in Abb. 14 dargestellt, wobei die Anbindung von Hsp70*, N70* und C70* alleine jeweils als 100% definiert wurde.

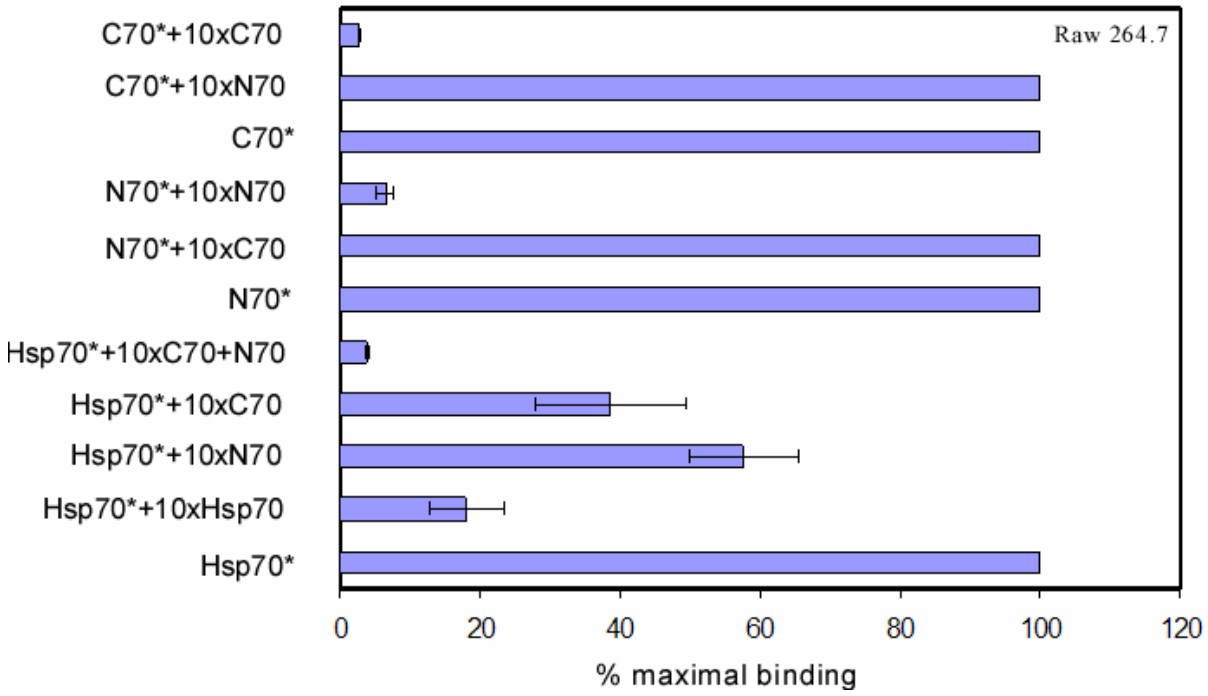

Abb.14: Quantitative FACS-Analyse der Kompetition an Raw264.7 Zellen. Die Anbindung von Hsp70*, N70* und C70* ohne Kompetitor wurde auf 100% gesetzt. Die Kompetitoren wurden jeweils im 10 fachen Überschuss eingesetzt.

Die Anbindung von Hsp70* wurde durch unmarkiertes Hsp70 zu über 80% kompetitiert. Ein 10 facher Überschuss an N70 führte zu einer Verringerung der Hsp70* Anbindung von ca. 40%, wohingegen C70 eine Verringerung von ca. 60% bewirkte. Eine Mischung aus N70 und C70 hingegen führte zur fast vollständigen Blockierung der Hsp70 Anbindung. Die Anbindung von N70* wurde durch einen

10 fachen Überschuss an unmarkiertem C70 nicht beeinflusst, wohingegen unmarkiertes N70 die N70* Anbindung fast vollständig aufhob. Auf der anderen Seite konnte die C70* Anbindung nicht durch einen 10 fachen Überschuss an

unmarkiertem N70 beeinflusst werden, wohingegen unmarkiertes C70 eine vollständige Reduzierung der C70* Anbindung bewirkte.

Diese Ergebnisse zeigen, dass die Hsp70 Anbindung an die Zelloberfläche von antigenpräsentierenden Zellen sowohl über die ATPase Domäne als auch über die Substrat-bindende Domäne vermittelt wird. Folglich existieren für beide Domänen unterschiedliche Bindungsstellen auf Raw264.7 Zellen.

3.2.3 N- und C- Domäne von Hsp70 binden an distinkte Mikrodomänen auf der Plasmamembran

Für die weitere Analyse der unterschiedlichen Bindungsdomänen von Hsp70 wurde N70 und C70 mit unterschiedlichen Farbmolekülen markiert. Hierzu wurde Alexa 488 für N70 und Alexa 546 für C70 verwendet. Raw264.7 Zellen wurden gleichzeitig mit je 1 µM N70* und C70* inkubiert und im konfokalem Mikroskop analysiert. Wie in Abb. 15 zu sehen ist, binden N70* und C70* an unterschiedliche Mikrodomänen. Die vereinzelt zu beobachtende Kolokalisation (als gelbe Spots zu erkennen) könnte Kolokalisation anzeigen oder durch die limitierte Auflösung der Lichtmikroskopie hervorgerufen worden sein.

In der Übersicht ist deutlich die inhomogene Verteilung der einzelnen Subdomänen von Hsp70 zu erkennen. Die Heterogenität der Anbindung deutete darauf hin, dass N70 und C70 unterschiedliche Mikrodomänen bevorzugen.

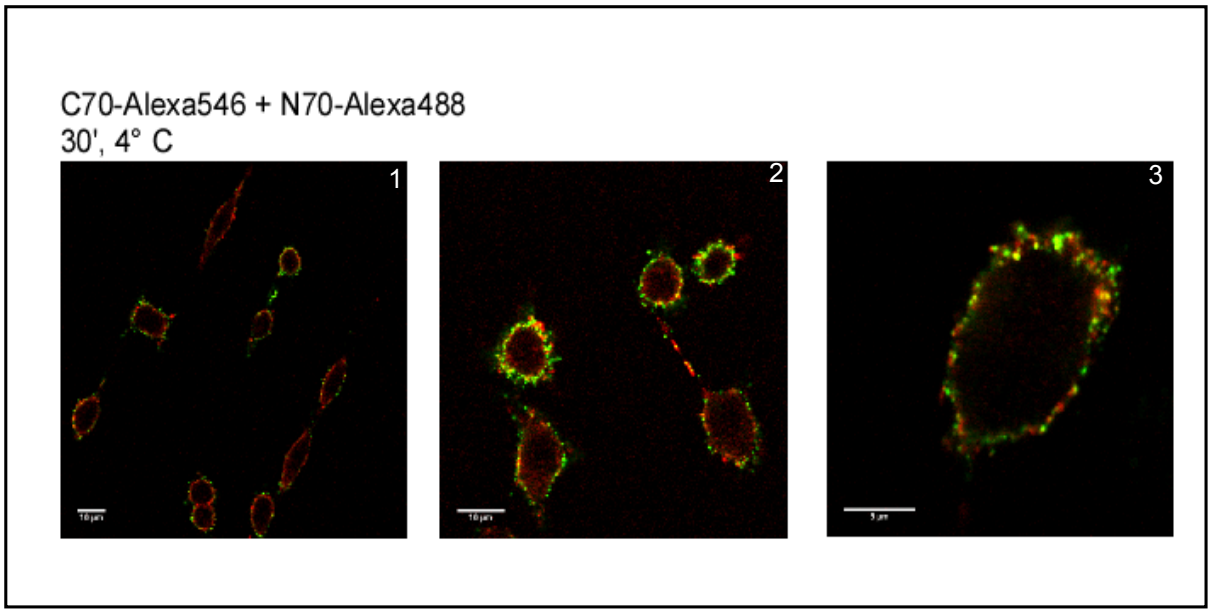

Abb.15: Die Anbindung von N70* erfolgt getrennt von C70*. Raw264.7 Zellen wurden gleichzeitig mit Alexa 488 markiertem N70 und Alexa 546 markiertem C70 inkubiert. **(1+2)** Übersichtsbilder von Raw264.7 Zellen mit gebundenem N70* und C70*. **(3)** Ausschnitt von einer Raw264.7 Zelle mit gebundenem N70* und C70*. Die Dokumentation erfolgte mittels konfokaler Mikroskopie.

Die Möglichkeit zweier Bindungsstellen wurde weiter biochemisch untersucht. Hierzu wurden Raw264.7 Zellen mit biotinyliertem Hsp70, N70 oder C70 für 30 min bei 4°C inkubiert, gewaschen und mit 0,5% Brij98 lysiert. Mittels eines zweistufigen Dichtegradienten wurde das Lysat in Detergens-stabile und Detergens-lösliche Fraktionen separiert. Gleiche Volumina jeder Fraktion wurden mittels SDS-PAGE und anschließendem Western Blot durch Bindung markierten Streptavidins analysiert.

Als Marker für Detergens-unlösliche Domänen wurde *Horseradish peroxidase* (HRP)-gekoppeltes Choleratoxin-B verwendet, welches spezifisch mit dem in Detergens unlöslichen Membranen vorkommende Glykolipid GM 1 interagiert (Blank et al., 2002).

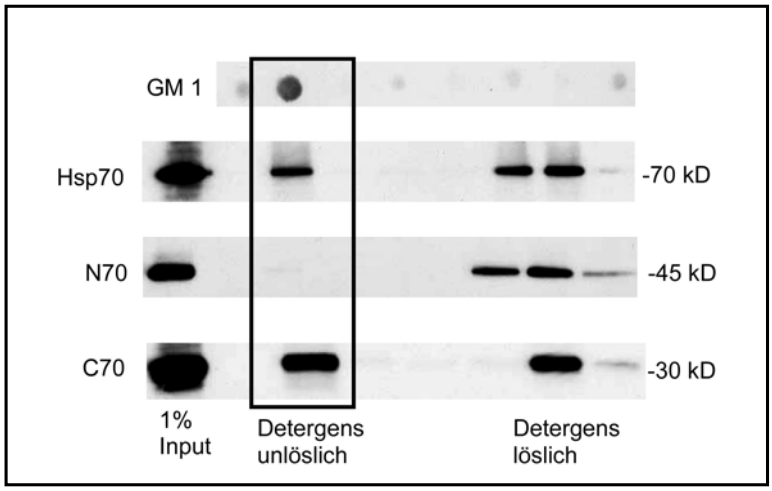

Abb.16: Sowohl Hsp70 als auch C70 sind in Detregens unlöslichen Domänen zu finden. Raw264.7 Zellen wurden mit biotinyliertem Hsp70, N70 und C70 inkubiert. Nach Lyse mit Brij98 wurde über einen Optiprep Gradienten, wie in Material und Methoden beschrieben, fraktioniert. Von jeder Fraktion wurden gleiche Volumina auf ein SDS-Gel aufgetragen, geblottet und gegen Biotin mittels Streptavidin-HRP detektiert.

Abb. 16 zeigt, dass Hsp70 sich sowohl in Detergens-lösliche als auch in Detergens-unlösliche Membranen verteilt. Ähnliches konnte für C70 beobachtet werden, wohingegen N70 ausschließlich in Detergens-löslichen Membranen zu finden war.

Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse, dass die Anbindung von Hsp70 unabhängig von einander sowohl über seine ATPase als auch über seine Substrat-bindende Domäne vermittelt werden kann, und dass die Bindungsstellen in unterschiedlichen Mikrodomänen der Zelloberfläche lokalisiert sind.

3.3 Untersuchungen zur Anbindung von Hsp70 und seinen Domänen an putative Hsp70-Rezeptoren

3.3.1 CD 91 als Hsp70 Rezeptor

CD91 wurde als erster Rezeptor für das Hitzeschockprotein GRP94 (gp96) im Zusammenhang mit der Kreuzpräsentation von Antigen auf MHC-Klasse I Molekülen beschrieben (Binder et al., 2000b; Binder et al., 2001). In späteren Studien wurde postuliert, dass CD91 neben GRP94 auch die Hitzeschockproteine Hsp70, Hsp90 und Calreticulin bindet, wobei diese Interaktionen bis heute in Frage gestellt werden. Bei CD91 handelt es sich um ein ca. 600 kDa schweres Membranprotein, welches auch unter dem Namen LRP (*LDL- Rezeptor related protein*), α_2-Makroglobulin oder ApoE-Rezeptor bekannt ist. Für CD91 sind über 28 Liganden beschrieben, unter anderem α_2-Makroglobulin, Apolipoprotein E, Plasminogenaktivator, Proteinase-Inhibitoren, Hitzeschock-Proteine sowie das Exotoxin A aus *Pseudomas aerigunosa* (FitzGerald et al., 1995). CD91, welches zu der Familie der *Scavanger*-Rezeptoren gehört, besteht aus einer 500 kDa exoplasmatischen Domäne, die nicht kovalent mit der cytoplasmatischen Domäne (80kDa) verbunden ist. Auf der Zelloberfläche von Raw264.7 Zellen wurde CD91 als Rezeptor für GRP94 identifiziert, wohingegen die Zellinie Raw309 Cr.1, welche GRP94 nicht bindet, als Negativ-Kontrolle verwendet wurde (Basu et al., 2001).

Um die Anbindung von Hsp70 an den CD91 Rezeptor zu untersuchen, wurden die Zelllinien Raw264.7 und Raw309Cr.1 jeweils im LPS (Lipopolysaccharid) induzierten und nicht induzierten Zustand verwendet. Als Referenz wurde eine von A. Roebroek generierte mit CD91 stabile transfizierte CHO Zelllinie (CHO+CD91) sowie CHO Wildtyp (CHOwt) verwendet.

Lipopolysaccharid (LPS) ist ein Grundbestandteil der Membran gram-negativer Bakterien und stellt daher ein Gefahrensignal für das Immunsystem dar. LPS bindet an das Zelloberflächenprotein CD14 sowie an *Toll-like*-Rezeptoren von Makrophagen. Dies bedingt eine Aktivierung von verschiedenen

Signaltransduktionskaskaden, wie z.B. den NF-κB Weg und drei MAPK (*mitogen activated protein kinase*) Wegen, sowie die Ausschüttung von Cytokinen und Chemokinen. Signaltransduktionskaskaden führen zur Regulation verschiedener Transkriptionsfaktoren. Mit Hilfe dieses Effektes soll untersucht werden, ob die LPS-Stimulation Einfluss auf den Expressionsgrad von CD91 hat, und somit auf die Bindung von Hsp70.

Die Stimulation erfolgte durch Inkubation von Raw264.7 Zellen mit 1µg/ml LPS für 36h. LPS behandelte und unbehandelte Zellen wurden anschließend mit Fluoreszenz-markiertem Hsp70 für 30 min bei 4°C inkubiert, gewaschen und analysiert (Abb.17).

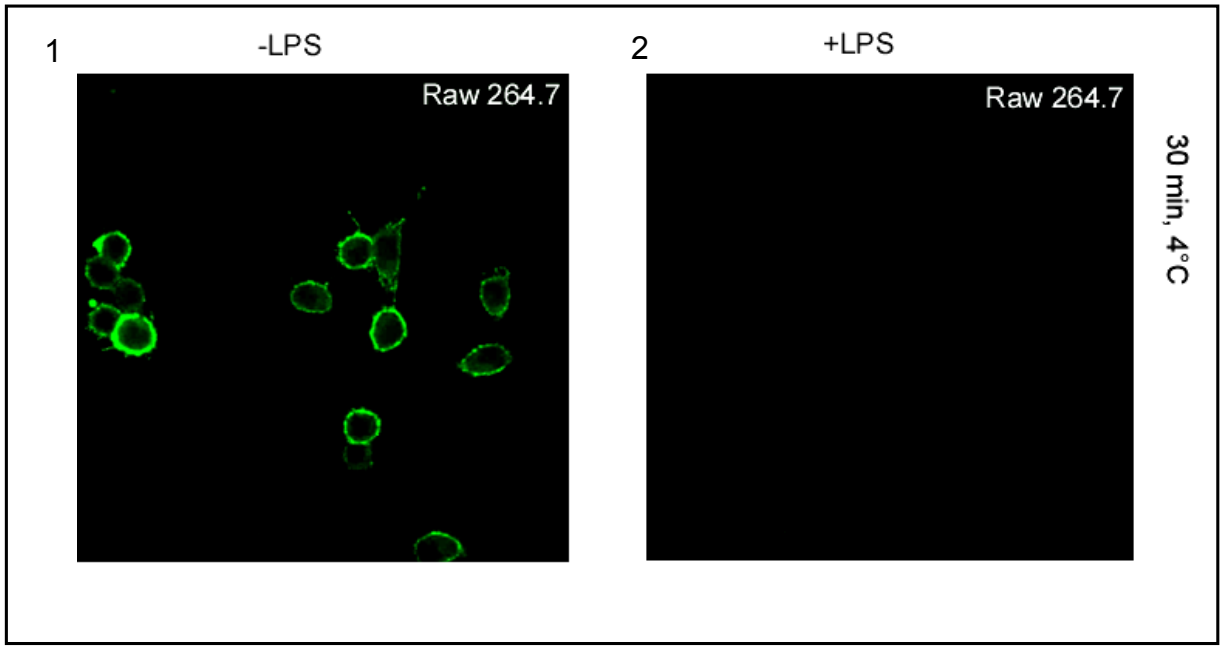

Abb.17: Nur LPS unstimulierte Raw264.7 Zellen binden Hsp70*. Raw264.7 Zellen wurden **(1)** vor und nach **(2)** LPS Stimulation mit fluoreszenz markiertem Hsp70 für 30 min bei 4°C inkubiert, gewaschen und im konfokalen Mikroskop analysiert.

Wie Abb. 17 deutlich zeigt, binden Raw264.7 Zellen im unstimulierten Zustand Hsp70, wohingegen nach LPS-Stimulation keine Hsp70 Anbindung zu beobachten

war. Daher wurden die Zellen mittels Immunoblot-Analyse auf ihre CD91-Expression hin untersucht. Gleiche Proteinmengen von Membranfraktionen der LPS behandelten und unbehandelten Raw264.7 Zellen wurden, unter Verwendung eines Antikörpers gegen die 80 kDa große Transmembran-Domäne, miteinander verglichen. Obwohl

nach LPS-Stimulation keine Anbindung von Hsp70 detektierbar war (vgl. Abb.17 rechts), wurde CD91 exprimiert (Abb.18).

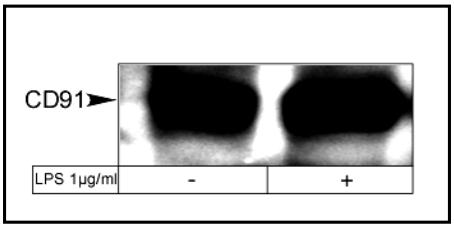

Abb.18: Raw264.7 Zellen zeigen im Immunoblot vor und nach LPS Stimulation eine CD91 Expression. In jeder Spur wurden gleiche Proteinmengen aufgetragen. Die Anfärbung erfolgte mit einem Antikörper gegen die 80 kDa Transmembran-Domäne von CD91.

Um unabhängig vom Expressionslevel funktionell exprimiertes CD91 auf der Zelloberfläche nachweisen zu können, wurden LPS stimulierte und unstimulierte Raw264.7 Zellen für 24h mit 1 µg/ml Exotoxin A behandelt.

Exotoxin A aus *Pseudomonas aerigunosa* ist ein bakterielles Toxin, welches durch ADP-Ribosylierung des intrazellulären Elongationsfaktors 2 die Proteinsynthese inhibiert. Die Aufnahme des Toxins erfolgt über CD91, d.h. Zellen, die funktionelles CD91 auf ihrer Zelloberfläche exprimieren, sterben innerhalb von 24h an diesem Zellgift.

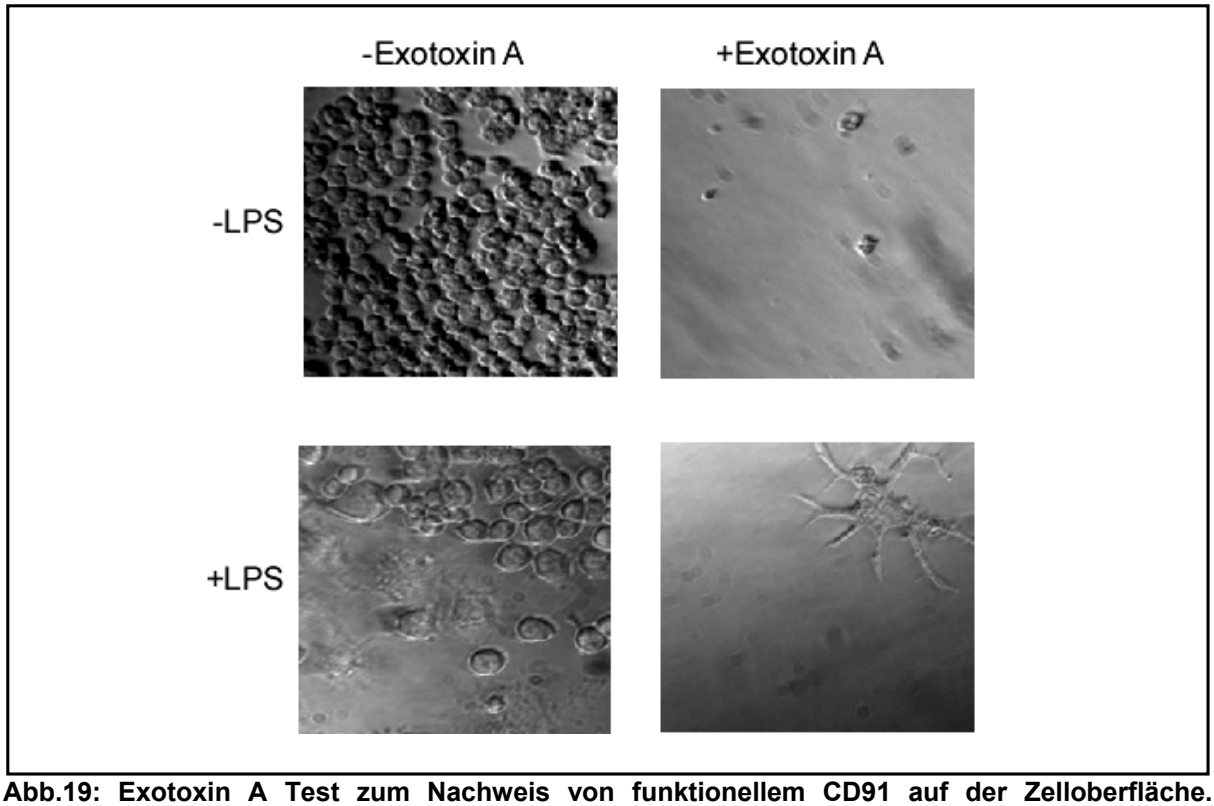

Abb.19: Exotoxin A Test zum Nachweis von funktionellem CD91 auf der Zelloberfläche. Raw264.7 Zellen wurden 24h mit 1µg/ml Exotoxin A behandelt. Exotoxin A behandelte und unbehandelte Zellen wurden nach 24h im Lichtmikroskop untersucht.

Sowohl LPS induzierte als auch nicht induzierte Raw264.7 starben nach Exotoxin A Behandlung (Abb. 19), und exprimierten daher funktionelles CD91 an ihrer Zelloberfläche. LPS stimulierte Raw264.7 zeigten jedoch trotz funktionellem CD91 keine Hsp70 Anbindung, obwohl für diese Zellen ursprünglich CD91 als Hsp70-Rezeptor postuliert wurde.

Des Weiteren sollte auch die als Negativ-Kontrolle veröffentlichte Raw309 Cr.1 hinsichtlich der Hsp70 Anbindung und CD91 Expression im stimulierten und unstimulierten Zustand untersucht werden. Hierfür wurden die gleichen experimentellen Untersuchungen wie für die Raw264.7 Zellen durchgeführt.

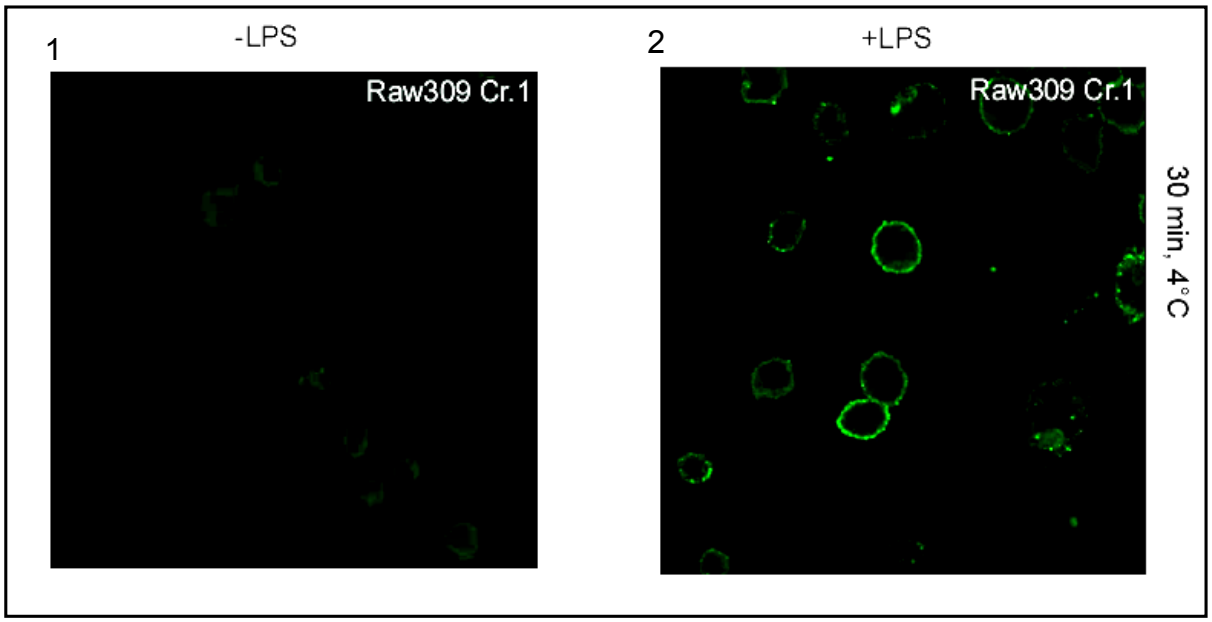

Abb.20: Nur LPS stimulierte Raw309 Cr.1 Zellen binden Hsp70*. Raw309 Cr.1 Zellen wurden vor **(1**) und nach **(2)** LPS Stimulation mit fluoreszenz markiertem Hsp70 für 30 min bei 4°C inkubiert, gewaschen und im konfokalen Mikroskop analysiert.

Wie deutlich in Abb. 20 zu erkennen ist, führt die Stimulation der Raw309Cr. 1 durch LPS zu einer Anbindung von Hsp70. Unstimulierte Raw309 Cr.1 Zellen zeigten hingegen keine signifikante Oberflächenanbindung von Hsp70.

Auch hier wurde die Expression von endogenem CD91 mittels Immunoblot und CD91-Antikörper analysiert.

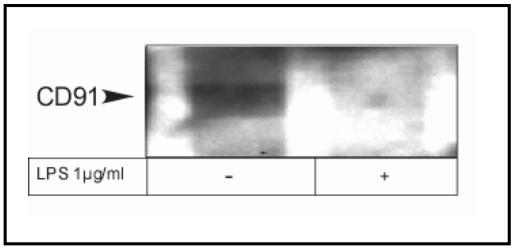

Abb.21: Raw309 Cr.1 Zellen zeigen im Immunoblot nur vor LPS Stimulation eine CD91 Expression.. In jeder Spur wurden gleiche Proteinmengen aufgetragen. Western Blot mit Antikörper gegen die 80 kDa Transmembran-Domäne von CD91.

Bei gleicher Menge an Membranfraktionen zeigten nur die unstimulierten Raw309 Cr.1 ein Signal für die CD91 Expression (Abb.21). Obwohl diese Zellinie in vorherigen Studien als Negativ-Kontrolle verwendet wurde, wird CD91 exprimiert. Die Funktionalität von CD91 auf LPS stimulierten und unstimulierten Raw264.7 Zellen wurde ebenfalls mit Hilfe des Exotoxin A Test überprüft (Abb.22).

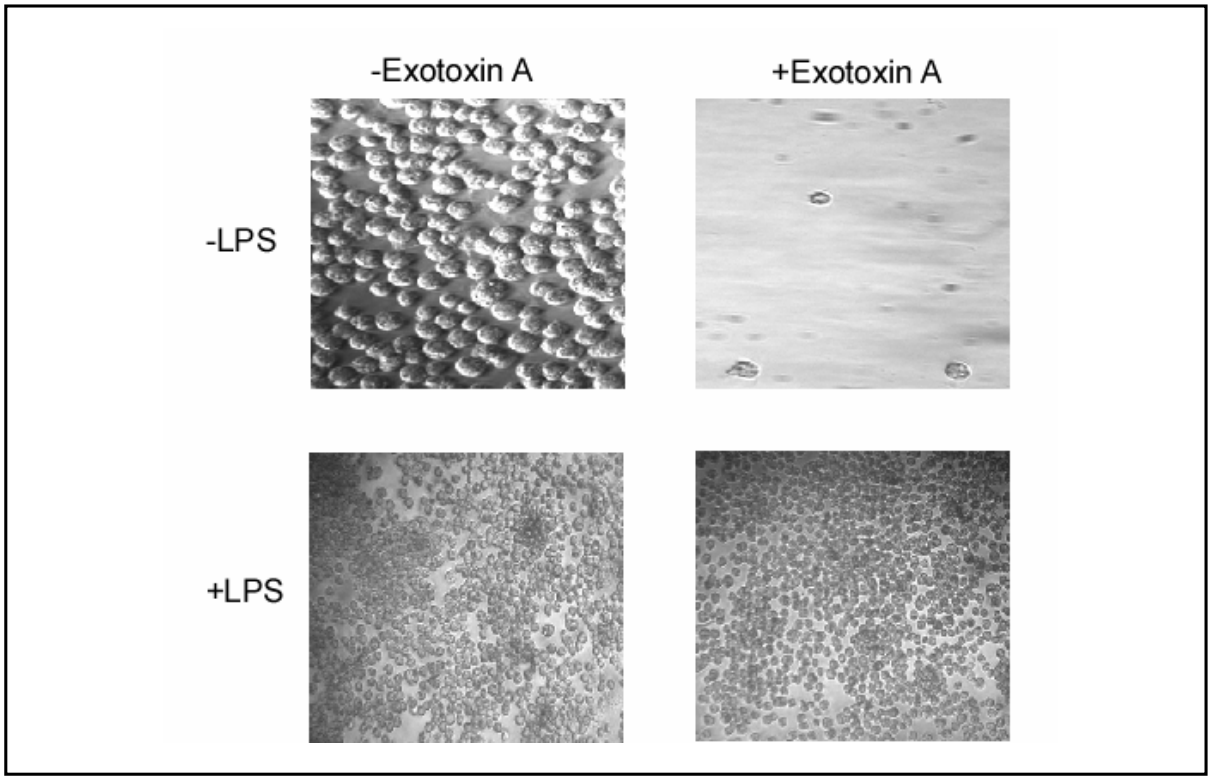

Abb.22: Exotoxin A Test zum Nachweis von funktionellem CD91 auf der Zelloberfläche. Raw309 Cr.1 Zellen wurden 24h mit 1µg/ml Exotoxin A behandelt. Exotoxin A behandelte und unbehandelte Zellen wurden nach 24h im Lichtmikroskop untersucht.

Durch Behandlung mit Exotoxin A starben unstimulierte Raw309 Cr.1 innerhalb von 24 h, was neben den Immunoblot-Analysen beweist, dass Raw309 Cr.1 Zellen funktionelles CD91 exprimierten. LPS behandelte Zellen wiesen hingegen auch nach 24 h keine Mortalität auf, wodurch der schon beobachtete Verlust an funktionellem CD91 bestätigt wurde. Trotz nicht nachweisbaren CD91 konnte jedoch eine Hsp70 Anbindung nach LPS-Stimulation beobachtet werden.

Um die vorherigen Ergebnisse zu untermauern, wurde als Kontrolle zum einen eine mit CD91 stabil tranzfizierte CHO (CHO+CD91) und zum anderen eine CHO Wildtyp (CHOwt) Zellinie verwendet. In beiden Fällen wurde die Hsp70 Anbindung untersucht (Abb.23), sowie die Immunoblot-Analyse (Abb.24) und der Exotoxin A Test (Abb.25) durchgeführt.

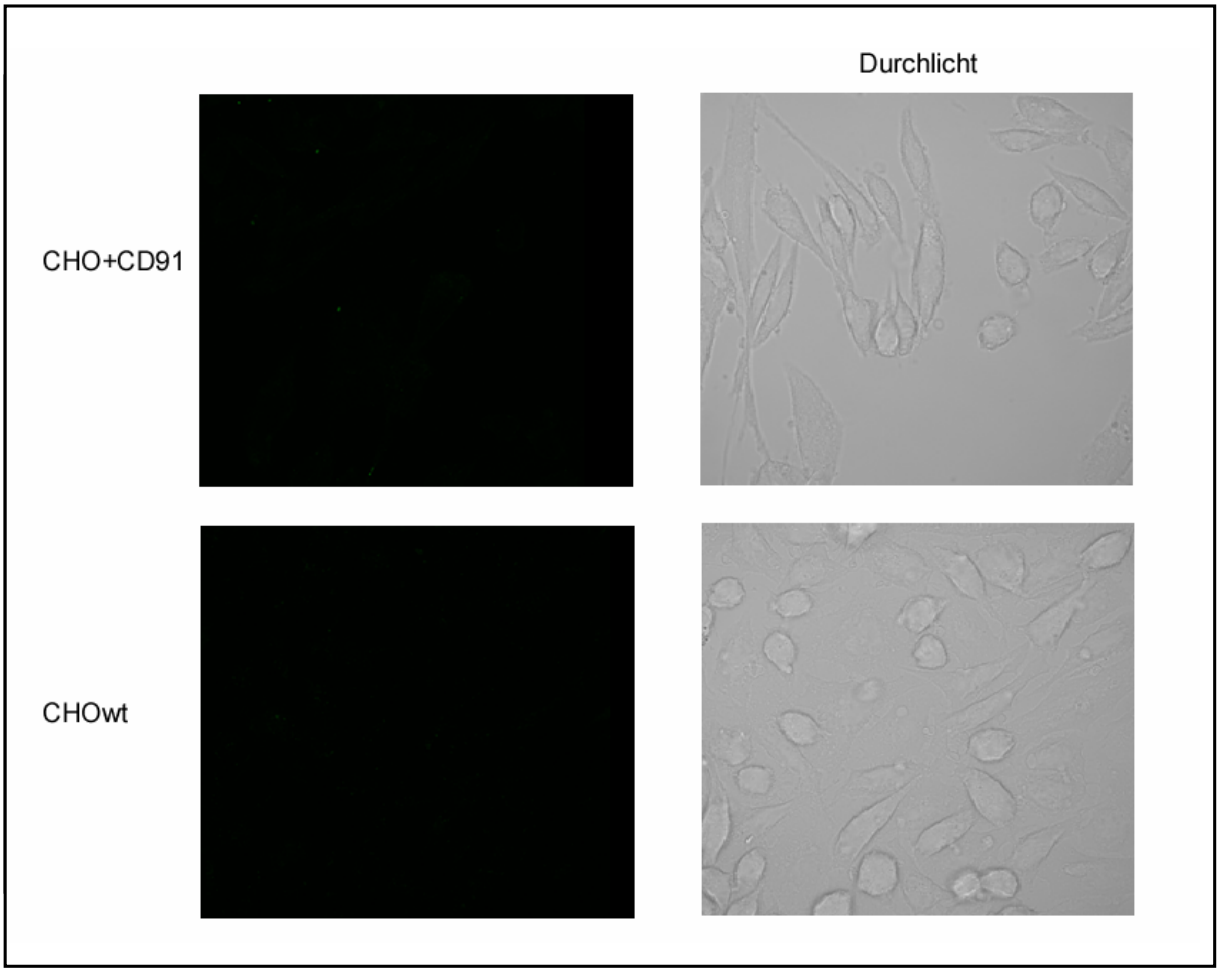

Abb.23: CHO+CD91 und CHOwt binden kein Hsp70*. CHO+CD91 und CHOwt Zellen wurden mit fluoreszenz markiertem Hsp70 für 30 min bei 4°C inkubiert, gewaschen und im konfokalen Mikroskop analysiert.

Wie in Abb.23 zu erkennen ist, findet weder mit CHO+CD91 noch mit CHOwt eine Hsp70 Anbindung statt.

Die Expression von CD91 wurde mittels Immunoblot- Analyse nachgewiesen (Abb.24).

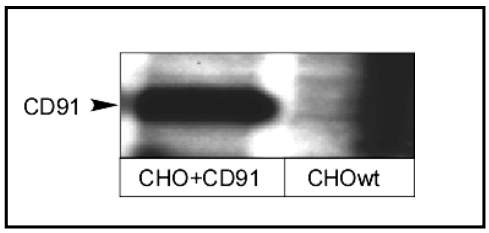

Abb.24: Nur CHO+CD91 exprimieren CD91 Zellen. In jeder Spur wurden gleiche Proteinmengen aufgetragen. Western Blot mit Antikörper gegen die 80 kDa Transmembran-Domäne von CD91.

Die Funktionalität von CD91 wurde anschließend mittels des Exotoxin A Test überprüft (Abb.25).

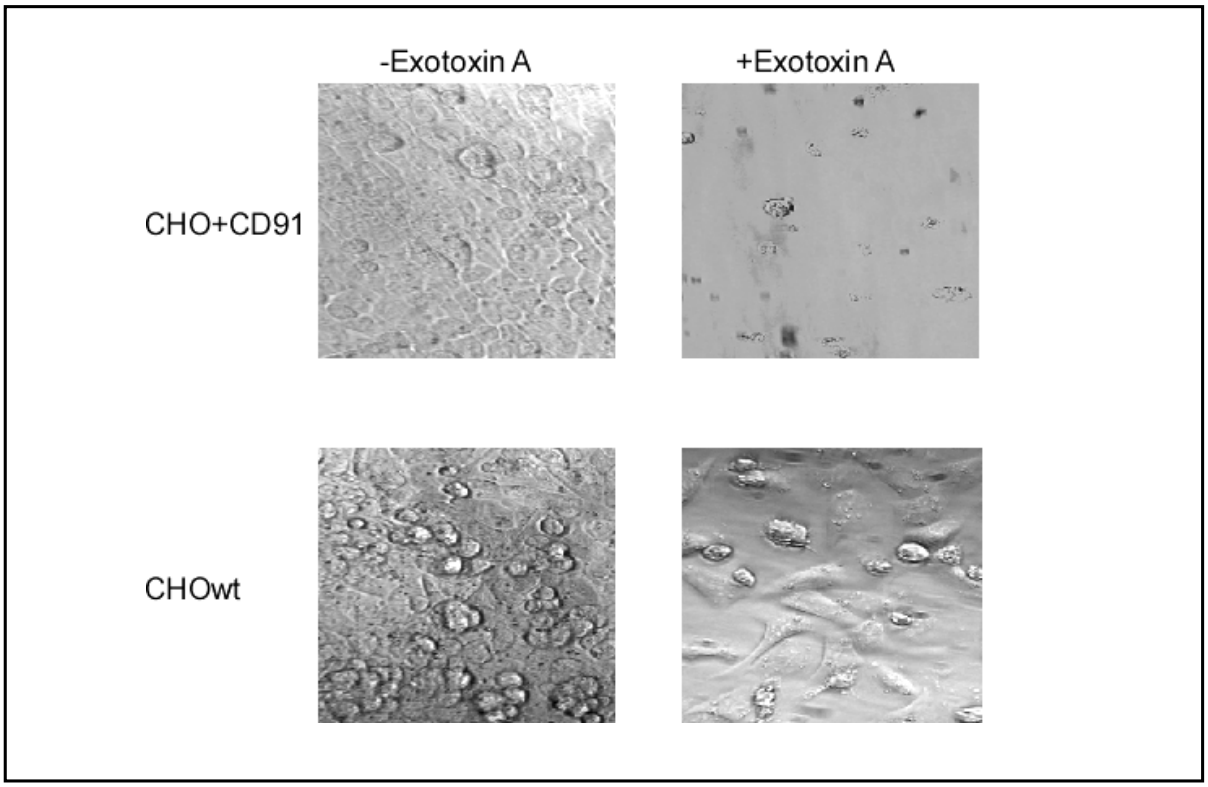

Abb.25: Exotoxin A Test zum Nachweis von funktionellem CD91 auf der Zelloberfläche. CHO+CD91 Zellen und CHOwt Zellen wurden 24h mit 1µg/ml Exotoxin A behandelt. Exotoxin A behandelte und unbehandelte Zellen wurden nach 24h im Lichtmikroskop untersucht.

Wie erwartet starben CHO+CD91, nicht jedoch CHOwt Zellen, innerhalb von 24h nach Exotoxin A Zugabe ab.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass Raw264.7 Zellen nach LPS Stimulation funktionelles CD91 exprimieren, aber ihre Fähigkeit, Hsp70 zu binden, verlieren, wohingegen stimulierte Raw309 Cr.1 Zellen Hsp70 binden, aber nachweislich kein funktionelles CD91 exprimieren. Die CHO-Kontrollzelllinien zeigten weder mit noch ohne CD91 Expression eine Hsp70 Anbindung.

Daher ist auszuschließen, das CD91 als alleiniger Rezeptor für die Anbindung und Aufnahme von Hsp70 dient.

3.3.2 LOX-1 und CD40 als Hsp70 Rezeptoren

In der Vergangenheit wurden eine Vielzahl von Rezeptoren für Hitzeschockproteine postuliert, wie z.B. der *Scavanger*-Rezeptor LOX-1, die *Toll-like* Rezeptoren (TLR) 2 und 4 sowie CD40 (Asea et al., 2002; Becker et al., 2002; Delneste et al., 2002). Um neben CD91 (vgl. 3.3.1) auch diese Rezeptoren auf eine Hsp70 Anbindung hin zu überprüfen wurden FACS-Analysen sowie Floureszenzmikroskopie mit Raw264.7 Makrophagen durchgeführt.

Stimuliert man primäre Makrophagen mit LPS, so wird die CD40 Expression massiv hochreguliert (Benveniste et al., 2004). Dieser Effekt wurde zur Untersuchung der putativen CD40-Hsp70 Interaktion genutzt. Dazu wurden Raw264.7 Zellen mit 1 µg/ml LPS für 16h stimuliert und im Vergleich zu unstimulierten Zellen auf die Oberflächenexpression von CD40 hin untersucht (Abb.26).

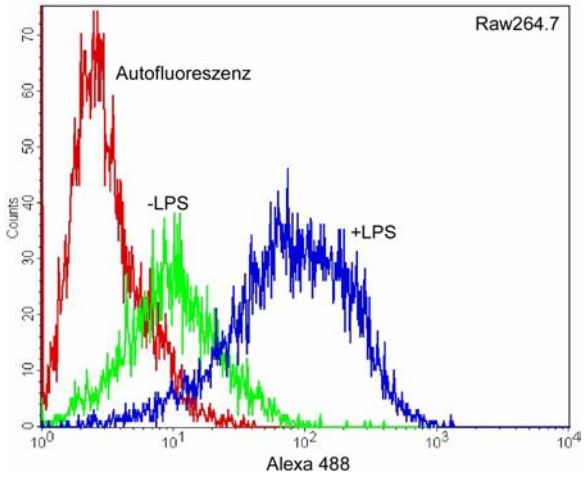

Abb.26: CD40 wird in Raw264.7 Makrophagen nach LPS Stimulation massiv hochreguliert. FACS-Analyse an Raw264.7 Zellen mit einem polyklonalen Primärantikörper gegen CD40 und einem Alexa 488 markiertem Sekundärantikörper.

Abb. 26 zeigt eine erhöhte Expression von CD40 auf der Oberfläche von Raw264.7 Makrophagen nach LPS Behandlung. Allerdings hat dies keinen positiven Einfluss auf die Anbindung von Hsp70* (Abb. 27, rechtes Bild). Im Gegenteil dazu binden nur unstimulierte Zellen Hsp70 (Abb.27, linkes Bild), wohingegen LPS stimulierte Zellen die Fähigkeit Hsp70* zu binden verlieren.

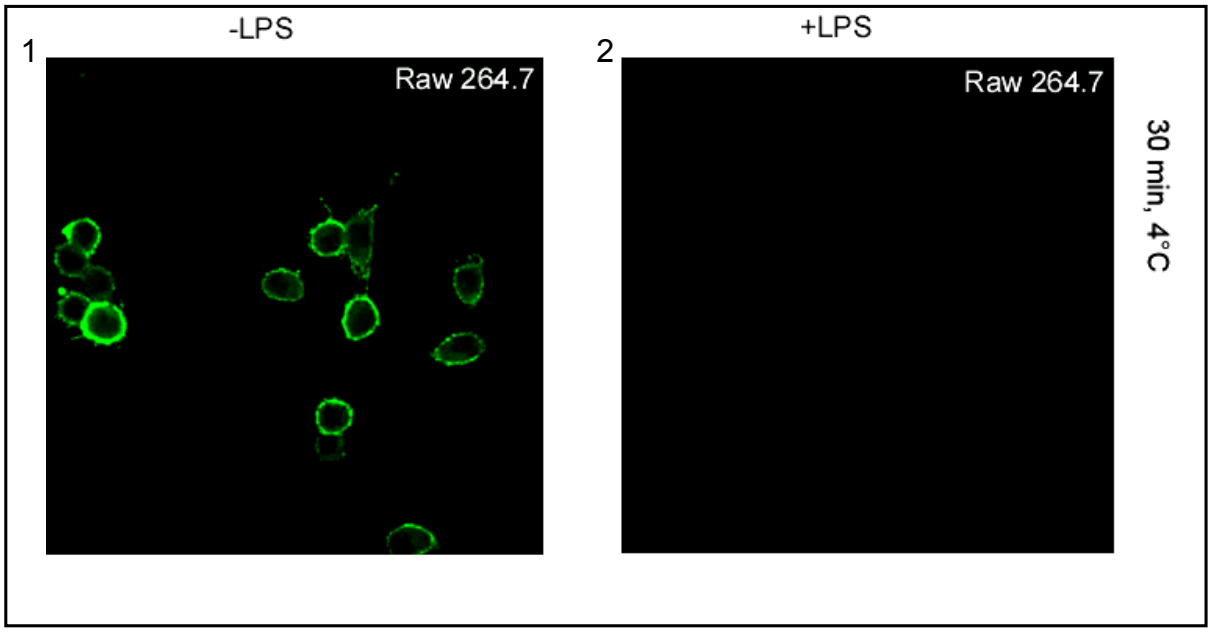

Abb.27. Nur LPS unstimulierte Raw264.7 Makrophagen binden Hsp70*. (1) unstimulierte Raw264.7 Zellen mit gebundenem Hsp70*. **(2)** LPS stimulierte Raw264.7 Zellen mit gebundenem Hsp70*. Die Dokumentation erfolgte mittels konfokaler Mikroskopie.

Darüber hinaus wurden in Kompetitionsexperimenten entsprechende spezifische Liganden oder Antikörper eingesetzt. Im Falle des CD40 war dies ein affinitätsgereinigter Peptid-Antikörper, der jedoch weder auf die Anbindung der N-Domäne (Abb. 28 A, oben) noch der C-Domäne (Abb.28 B, oben) Einfluss hatte. Für LOX-1 wurden die Liganden Poly I und Poly A verwendet (Delneste et al., 2002), wobei für Poly I eine Inhibition der Hsp70 Anbindung an humanen Dendriten und Makrophagen von bis zu 94% gezeigt wurde.

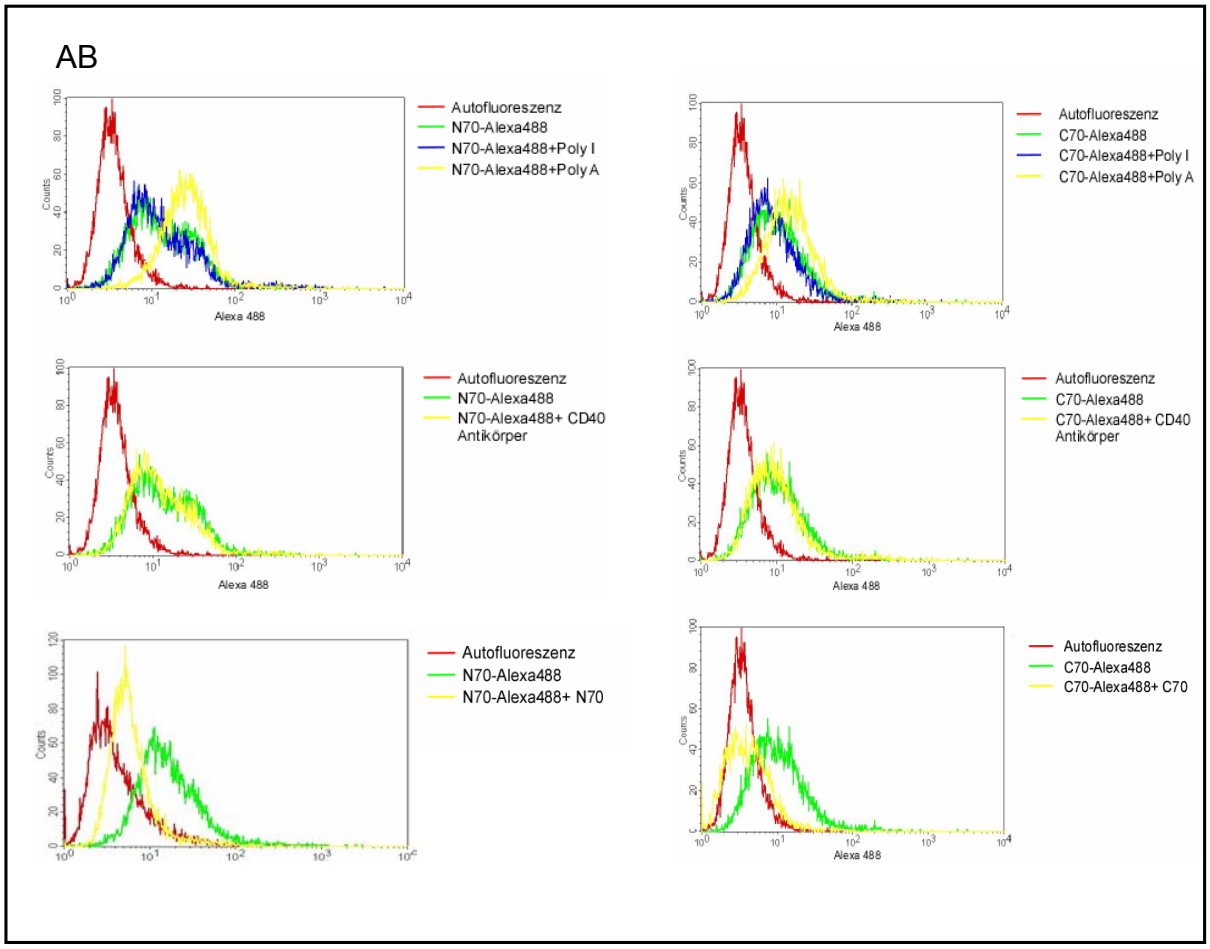

Abb.28: FACS-Analyse von Raw264.7 Makrophagen in Gegenwart von spezifischen Liganden. Je 5x 10^5 Raw264.7 Zellen wurden mit und ohne Poly A, Poly I (oben), CD40 Antikörper (mitte) oder unmarkiertem N70 bzw. C70 (unten) für 30 min bei 4°C inkubiert und gewaschen. Anschließend wurden die Zellen für weitere 30 min mit Alexa 488 markiertem N70 **(A)** bzw. C70 **(B)** inkubiert und mittels FACS analysiert.

Die FACS Analyse zeigt, dass keine Verdrängung, sowohl von der N70 als auch der C70 Domäne, durch den LOX-1 spezifischen Liganden Poly I, stattfindet. Jedoch fand in Gegenwart von Poly A eine Verstärkung der N70 Anbindung, und in weitaus geringerem Ausmaß (Abb. 28 A+B; Mitte) auch der C70 Anbindung, statt. Ein Überschuss an unmarkierten Untereinheiten führte, wie schon gezeigt, zur Blockierung der jeweiligen Anbindung (Abb. 28 A+B; unten).

3.4 Anbindung und Aufnahme von Hsp70-Peptid Komplex

Um die Funktionalität der Hsp70-Bindung in Bezug auf die Domänen zu untersuchen, wurde mittels konfokaler Mikroskopie die Aufnahme von Peptid beladenem Hsp70 und C70 sowie von N70 verfolgt.

Das verwendete antigene Peptid OvaBiP wurde mit einem N-terminalen FITC Farbmolekül synthetisiert (Dr. Pipkorn, DKFZ). Da Hsp70 mit hoher Affinität kurze hydrophobe Abschnitte mit einer "*extended conformation"* bindet, würde das zu präsentierende antigene Peptid SIINFEKL (Aminosäuren 257-264 aus Ovalbumin), aufgrund der fehlenden Hydrophobizität, so nicht gebunden werden. Aus diesem Grund wurde ein Hybrid-Peptid mit einer AS Sequenz des Chaperons BiP hergestellt, von dem bekannt ist, dass sie eine hohe Affinität gegenüber Hsp70 aufweist. Dieses Octapeptid (bez. als BiP) ist N-terminal über einen GSG Linker mit SIINFEKL verbunden (SIINFEKLGSGWPWAFDWH=OvaBiP). Für die darauf folgenden Untersuchungen der Kreuzpräsentation wurde humanes Hsp70 oder C70 in vitro mit diesem synthetischen Peptid beladen, wobei nur das Ovalbumin-Octapeptid SIINFEKL auf MHC-Klasse I (H-2k^b bei der Maus) präsentiert wird. Unter Kreuzpräsentation (*cross presentation*) versteht man die unkonventionelle Aktivierung zytotoxischer T-Zellen durch zelluläre, exogene Antigene, welche von APC aufgenommen, prozessiert und auf MHC-I Molekülen präsentiert werden (Arnold-Schild et al., 1999; Heath and Carbone, 1999; Rock and Shen, 2005).

3.4.1 Die Aufnahme von beladenem Hsp70 und C70 erfolgt schnell und effizient

Um zu untersuchen, ob die beobachteten Bindungseigenschaften von Hsp70 von funktioneller Relevanz sind, wurde zunächst 3 µM Hsp70* mit einem 20 fachen Überschuss an FITC-markiertem OvaBiP für 45 min bei 37°C beladen. Nach dem Standard-Bindungsassay wurden Raw264.7 Zellen mit dem Hsp70*-OvaBiP

Komplex inkubiert. Abb. 29 (oben) zeigt ein über die Zelloberfläche homogen verteiltes Signal für Hsp70* und ein punktiertes Muster für das Peptid. Folglich binden Raw264.7 Zellen sowohl unbeladenes Hsp70 als auch den Hsp70-Peptid-Komplex, wobei die Anbindung von beladenem Hsp70 auf bestimmte Bereiche der Zelloberfläche begrenzt ist.

Eine Erhöhung der Temperatur auf 37°C für 2 min führt zu einer vollständigen Aufnahme sowohl des Hsp70-Komplexes als auch des unbeladenen Hsp70. Dabei zeigt sich eine Trennung zwischen beladenem und unbeladenem Hsp70, wobei das Peptidsignal perinuklear/retikulär und unbeladenes Hsp70 peripher in vesikulären Strukturen lokalisierte (Abb. 29; unten).

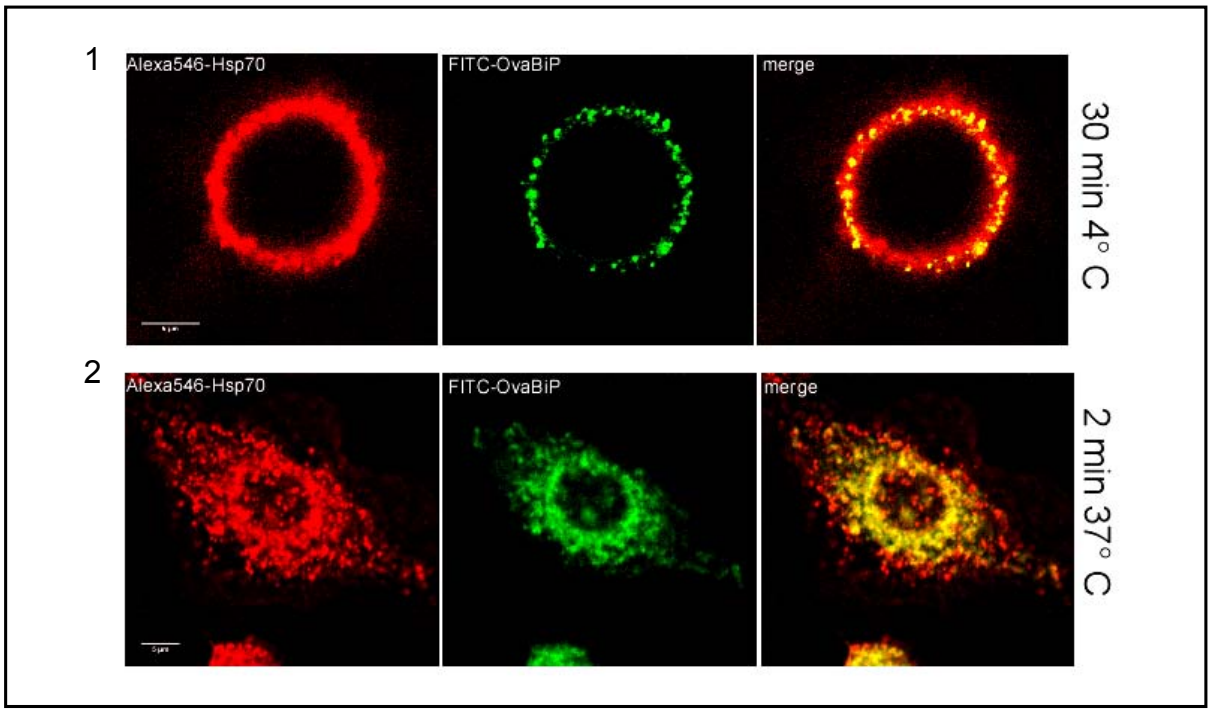

Abb.29: Beladenes und unbeladenes Hsp70 bindet und wird von Raw264.7 Makrophagen aufgenommen. (1) Raw264.7 Zellen wurden mit Hsp70*-OvaBiP Komplex für 30 min bei 4°C inkubiert, gewaschen und mittels konfokaler Mikroskopie analysiert. **(2)** Internalisierung von unbeladenem und beladenem Hsp70* bei 37°C nach 2 min.

Um die Anbindung und Aufnahme von beladenem C70 zu untersuchen, wurden Raw 264.7 Zellen mit 3 µM C70*-OvaBiP*-Komplex für 30 min bei 4°C inkubiert. Nicht gebundenes Protein wurde durch Waschen entfernt und ein Teil der Probe, zum Nachweis der Bindung von C70*-Peptid-Komplex an die Zelloberfläche, fixiert. Der andere Teil wurde für 2 min auf 37°C erwärmt, fixiert und im konfokalen Mikroskop untersucht.

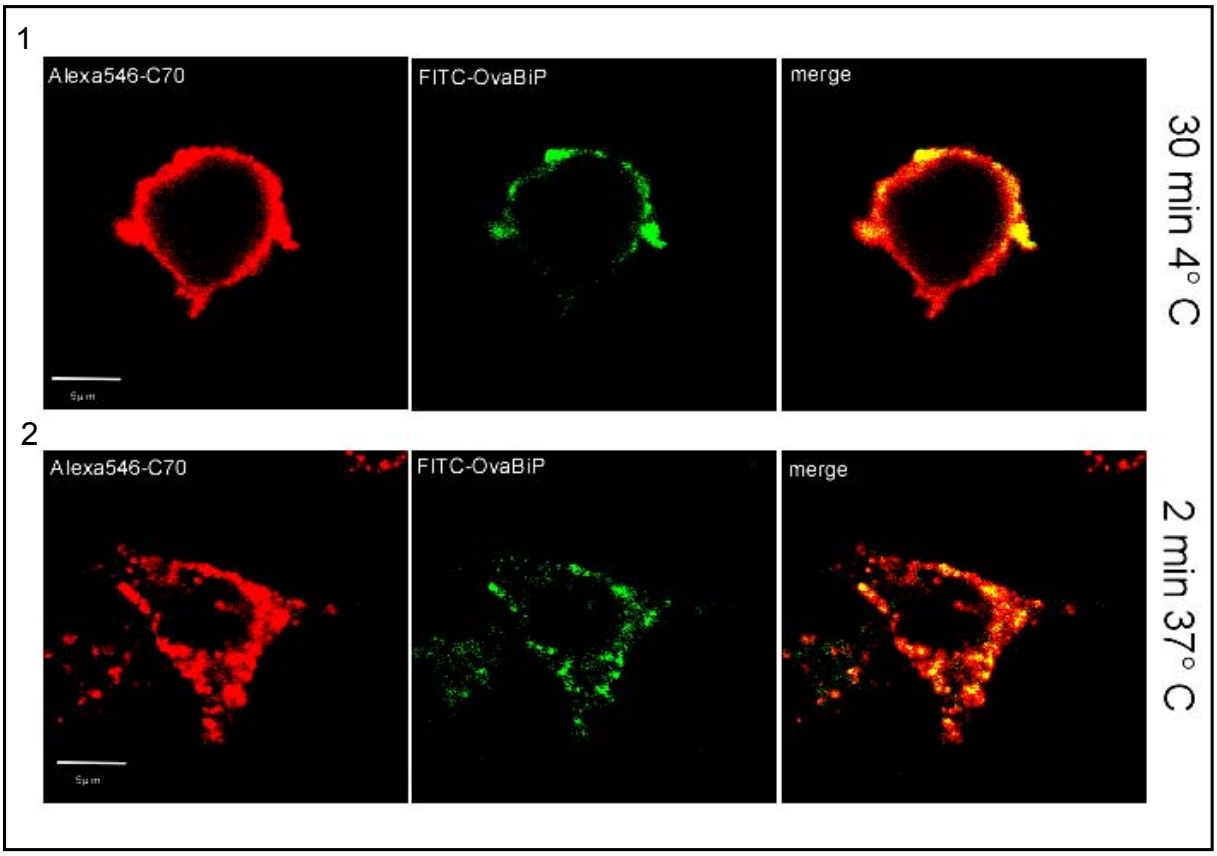

Abb.30: Beladenes und unbeladenes C70 bindet und wird von Raw264.7 Makrophagen aufgenommen. (1) Raw264.7 Zellen wurden mit C70*-OvaBiP Komplex für 30 min bei 4°C inkubiert, gewaschen und und mittels konfokaler Mikroskopie analysiert. (2) Internalisierung von unbeladenem und beladenem C70* bei 37°C nach 2 min.

Nach der Anbindung bei 4°C für 30 min konnte eine über die Zelloberfläche inhomogene Verteilung von C70* beobachtet werden (Abb.30; oben). Auffällig ist hier, dass das Peptidsignal nur in bestimmten Bereichen der Zelloberfläche zu finden ist. Demnach binden Raw264.7 Zellen sowohl unbeladenes C70 als auch C70*-Peptid Komplex, wobei die Anbindung von beladenem C70 auf bestimmte Bereiche der Plasmamembran begrenzt ist.

Für die Aufnahme von beladenem C70* wurden die Zellen nach Anbindung auf 37°C erwärmt. Entsprechend den Ergebnissen mit Hsp70 zeigt Abb. 30 (unten), dass 2 min ausreichen, um sowohl unbeladenes als auch beladenes C70 aufzunehmen.

3.4.2 Auch die ATPase Domäne von Hsp70 wird schnell internalisiert

Für die Anbindung und Aufnahme von N70, wurden Raw264.7 Zellen in Gegenwart von Alexa 488 markiertem N70 für 30 min bei 4°C inkubiert. Anschließend wurde ein Teil der Zellen fixiert, und auf die Zelloberflächenanbindung hin untersucht (Abb.31; links). Der andere Teil der Zellen wurde für 2 min auf 37°C erwärmt, fixiert und im konfokalen Mikroskop analysiert (Abb. 31; rechts).

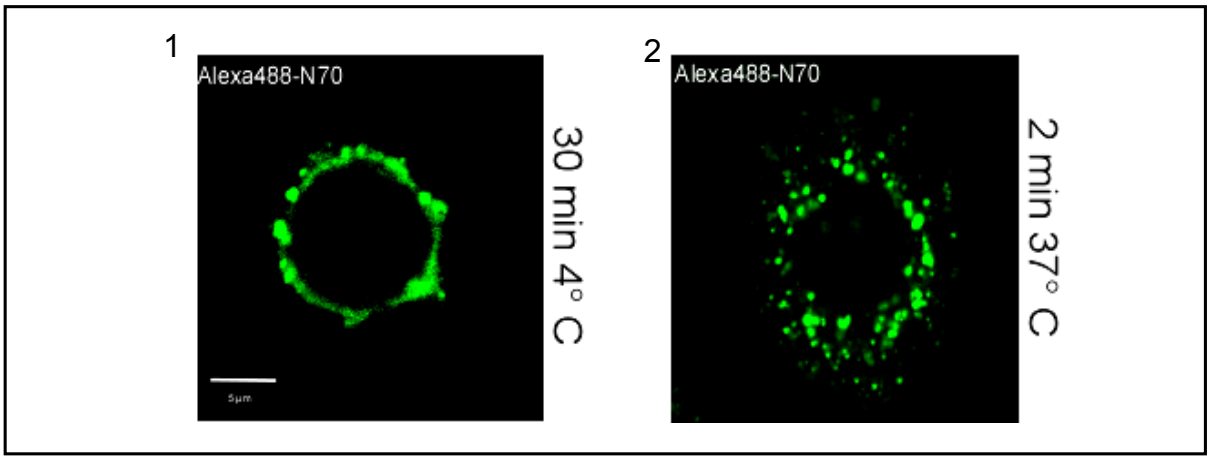

Abb.31: Auch N70* bindet und wird von Raw264.7 Zellen aufgenommen.
(1) Anbindung von Alexa 488 markiertem N70 an Raw 264.7 Zellen für 30 min bei 4°C. (2) Aufnahme von N70- Alexa488 bei 37°C nach 2 min. Die Dokumentation erfolgte mittels konfokaler Mikroskopie.

Die Anbindung von N70 verteilt sich punktuell über die ganze Zelloberfläche, wobei innerhalb einer Zelle teilweise eine starke Konzentrierung der Anbindung auf einen Bereich zu beobachten war. Nach Erwärmen auf 37°C für 2 min lokalisiert N70 peripher in vesikulären Strukturen.

3.4.3 Hsp70 assoziiertes Peptid lokalisiert in PDI und Rab5 positiven Strukturen

In verschiedene Arbeiten wurde gezeigt, dass Chaperone wie Hsp70 mittels Rezeptor an die Oberfläche von antigenpräsentierenden Zellen binden können (Arnold-Schild et al., 1999; Sondermann et al., 2000). Hinweise auf eine Rezeptor vermittelte Endozytose des Hsp70-Peptid Komplexes lieferte die Arbeit von Castellino et al (2000). Demnach findet die Prozessierung und Präsentation von an Hsp70 assoziertem Antigen auf MHC-Klasse I über zwei intrazelluläre Wege statt, wobei diese über die Peptidsequenz determiniert werden (Castellino et al., 2000).
Des Weiteren können Makrophagen und dendritische Zellen (Phagozyten) Pathogene über Phagozytose aufnehmen. Das gebundene Pathogen wird zuerst von der Membran des Phagozyten umhüllt und dann Clathrin-unabhängig in einem Vesikel aufgenommen, das man als Phagosom bezeichnet (Desjardins et al., 1994; Touret et al., 2005). In jüngster Zeit wurden bei der Aufreinigung von Phagosomen Proteine aus dem Endoplasmatischen Retikulum (ER) identifiziert. Aufgrund dieser Daten wurde ein Modell der Phagozytose aufgestellt, welches eine direkte Interaktion und Verschmelzung von ER mit der Plasmamembran postuliert (Desjardins and Griffiths, 2003; Gagnon et al., 2002).
Auch bei der Aufnahme extrazellulärer Flüssigkeiten mittels Makropinozytose durch antigenpräsentierende Zellen wird eine direkte Wechselwirkung mit dem ER vermutet. (Ackerman et al., 2005; Watts and Amigorena, 2000).
Da das verwendete FITC-markierte Peptid OvaBip schon nach 2 min in retikulären Strukturen lokalisierte (vgl. 3.4.1), wurde auch für die Hsp70 vermittelte Aufnahme eine Beteiligung des Endoplamatischen Retikulums (ER) postuliert. Infolgedessen wurden Kolokalisationsexperimente mit Antikörpern gegen Markerproteine verschiedener Zellorganellen durchegführt, welche den intrazellulären Weg des Hsp70-Peptid-Komplexes charakterisieren sollten.
Um die frühen Ereignisse der Aufnahme besser darzustellen, wurde zunächst die Aufnahme von Hsp70*-OvaBiP* Komplex bei 19°C mittels Immunfluoreszenz am konfokalem Mikrokskop analysiert. Hierfür wurden Standard-Bindungsassays an

Raw264.7 Zellen mit Alexa 546 markiertem Hsp70-FITC-OvaBiP Komplex durchgeführt. Nicht gebundenes Protein wurde durch waschen entfernt und die Zellen für unterschiedliche Zeiten (2min, 15 min) in 19°C warmen Medium inkubiert. Nach Methanol Fixierung und Permeabilisierung wurde eine Kolokalisation mit Rab5, einem Marker für frühe Endosomen, durchgeführt.
Die unterschiedlichen Lokalisationen von Hsp70 sowie Hsp70*-OvaBiP* Komplex wurden dabei wie folgt hervorgehoben: gelbe Pfeilspitze: dreifache Kolokalisation (Hsp70, Peptid, Rab5); weiße Pfeilspitze: Hsp70* alleine (unbeladen).

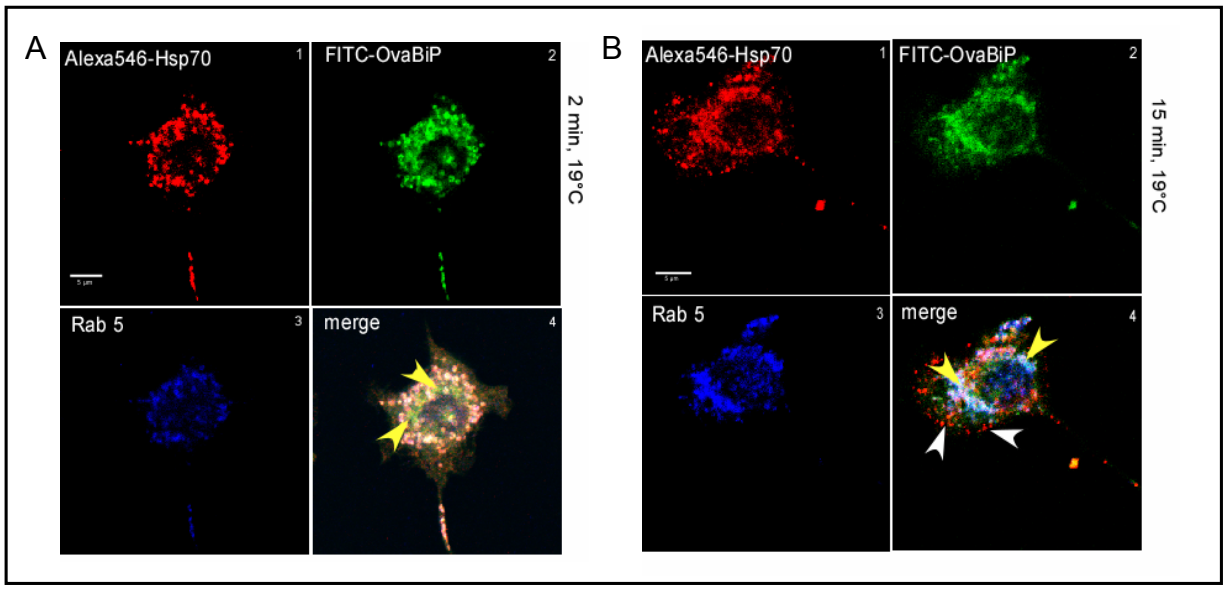

Abb.32: Hsp70-OvaBiP lokalisiert in frühen Endosomen. Raw264.7 Zellen wurden nach Anbindung mit Hsp70*-OvaBiP* Komplex für die angegebenen Zeiten bei 19°C inkubiert und mit α Rab 5 (frühes Endosomen) im konfokalen Mikroskop analysiert. **(A)** Aufnahme nach 2 min. **(B)** Aufnahme nach 15 min

Wie in Abb.32 (links) zu sehen ist, wird der Hsp70*-OvaBiP* Komplex bei 19°C schon nach 2 min aufgenommen. Dabei ist eine Kolokalisation (gelbe Pfeilspitze) von Hsp70*-OvaBiP* Komplex mit Rab 5 in vesikulären Strukturen zu beobachten, was eine Lokalisation des Komplexes in frühen endosomalen Strukturen vermuten lässt.
Nach 15 min (Abb.32; rechts) kann eine Trennung von beladenem und unbeladenem (weiße Pfeilspitze) Hsp70 beobachtet werden. Beladenes Hsp70 (gelbe Pfeilspitze) ist weiterhin in endosomalen Kompartimenten lokalisiert, wohingegen unbeladenes Hsp70 in peripher lokalisierten vesikulären Strukturen zu beobachten ist.

In einer weiteren Serie von Experimenten soll eine mögliche Involvierung des ER`s bei der Hsp70*-OvaBiP* Aufnahme untersucht werden. Hierzu wurde der Hsp70*-OvaBiP* Komplex an Raw264.7 Zellen gebunden, nicht gebundenes Protein entfernt, und für unterschiedliche Zeiten (2min, 10min, 20min) auf 19°C erwärmt. Anschließend wurden die Zellen mit Methanol fixiert und der ER Marker PDI (Protein-Disulfid- Isomerase) mittels Immunfluoreszenz dargestellt (Abb. 33).

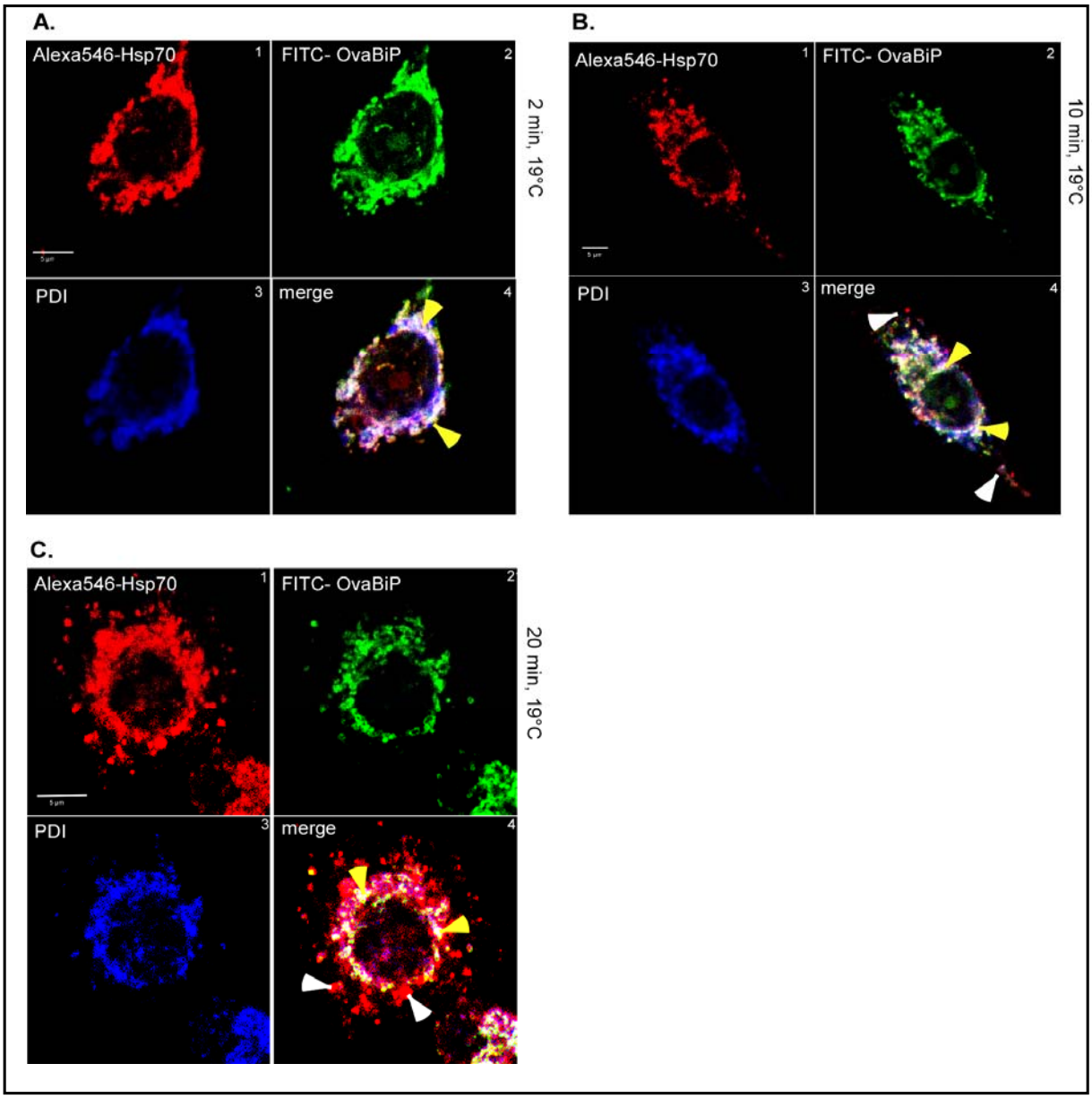

Abb.33: Beladenes Hsp70 kolokalisiert mit dem ER. Raw264.7 Zellen wurden nach Anbindung mit Hsp70*-OvaBiP* Komplex für die angegebenen Zeiten bei 19°C inkubiert, fixiert und PDI (Protein-Disulfid- Isomerase) als ER Marker immunohistologisch markiert Der Primärantikörper α PDI wurde mittels eines Alexa 633 markiertem Sekundärantikörpers detektiert. **(A**) Aufnahme vom Hsp70*-OvaBiP* Komplex mit Kolokalisation von PDI nach 2 min. **(B**) Aufnahme vom Hsp70*-OvaBiP* Komplex mit Kolokalisation von PDI nach 10 min. **(C)** Aufnahme vom Hsp70*-OvaBiP* Komplex mit Kolokalisation von PDI nach 20 min.

Interessanterweise zeigt beladenes Hsp70 nach 2 min bei 19°C (Abb.33 A) eine fast vollständige Kolokalisation (gelbe Pfeilspitze) mit dem ER-Marker PDI.
Nach weiteren 8 min (Abb.33 B) ist eine nur schwache Abnahme der Kolokalisierung von beladenem Hsp70 mit diesen Strukturen zu beobachten, was darauf hindeutet, dass ein großer Teil von beladenem Hsp70 sich nach 10 min noch in einem Endosomen-ER-Mischkompartiment befindet (gelbe Pfeilspitzen). Die Anzahl punktförmiger vesikulärer Strukturen von unbeladenem Hsp70 (rot; weiße Pfeilspitzen) außerhalb dieses Kompartiments steigt jedoch leicht. Die Lokalisation von unbeladenem Hsp70 innerhalb dieser Strukturen ist auch nach 10 min noch deutlich zu beobachten. Wobei auch Bereiche frei von unbeladenem und beladenem Hsp70 zu finden sind.
Der Anteil an unbeladenem Hsp70 in vesikulären Strukturen steigt nach 20 min (Abb.33 C) stark an (weiße Pfeilspitze). Nur ein geringer Teil von unbeladenem Hsp70 lokalisiert noch in PDI positiven Strukturen.

3.4.4 Unbeladenes Hsp70 wandert in die Lysosomen

Um den Internalisierungsweg von unbeladenem Hsp70 zu untersuchen, wurde nach Anbindung von Alexa 546 markiertem Hsp70 Raw264.7 Zellen für 20 min bei 37°C in Gegenwart von LysoTracker, einem Marker für Lysosomen, inkubiert (Abb.34).

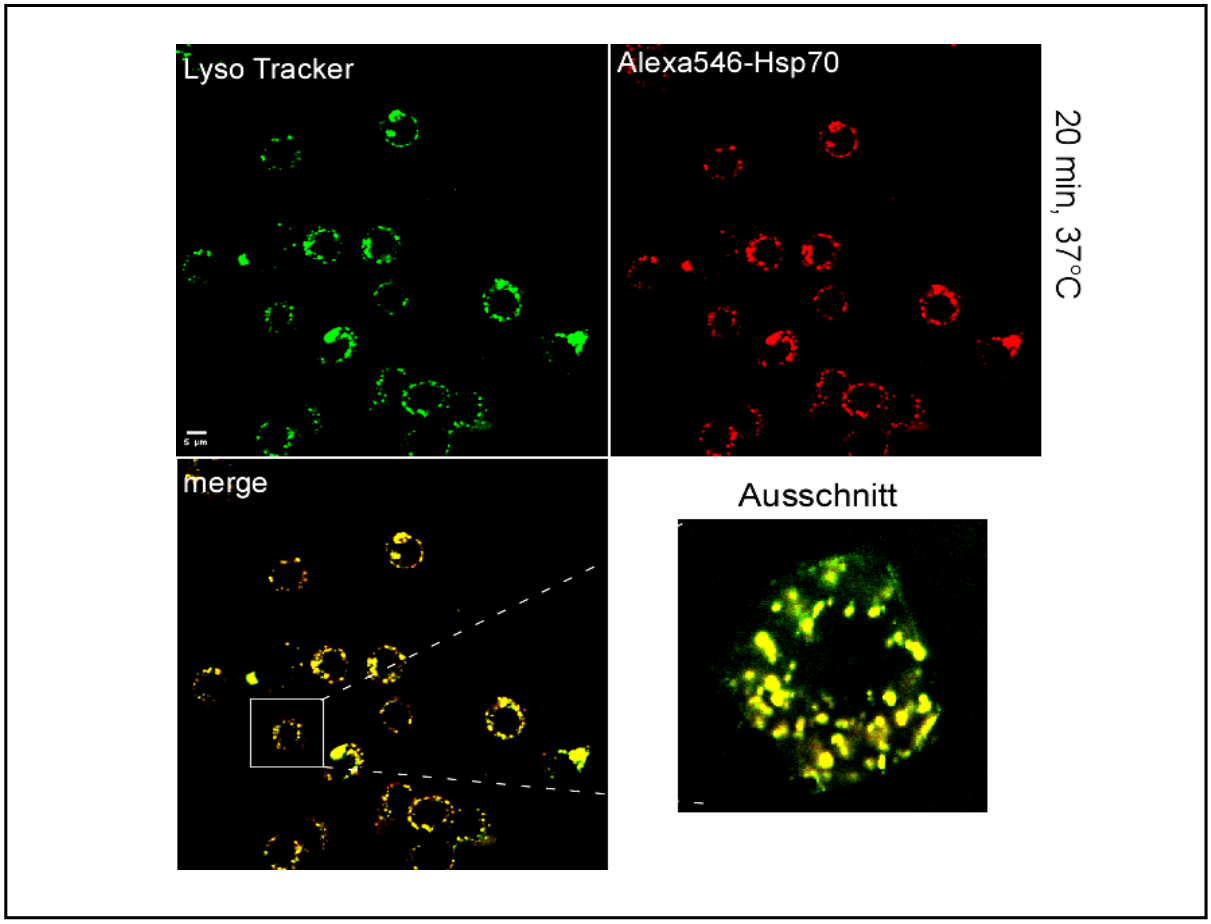

Abb.34: Unbeladenes Hsp70 wandert in Lysosomen. Raw264.7 Zellen wurden nach Anbindung mit Hsp70* für 20 min in Gegenwart eines LysoTrackers, einem Marker für Lysosomen, bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen fixiert und im konfokalen Mikroskop analysiert.

In Abb.34 ist die Lokalisation von unbeladenem Hsp70 unter normalen Bedingungen (37°C) gezeigt. Es wird deutlich, dass nach 20 min bereits sämtliches aufgenommene unbeladene Hsp70 in lysosomalen vesikulären Strukturen zu finden ist (gelbe Farbe durch die Überlagerung von rotem und grünen Kanal).

3.4.5 Sowohl Hsp70- als auch C70-assoziiertes Peptid wird kreuzpräsentiert

In einer weiteren Serie von Experimenten sollte untersucht werden, ob die beobachtete Aufnahme von Hsp70-Komplex zur Kreuzpräsentation des antigenen Peptid OvaBiP führt. Als *read-out* System wurde die $CD8^+$ T-Zell Hybridom Zelllinie B3Z verwendet. Diese T-Zellen exprimieren ß-Galaktosidase unter Kontrolle des Tanskriptionsfaktor NFAT. NFAT wiederum wird exprimiert, wenn den B3Z-Zellen das OvaBiP-Peptid SIINFEKL spezifisch in Kontext von MHC-Klasse I Molekülen präsentiert wird.

Die Expression von ß-Galaktosidase kann durch Zugabe von chromogenen Substraten detektiert werden. In Kooperation mit Alice Levin (MPI in Martinsried) wurde die Funktion der Hsp70 vermittelten Antigenpräsentation an dendritischen Zellen (D2.4) untersucht.

Hsp70 wurde mit OvaBiP beladen und freies Peptid mit Hilfe einer Gelfiltration abgetrennt. D2.4 Zellen wurden mit dem Hsp70-OvaBiP Komplex für 30 min bei 4°C inkubiert, gewaschen und für weitere 4h mit B3Z Zellen coinkubiert. Anschließend wurden die Zellen lysiert und die Aktivität der ß-Galaktosidase bestimmt (Abb.35).

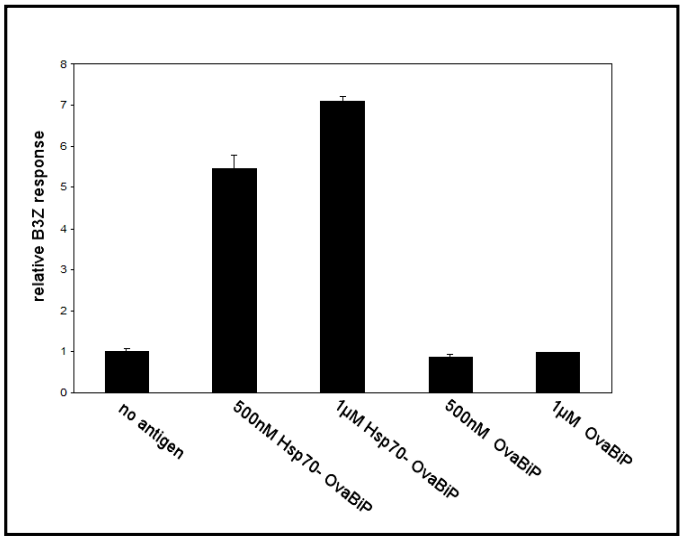

Abb.35: Das an Hsp70 assoziierte OvaBiP wird effektiv kreuzpräsentiert. D2.4 Zellen wurden mit steigender Menge an Hsp70-Ova-BiP Komplex für 30 min bei 4°C inkubiert für 4h in Gegenwart von B3Z-Zellen coinkubiert. Die Kreuzpräsentation von SIINFEKL wurde anhand der ß-Galaktosidase Aktivivität quantifiziert. Als Kontrolle wurden steigende Mengen an freiem OvaBiP verwendet. (N=3)

Es wurde beobachtet, dass dendritische Zellen das Antigen nur nach Aufnahme mit Hsp70 effektiv auf MHC Klasse I Molekülen den T-Zellen präsentieren. Dagegen führte freies Peptid zu keiner signifikanten Antigenpräsentation.
Um zu testen, ob auch die Substrat-bindende Domäne (C70) von Hsp70 alleine als *Adjuvans* für die Kreuzpräsentation ausreicht, wurde diese, wie in Material und Methoden beschrieben, mit OvaBiP beladen und mit D2.4 Zellen inkubiert. Mithilfe des B3Z- Reporter Systems wurde anschließend die C70 vermittelte Kreuzpräsentation von SIINFEKL auf MHC Klasse I Molekülen analysiert.

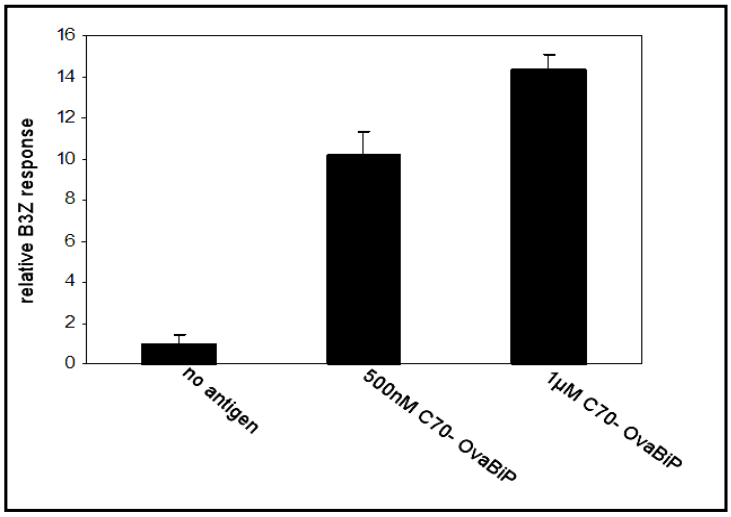

Abb.36: Auch C70 führt zu Kreuzpräsentation von OvaBiP. D2.4 Zellen wurden mit steigender Menge an C70-OvaBiP Komplex für 30 min bei 4°C inkubiert, gewaschen und für 4h mit B3Z-Zellen coinkubiert. Die Kreuzpräsentation von SIINFEKL wurde anhand der ß-Galaktosidase Aktivivität quantifiziert. (N=3)

Wie in Abb. 36 dargestellt, wird auch C70- assoziiertes Peptid effizient auf D2.4 Zellen kreuzpräsentiert. Es zeigt sich eine signifikante Erhöhung von spezifisch aktivierten T-Zellen. Dagegen bleibt nach Coinkubation von D2.4 Zellen mit OvaBiP allein (nicht gezeigt) oder mit unbehandelten Zellen die Zahl der stimulierten T-Zellen gering.

3.4.6 Die Hsp70 vermittelte Antigenpräsentation erfolgt über die Aufnahme durch den C70 Rezeptor

Um die Rezeptor-Spezifität der Hsp70 vermittelten Antigenpräsentation zu untersuchen, wurden Kompetitionsexperimente mit unbeladenem Hsp70 durchgeführt. Zunächst wurde getestet, ob unbeladenes Hsp70 in der Lage ist, die Kreuzpräsentation zu vermindern. Hierbei wurden mit Ausnahme der Anbindung, wie unter 2.4.5 beschrieben vorgegangen. Die Anbindung des Hsp70-OvaBiP Komplexes erfolgte in Gegenwart von steigenden Mengen an unbeladenem Hsp70 als Kompetitor. Mit Hilfe des B3Z-Reporter System wurde die spezifische Präsentation von SIINFEKL an T- Zellen gemessen (Abb.37).

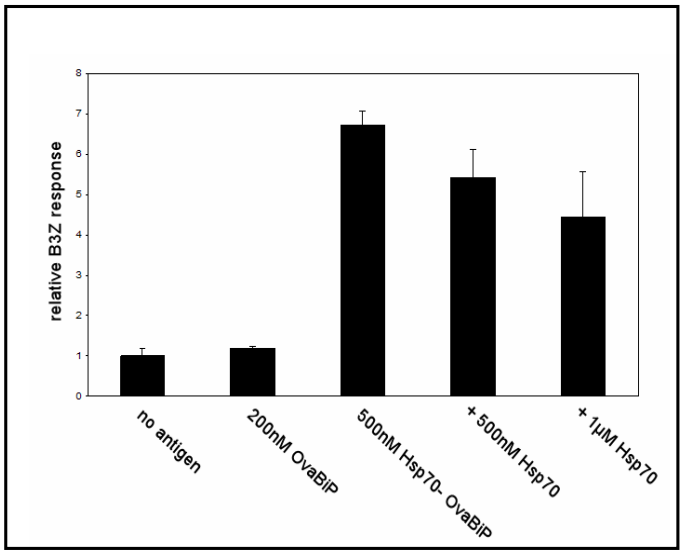

Abb.37: Unbeladenes Hsp70 kompetiert die Hsp70 vermittelte Kreuzpräsentation von OvaBiP. D2.4 Zellen wurden für 30 min bei 4°C mit 500 nM Hsp70-OvaBip Komplex in Abwesenheit oder in Gegenwart steigender Konzentrationen von unbeladenem Hsp70 inkubiert. Anschließend wurden die Zellen gewaschen und für 4h bei 37°C inkubiert. Die Kreuzpräsentation von SIINFEKL wurde anhand der ß-Galaktosidase Aktivivität quantifiziert. (N=2)

Wie in Abb. 37 zu sehen ist, nimmt bereits in Gegenwart einer äquimolaren Menge an Kompetitor die Zahl der stimulierten T-Zellen ab. Diese Tendenz setzt sich bei einem 2 fachen Überschuss an Kompetitor fort.

Ob die Hsp70 induzierte Antigenpräsentation über die N-terminale oder die C-terminale Domäne vermittelt wird, wurde in einem darauf folgenden Kompetitionsexperiment untersucht. D2.4 Zellen wurden mit dem Hsp70-OvaBiP Komplex und steigender Konzentrationen an N70 inkubiert und die

Antigenpräsentation über die Zahl der stimulierten T-Zellen (B3Z) analysiert (Abb.38).

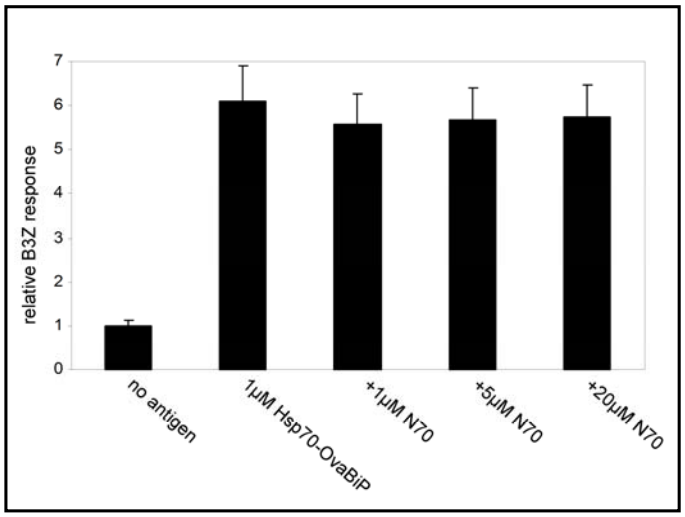

Abb.38: N70 führt zu keiner Verringerung der Hsp70 vermittelten Kreuzpräsentation von OvaBiP. D2.4 Zellen wurden für 30 min bei 4°C mit 1µM Hsp70-OvaBip Komplex in Abwesenheit oder in der Gegenwart von steigenden Konzentrationen von N70 inkubiert. Anschließend wurden die Zellen gewaschen und für 4h bei 37°C inkubiert. Die Kreuzpräsentation von SIINFEKL wurde anhand der ß-Galaktosidase Aktivität quantifiziert. (N= 3)

Selbst ein 20 facher Überschuss an N70 als Kompetitor führte zu keiner signifikanten Verringerung der T-Zell Antwort

Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass die Hsp70 vermittelte Antigenpräsentation über die Substrat-bindende Domäne stattfindet.

3.5 Steigerung der Aufnahme von freiem Peptid nach Inkubation mit Hsp70 an Raw264.7 Makrophagen

Für dendritische Zellen wurde gezeigt (West et al., 2004), dass mikrobielle Produkte über *Toll-like* Rezeptoren auf transkriptioneller Ebene ein Programm auslösen, welches zur Aktivierung und Reifung von T-Zellen führt. Hierbei bewirkt, das mikrobielle Endotoxin Lipopolysaccharid bei gleichzeitiger Zugabe mit antigenem Peptid eine akute Steigerung der makropinocytotischen Aufnahme von Antigen, und in der Folge einen Anstieg der Präsentation auf MHC I– und MHC II- Molekülen.
Damit stellte sich die Frage, ob Hsp70 auf ähnliche Weise Makropinozytose zu stimulieren vermag. Daher sollte untersucht werden, ob Raw264.7 Makrophagen nach Stimulation mit freiem Hitzeschockprotein oder seinen Domänen lösliches Peptid-Antigen aufzunehmen vermögen. Hierzu wurden Raw264.7 Zellen mit Endotoxin-depletiertem unmarkiertem Hsp70, N70 oder C70 nach Anbindung für 5 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen für weitere 5 min mit einem über Hsp70, N70 oder C70 20 fachen Überschuss an FITC markiertem OvaBiP bei 37°C inkubiert, gewaschen, fixiert und im konfokalem Mikroskop untersucht (Abb.39; Bild 1-3). Als Kontrolle dienten Zellen, die zuvor mit TBS-Puffer (vgl. 5.1.4) oder BSA behandelt wurden (Abb.39; Bild 4-5). Die Inkubation mit endotoxinfreiem Hsp70 und N70 führt zu einer signifikanten Aufnahme von antigenem Peptid, wie deutlich an der intrazellullären Fluoreszenz (grün) zu sehen ist (Bild 1+2). Im Gegensatz dazu führt eine Vorinkubation mit C70 (Bild 3) zu keiner Verstärkung der Peptid Aufnahme, verglichen mit dem Kontrollprotein BSA oder auch mit der Mock-Kontrolle (Bild 4+5). Bei diesen Experimenten kann ein LPS Effekt ausgeschlossen werden, da die Endotoxin Kontamination des verwendeten BSA über der von Hsp70 lag.

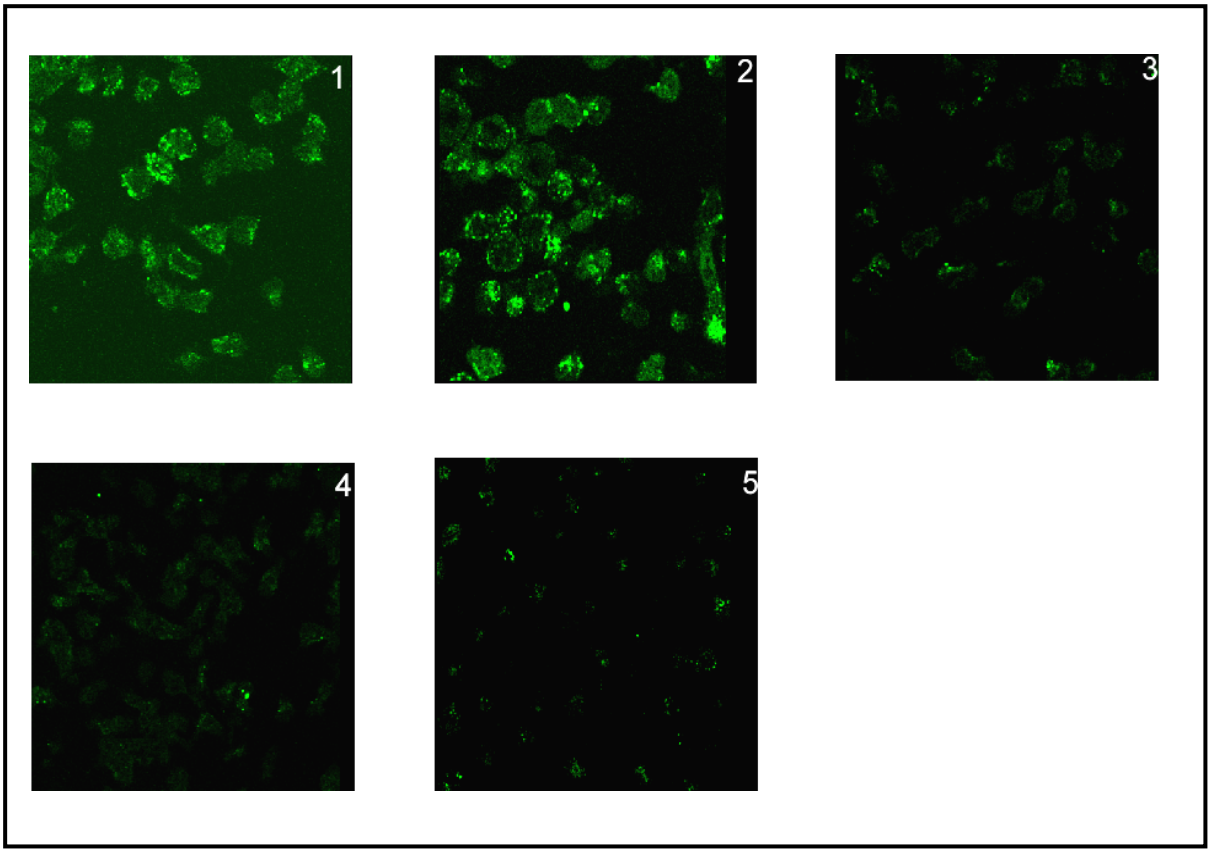

Abb.39: Die Inkubation von Raw264.7 Makrophagen mit Hsp70 führt zur anschließenden Aufnahme von löslichem Peptid. Raw264.7 Zellen wurden nach Anbindung mit je 3µM unmarkiertem Hsp70 **(1)**, N70 **(2)**, C70 **(3)** oder Mock-Kontrolle: TBS **(4)** oder BSA **(5)** für 5 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen intensiv gewaschen und für weitere 5 min in Gegenwart von FITC markiertem OvaBiP inkubiert. Die Analyse erfolgte am konfokalen Mikroskop.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Stimulation von murinen Makrophagen durch Hsp70 oder N70 zu einer verstärkten Aufnahme von antigenem Peptid führt, wohingegen C70 keinen stimulatorischen Effekt aufweist.

4. Diskussion

Das Interesse an der Funktion extrazellulärer Chaperone hat, vor allem in Hinblick auf die Immunantwort, in jüngster Zeit zugenommen. Hierbei können in Stresssituationen Chaperone wie Hsp70, bedingt durch ihre Eigenschaft an immunologische Effektor-Zellen zu binden, die Funktion als Gefahrensignal übernehmen (Asea et al., 2000; Basu and Srivastava, 2000). Gerade bei Tumorerkrankungen nehmen Chaperone mehr und mehr auch eine therapeutische Funktion ein. Die Arbeit von Yewdell et al. (1999) zeigt, wie die Applikation dieser Chaperone zwei unterschiedliche Immunantworten gegen Tumore auslösen kann. So wird zum einen eine Tumor-spezifische, d.h. eine $CD8^+$ T-Zell vermittelte zytotoxische Immunantwort, und zum anderen eine Tumor-unspezifische Immunantwort, d.h. die Induktion von Cytokinen (Asea et al., 2000; Wang et al., 2001b), ausgelöst. Die spezifische Immunantwort wird durch Tumor-spezifische oder virale Antigene ausgelöst, die an Chaperone gebunden in den extrazellulären Raum gelangen und dort von antigenpräsentierenden Zellen erkannt werden. Parallel zur Entdeckung dieser immunogenen Eigenschaft von Chaperonen wurde auch eine Vielzahl an Rezeptoren postuliert (Basu et al., 2001; Becker et al., 2002; Delneste et al., 2002). Durch Kompetitionsexperimente konnte an antigenpräsentierenden Zellen gezeigt werden, dass die Anbindung von Hsp70 spezifisch und sättigbar ist. (Sondermann et al., 2000; Theriault et al., 2005). Trotz der Vielzahl postulierter Hsp70 Rezeptoren fehlt ein direkter Nachweis für eine Interaktion zwischen Hsp70 und eines dieser Rezeptoren. Dies hat zur Folge, dass die bereits veröffentlichten Rezeptoren für Hsp70 kontrovers diskutiert werden, und es nach wie vor unklar ist, ob die Anbindung von Hsp70 über einen oder mehrere Rezeptoren stattfindet.

Aufgrund dieser Fragestellung und der bestehenden Diskussion mehrerer Rezeptoren für Hsp70, wurde zunächst die Anbindung von Hsp70 an unterschiedlichen murinen antigenpräsentierenden Zellen (APC) näher charakterisiert. Hierbei konnten neue Aspekte der spezifischen Anbindung von humanen Hsp70 an APCs herausgearbeitet werden. Zunächst wurde die Oberflächenanbindung an murinen Makrophagen und dendritischen Zellen von

sowohl Hsp70, als auch den Untereinheiten N70 und C70 gezeigt. Experimentell wurde dies an der Makrophagen Zellinie Raw264.7 und an der dendritischen Zelllinie D2.4 durchgeführt, wobei nur für die Raw264.7 Makrophagenzelllinie eine spezifische Hsp70 Bindung beschrieben war (Binder et al., 2000b). An beiden Zelllinien konnte eine konzentrationsabhängige Hsp70 Anbindung beobachtet werden, was sehr stark auf eine Ligand-Rezeptor Interaktion hinweist. Hierbei lag die Sättigung der Hsp70 Anbindung bei 1µM (Daten nicht gezeigt), wobei zwischen Makrophagen und dendritischen Zellen kein signifikanter Unterschied vorlag. Kompetitionsexperimente unter Verwendung von Hsp70 als Kompetitor zeigten eine fast vollständigen Blockierung (ca. 90%) der Hsp70 Anbindung, was die Spezifität dieser Anbindung untermauert. Bei Zugabe der ATPase-Domäne (N70), oder der Substrat-bindenden Domäne (C70) alleine, zeigte hingegen keine der beiden Domänen eine vollständige Verdrängung der Hsp70 Anbindung. Quantitative FACS Analysen ergaben für C70 eine Verdrängung von nur 60% und für N70 eine Verdrängung von 40% der Anbindung von Hsp70. Die Bindung von N70 konnte wiederum nicht durch C70 und die Bindung von C70 nicht durch N70 kompetitiert werden, wohingegen jede Domäne sich selbst bis zu 90% verdrängte. Darüber hinaus zeigte die Hsp70 Anbindung in Gegenwart einer der beiden Domänen ein punktuelleres Bindungsmuster. Diese Daten stützen das Modell von zwei verschiedenen Rezeptoren für die Hsp70 Domänen C70 und N70. Das Modell zweier Hsp70-Bindungsdomänen konnte durch die vollständige Verdrängung der Hsp70 Anbindung durch gleichzeitige Zugabe von N70 und C70 zusätzlich bestätigt werden. Weiterhin untermauert wird es durch die gleichzeitige Anbindung von unterschiedlich markiertem N70 und C70. Hierbei konnte deutlich eine Anbindung von N70 und C70 in unterschiedlichen Domänen auf der Membran gezeigt werden.

Dieser Effekt war unerwartet, da für humanes Hsp70 eine ausschließlich N-terminal vermittelte Interaktion mit der Zelloberfläche von Makrophagen beschrieben wurde (Becker et al., 2002), wohingegen für mykobakterielles Hsp70 ein ausschließlich C-terminal vermittelter Stimulationseffekt von Chemokinen beobachtet wurde (Wang et al., 2001b). Castellino et al. (2000) zeigt hingegen für verschiedene Peptide unterschiedliche Wege der Hsp70 vermittelten Re-Präsentation auf APCs, wodurch die Existenz von unterschiedlichen Rezeptoren für die einzelnen Hsp70 Peptid Komplexe vermutet wurde.

Die vorgestellten Ergebnisse zeigen für die verwendeten Zellsysteme klar die Existenz mehrerer, mindestens aber zwei, Bindungsstellen für Hsp70, wobei die Bindung in einem Fall über seine C-, und im anderen Fall über seine N-Domäne erfolgt.

Wang et al. zeigten, dass es in Gegenwart von Hsp70 zu einer verstärkten phagozytotischen Aufnahme von immunogenen Substanzen kommt, wobei Hsp70 mit Detergens-resistenten Mikrodomänen interagiert (Wang et al., 2006b). Die Tatsache, dass N70 und C70 differenziell an die Zellmembran binden, führte zur näheren Untersuchungen dieser Mikrodomänen. Eine Separierung Detergens-löslicher von Detergens-resistenten Membrankomponenten in Raw264.7 Zellen zeigte, dass eine Assoziation von Hsp70 an beide Domänen stattfindet. N70 ist dabei nur in Detergens-löslichen Domänen zu finden, wohingegen sich C70 zu gleichen Teilen auf Detergens-resistente und Detregens-lösliche Membranen verteilt. Diese Beobachtung bestätigt nochmals die Anbindung von Hsp70 an verschiedene Bindungsstellen auf der Zelloberfläche, sowie deren differenzielle Lokalisation in unterschiedlichen Mikrodomänen der Plasmamembran.

Im Zusammenhang mit der beschriebenen spezifischen Anbindung von Hsp70 an antigenpräsentierende Zellen wurde auch eine Reihe von Membranproteinen an der Zelloberfläche als Rezeptoren für Hsp70 diskutiert. In chemischen *cross-link* Experimenten konnte gezeigt werden, dass das endoplasmatische Chaperon GRP94 mit dem LDL-Rezeptor CD91 interagiert (Binder et al., 2000b). Durch Kompetitionsexperimente an murinen Makrophagenzelllinien wurde diese Wechselwirkung um Hsp70, Hsp90 und Calreticulin erweitert (Basu et al., 2001). Demnach werden die an Hsp-Proteinen und Calreticulin assozierten Peptide abhängig von CD91 auf MHC-Klasse I Molekülen präsentiert (Basu et al., 2001; Binder et al., 2000b). In diesem Zusammenhang wurde auch α2-Makroglobulin eine Funktion als Adjuvans zugesprochen, d.h. es bindet Peptide und führt sie der Präsentation von MHC-I Molekülen zu. Kontrovers zu den veröffentlichten Daten konnte mittels CD91 CHO-Transfektanten gezeigt werden, dass keine direkte CD91-Hsp70 Assoziation stattfindet, wobei eine indirekten Wechselwirkung nicht ausgeschlossen werden kann (Binder et al., 2004; Theriault et al., 2005). Um diese widersprüchlichen Aussagen zu klären, wurde in dieser Arbeit die Rolle von CD91 hinsichtlich der Hsp70 Anbindung erneut analysiert.

Hierfür wurden Fluoreszenzmikroskopisch die Hsp70 Anbindung, sowie mit zwei unabhängigen Methoden die Expression von funktionellem CD91 auf der Makrophagenzelllinie Raw264.7 untersucht. Erste Bindungsexperimente mit dieser Zelllinie zeigten eine Hsp70 Anbindung. Mittels Western Blot Analyse und des beschriebenen Exotoxin A Test konnte die Expression von funktionellem CD91 auf der Zelloberfläche nachgewiesen werden.

LPS-Stimulation reguliert bei Makrophagen die Expression verschiedener Cytokine sowie von Oberflächenproteinen. Eine mögliche Interaktion von Hsp70 mit CD91 sollte mit Hilfe dieses Effekts analysiert werden. Dazu wurden LPS stimulierte Raw264.7 Zellen ebenfalls auf die Hsp70 Anbindung und Expression von funktionellem CD91 hin untersucht. Durch LPS konnte zunächst eine starke morphologische Veränderung der Zellen beobachtet werden, wie die Ausbildung von pseudopodienähnlichen Strukturen, die Verschmelzung von Zellen (Syncitium) und eine verstärkte Granularität (Daten nicht gezeigt). Auf der Zelloberfläche konnte weiterhin funktionelles CD91 nachgewiesen werden, wohingegen die Eigenschaft Hsp70 zu binden, verloren ging.

Basu et al. (2001) zeigten, dass die Makrophagenzelllinie Raw309 Cr.1 HSP70 nicht bindet. Daher wurde diese Zelllinie in der vorliegenden Arbeit als Negativkontrolle verwendet und ihre Eigenschaft, Hsp70 zu binden, sowie die CD91 Expression untersucht. Unstimulierte Raw309 Cr. 1 Zellen wiesen keine Hsp70 Anbindung auf, wohingegen nach LPS eine Anbindung von Hsp70 zu beobachtet war, obwohl kein funktionelles CD91 expremiert wurde. Aufgrund dieser kontroversen Daten bezüglich einer vorhandenen CD91 Expression ohne Hsp70 Anbindung an Raw309 Cr.1 Zellen kann die Spezifität der Hsp70 Bindung über CD91 in Frage gestellt werden. Aus diesem Grund wurde nochmals mit einer unabhängigen Analyse die Anbindung von Hsp70 an CHO-Kontrollzelllinien, die CD91 überexprimierten, untersucht. Wie erwartet, zeigten auch diese keine Hsp70 Anbindung. Somit kann eine direkte Interaktion zwischen Hsp70 und CD91 ausgeschlossen werde, nicht jedoch eine indirekte über Korezeptoren oder periphere Proteine.

LOX-1, ein *Scavanger*-Rezeptor der Klasse E, wurde mit Schwerpunkt auf der Analyse von humanen dendritischen Zellen und LOX-1 Transfektanten, als Rezeptor für humanes Hsp70 beschrieben (Delneste et al., 2002; Theriault et al., 2005). Für LOX-1 wurden für Kompetitionsexperimente die Liganden Poly I und Poly A (Poly-Nukleotide) verwendet, wobei für Poly I eine Inhibition der Hsp70 Anbindung an humanen Dendriten und Makrophagen von bis zu 94% gezeigt wurde (Delneste et al., 2002). In der vorliegenden Arbeit wurde die murine Makrophagenzelllinie Raw264.7 verwendet. Dabei konnte durch Zugabe des LOX-1 spezifischen Liganden Poly-I keine Verringerung der Hsp70 Anbindung an Raw264.7 Zellen beobachtet werden. Im Gegenteil, beim Einsatz von Poly A konnte für N70 eine Verstärkung der Anbindung festgestellt werden.
Problematisch dabei ist jedoch, dass die Frage nach einer Oberflächenexpression von LOX-1 auf der Makrophagenzelllinie Raw264.7 nicht eindeutig geklärt werden konnte. Dies müsste mit weiterführenden Experimenten noch untersucht werden. Trotzdem konnte in Gegenwart des spezifisch mit LOX-1 interagierenden Liganden Poly I keine Inhibierung der Hsp70 Anbindung beobachtet werden. Infolgedessen kann LOX-1 als Hsp70 Rezeptor für die murine Makrophagenzelllinie Raw264.7 ausgeschlossen werden.

Der für das humane und mykobakterielle Hsp70 beschriebene Rezeptor CD40 (Becker et al., 2002; Wang et al., 2001b) wurde ebenfalls in Kompetitionsexperimenten überprüft. In Gegenwart eines CD40 Antikörpers wurde die Anbindung von sowohl N70 als auch C70 nicht blockiert. Bezüglich der CD40 Oberflächenexpression konnte bei LPS stimulierten Raw264.7 Zellen eine massive Hochregulation dieses Rezeptors beobachtet werden, wohingegen die Hsp70 Anbindung verloren ging. Trotz dieser in dem verwendeten Zellsystem nicht einhergehenden Korrelation zwischen CD40 Expression und Hsp70 Anbindung kann eine direkte Interaktion für andere Zelltypen nicht ausgeschlossen werden. Für die Wechselwirkung von CD40 mit seinem trimeren Liganden (CD40L) wurde gezeigt, dass dieser nur dann bindet, wenn CD40 suf der Zelloberfläche als Trimer vorliegt (Banner et al., 1993). Darüber hinaus wurde eine Verstärkung der PIP-3 Kinase Aktivität bei der Oligomerisierung von CD40 Monomeren zu CD40/CD40 Homodimeren beobachtet. (Reyes-Moreno et al., 2004). Vor diesem Hintergrund

kann nicht ausgeschlossen werden, dass der Oligomerisierungszustand von CD40 nach LPS Stimulation verändert wird, und dadurch die Hsp70-Anbindung gestört wird.
Zusammenfassend kann gesagt werden, dass für das in dieser Arbeit verwendete murine Zellsystem die Rezeptoren CD91 und LOX-1 für die Anbindung und Aufnahme von Hsp70 ausgeschlossen werden können. Zur Interaktion zwischen CD40 und dem humanem Hsp70 bedarf es noch weiterer Untersuchungen, wobei CD40 als Massenrezeptor für Hsp70 nicht in Betracht gezogen werden kann. Die Funktion einer Hsp70 vermittelten Aktivierung der CD40-Signaltransduktionskaskade gilt es noch zu klären, wobei dazu schon erste Hinweise vorliegen (Becker et al., 2002).

Für die verschiedenen Hsp-Moleküle wurde die Zelloberflächenanbindung sowie deren Internalisierung durch APCs gezeigt (Arnold-Schild et al., 1999; Basu et al., 2001; Becker et al., 2002; Berwin et al., 2002; Sondermann et al., 2000; Wang et al., 2005; Wassenberg et al., 1999). Dabei blieb jedoch die Beschreibung der intrazellulären Lokalisation des Hsp70-Peptid Komplexes aus. Castellino et al. (2000) zeigt für Hsp70 eine Zelloberflächenanbindung auf antigenpräsentierenden Zellen mit den Merkmalen eines sättigbaren Rezeptorsystems und einer Rezeptor vermittelten Endozytose. Hierbei konnte abhängig von der Peptidsequenz des Hsp70 assoziierten Antigens ein cytosolischer (TAP-und Proteasom abhängig) sowie ein endosomaler Weg (TAP-und Proteasom unabhängig) beobachtet werden, wobei eine genauere Charakterisierung der einzelnen Kompartimente noch aussteht.
Um den intrazellulären Weg des Hsp70-Peptid Komplexes näher zu untersuchen, wurde zunächst die Anbindung des Komplexes fluoreszenzmikroskopisch untersucht. Hsp70 assoziiertes Peptid konnte deutlich auf der Zelloberfläche von Raw264.7 Makrophagen beobachtet werden. Obwohl nur eine schwache Beladungseffizienz des Hsp70 mit OvaBiP von nur 20 % (Castellino et al., 2000; Moroi et al., 2000; eigene nicht veröffentlichte Daten von Stefan Hanke) vorliegt, kann mit Peptid beladenes Hsp70 auf der Zelloberfläche fluoreszenzmikroskopisch nachgewiesen werden. Somit könnte die unterschiedliche Verteilung von unbeladenem und beladenem Hsp70 auf unterschiedliche Bindungstellen, die ihrerseits in

verschiedenen Membrandomänen lokalisiert sind, zurückgeführt werden. Die Erkennung differenzieller Bindungstellen für Hsp70 wird nochmals deutlicher bei der Anbindung von sowohl der N70 Domäne als auch der beladenen C70 Domäne. Hier zeigte die Verteilung ein klares punktuelles Muster, was darauf schliessen lässt, dass die Domänen unterschiedliche Oberflächenbereiche erkennen und binden. Auch scheinen interzelluläre Unterschiede vorzuliegen, was sich dadurch auszeichnete, dass einige Zellen gegenüber N70 und C70 unterschiedlich hohe Affinitäten aufwiesen.

Arnold-Schild et al. (1999) beobachtete, das an peritonealen mononuklearen Zellen die Hsp70 Anbindung inhomogen über die Zellpopulation verteilt ist. Dies könnte durch ein während der Zellteilung auftretendes differentielles Expressionsmuster der Hsp70 bindenden Strukturen erklärt werden, sowie durch mehr als eine Rezeptorklasse unterschiedlicher Affinitäten. Hinsichtlich der Internalisierung wurde bei 37°C eine Aufnahme des Hsp70-Peptid Komplex in endosomalen Strukturen nach 30 min gezeigt. Das darauffolgende Zeitfenster umfasst nach 6h die Kolokalisation von Peptid mit MHC-I Molekülen in retikulären Strukturen. (Castellino et al., 2000).

Da während der ersten Untersuchungen eine rasche Aufnahme des Hsp70-Peptid Komplexes beobachtet wurde und dazu keine näheren Daten vorliegen, wurde in dieser Studie ein kurzes Zeitfenster der Internalisierung als Schwerpunkt gewählt. Die Aufnahme des Hsp70-Peptid Komplexes erfolgte bei 37°C innerhalb von 2 min, wobei alles Hsp70 (beladenes und unbeladenes) effizient aufgenommen wurde. Interessanterweise zeigte sich schon zu diesem frühen Zeitpunkt eine Trennung von unbeladenem und beladenem Hsp70. Beladenes Hsp70 lokalisierte perinuklear, wohingegen unbeladenes Hsp70 peripher in vesikulären Strukturen zu beobachten war. N70 sowie beladenes C70 konnte ebenfalls nach 2 min intrazellulär beobachtet werden, wobei auch hier eine 100%ige Aufnahme stattfand.

Das differenzielle Bindungsmuster des Hsp70-Komplexes sowie dessen Subdomänen könnten durch die Erkennung unterschiedlicher Bindungsstellen auf der Plasmamembran erklärt werden, die auch differenzielle Internalisierungswege erlauben. Aufgrund der frühen Trennung der unbeladenen Hsp70 Moleküle vom Hsp70-Peptid Komplex liegt die Vermutung nahe, dass unterschiedliche

Internalisierungswege zu unterschiedlichen Kompartimenten verwendet werden. Dies wurde in einer weiteren Serie von Experimenten analysiert.

Makrophagen und dendritische Zellen sind Phagozyten, d.h. sie sind in der Lage, Partikel bzw. Pathogene über Phagozytose aufzunehmen. Bei diesem Vorgang wird das gebundene Pathogen zuerst von der Membran des Phagozyten umhüllt und dann Clathrin-unabhängig in einem Vesikel aufgenommen, das man als Phagosom bezeichnet (Ackerman et al., 2005; Desjardins et al., 1994; Touret et al., 2005). Es wird vermutet, dass Plasmamembrankomponenten vom Phagosom zur Plasmamembran rezyklisiert werden, um den Verlust an Plasmamembran zu kompensieren. Die zur Maturierung von Phagosomen benötigten Membranbestandteile werden durch Fusion von endosomalen und Post-Golgi Strukturen rekrutiert. (Desjardins et al., 1994).
In jüngster Zeit wurden bei der Aufreinigung von Phagosomen jedoch auch ER-Proteine, wie Calnexin und Calreticulin, identifiziert. Anhand dieser Daten wurde ein neues Modell der Phagozytose aufgestellt, welches eine direkte Interaktion und Verschmelzung von ER mit der Plasmamembran postuliert (Desjardins and Griffiths, 2003; Gagnon et al., 2002).
Da kurz nach Aufnahme der Hsp70-Peptidkomplex in perinuklearen Strukturen lokalisierte, sollte untersucht werden, ob Teile des Endoplasmatischen Retikulums bereits während der Internalisierung von Hsp70-Peptid Komplexen involviert sind. Die Inkubationstemperatur wurde von 37°C auf 19°C reduziert, um die frühen Ereignisse zu verlangsamen und somit besser beobachtbar zu machen. Auch unter diesen Bedingungen konnte nach 2 min eine vollständige Aufnahme des Hsp70-Peptid Komplexes beobachtet werden. Dabei konnte mittels Koloakalisation mit Rab 5, einem Marker für frühes Endosomen, gezeigt werden, dass der Hsp70-Peptid Komplex in endosomalen Strukturen akkumuliert. Diese Lokalisation in frühe Endosomen ist auf eine Rezeptor vermittelte Endozytose zurückzuführen, da nur aufgrund dessen eine so rasche und effiziente Aufnahme erklärt werden kann. Auch nach 15 min konnte der Hsp70-Peptid Komplex in kernnahen endosomalen Strukturen beobachtet werden, wobei noch keine vollständige Trennung des Hsp70 assoziierten Peptides erfolgte. In diesem Bereich nahmen die vorher vesikulären Strukturen zunehmend retikuläre Formen an. Unbeladenes Hsp70 konnte in

peripheren Bereichen der Zelle beobachtet werden, wobei diese vesikulären Strukturen keine Kolokalisation mit Rab5 aufwiesen. Da die Bindungsstudien über N70 und C70 eine voneinander getrennte Anbindung und Aufnahme (Daten der Aufnahme nicht gezeigt) aufwiesen, wären auch unterschiedliche Internalisierungswege denkbar. Über N- oder C-terminal gebundenes Hsp70, sowohl unbelades als auch beladenes, könnte Rezeptor-vermittelt endozytiert werden. Die Lokalisation hierbei erfolgt in voneinander getrennten frühen endodomalen Strukturen. Beladenes Hsp70 könnte dem endosomalen Weg folgen, wobei abdissoziiertes Peptid über den klassischen MHC-I Weg präsentiert werden würde. Darüber hinaus könnte beladenes Hsp70 gleichermaßen in frühe Endosomen oder weiterführenden endosomalen Strukturen aufgenommen werden, wobei hier eine Verschmelzung mit dem ER nicht ausgeschlossen werden kann.

Rab5 spielt als GTPase in der Membraninteraktion und Fusion eine wichtige Rolle (Mohrmann and van der Sluijs, 1999) mit hauptsächlicher Lokalisation in frühen Endosomen (Chavrier and Goud, 1999) und Phagosomen (Desjardins et al., 1994). In einer Arbeit von Duclos et al. (2000) wird die Rolle von Rab5 in der Fusion von Endosomen mit Phagosomen untersucht. Dabei besitzt Rab5 die Eigenschaft, die Phagozytose voranzutreiben, sowie eine komplette Verschmelzung endosomaler und phagosomaler Membranen zu inhibieren, trotzdem aber einen Flüssigkeitsaustausch zuzulassen (*kiss and run*). Somit kommt Rab5 eine Schlüsselrolle in der Fusion von Phagosomen und Endosomen zu.

In einer weiteren Serie von Experimenten wurde das Hauptaugenmerk auf die Beteilung des ER während der Internalisierung von Hsp70-Peptid Komplexen gelegt. Interessanterweise konnte nach 2 min eine Kolokalisation mit PDI, einem Marker für das Lumen des ER, und dem vollständig aufgenommenen Hsp70-Peptid Komplex beobachtet werden. Diese frühe Lokalisation des Hsp70-Peptid Komplexes in PDI positiven Strukturen könnte ein erster wichtiger Hinweis sein, dass bei der Hsp70 vermittelten Antigenpräsentation ein direkter Kontakt und Austausch zwischen ER und den in der Nähe der Plasmamembran vorkommenden endosomalen Strukturen stattfindet. Damit würde erstmals ein neuer Internalisierungsmechanismus beschrieben, der es ermöglicht, extrazelluläre Antigene effizient in direkten Kontakt zur MHC-I Beladungsmaschinerie zu bringen.

Bis zu einem Zeitpunkt von 20 min konnte eine Lokalisation des Hsp70-Peptid Komplexes im ER beobachtet werden, wobei nach 10 min bereits eine Trennung von unbeladenem und beladenem Hsp70 stattfand. Hierbei lokalisierte das unbeladene Hsp70 in vesikulären Strukturen. Das Peptid war bis 20 min nach Aufnahme ausschließlich in retikulären Strukturen lokalisiert. Lokalisationsstudien des prozessierten antigenen Peptides zeigen, dass dieses noch nach 6h in einem retikulären Kompartiment zu finden ist, wobei hier schon eine Beladung auf MHC-Klasse I stattgefunden hat (Castellino et al., 2000). Die Verschmelzung von Endosomen und ER-Strukturen während der Hsp70 vermittelten Antigenaufnahme muss in weiterführenden Studien noch näher untersucht werden. Denkbar sind hierbei Kolokalisationsexperimente unter gleichzeitiger Verwendung von Rab5 und PDI. Desweitern ist geplant, den frühen Internalisierungsweg für die beiden Domänen C70 und N70 in ähnlichen Studien zu untersuchen. Dadurch könnten eventuell unterschiedliche Prozessierungswege nachgewiesen werden.
Die N-terminale Markierung des Peptids mit dem FITC Farbmolekül inhibiert die Anbindung an MHC-I Molekülen und damit die Präsentation. Dieser Effekt kann benutz werden um das Verhalten von Hsp70 aufgenommene Peptid in der Zelle über einen längeren Zeitraum zu untersuchen.
Da für das endoplasmatische Chaperon GRP94 gezeigt wurde, dass nach 20 min eine Teil des aufgenommenen Proteins mit dem Lysosomenmarker LAMP-2 kolokalisiert, wäre es denkbar, dass auch unbeladenes Hsp70 in lysosomale Strukturen transportiert wird (Wassenberg et al., 1999).
Die Trennung des unbeladenem von beladenem Hsp70 war unter Normalbedingungen (37°C) schon nach 2 min zu beobachten. Das unbeladene Hsp70 konnte nach 20 min vollständig durch Kolokalisation mit Lyso Tracker, einem Fluoreszenzfarbstoff für Lysosomen, in vesikulären Strukturen der Lysosomen nachgewiesen werden.

Die Kreuzpräsentation von Antigen spielt eine Schlüsselrolle in der Immunantwort gegen Tumore und viralen Infektionskrankheiten (Carbone et al., 1998; Kurts et al., 1998). In diesem Zusammenhang soll die Aufnahme apoptotischer Zellen über Phagozytose das Schlüsselereignis darstellen (Albert et al., 1998). Jedoch zeigen neuere Daten, dass auch die Aktivierung dendritischer Zellen durch nekrotische

Zellen eine verstärkte Antigenpräsentation auf MHC-Klasse I Molekülen initiiert. (Gallucci et al., 1999).

Castellino et al. (2000) zeigt die Relevanz der Hsp70 vermittelten Antigenpräsentation sowohl auf MHC-Klasse I aber auch der Klasse II. Die Analysen zur Funktionalität der Hsp70 vermittelten Antigenpräsentation unter Verwendung des B3Z-Reporter Systems zeigten, dass durch Hsp70 eine effiziente Antigenpräsentation an $CD8^+$ T-Zellen stattfindet (durchgeführt von Alice Levin, MPI Martinsried). Somit kommt der Präsentation von Hsp70 assoziiertem Antigen, hinsichtlich der Aktivierung von zytotoxischen T-Zellen, eine physiologisch relevante Bedeutung zu.

Da Hsp70 sowohl über die N- als auch die C-terminale Domäne an die Zelloberfläche von antigenpräsentierenden Zellen binden kann, wurde mit Hilfe des B3Z T-Zell Systems die C70 vermittelte Antigenpräsentation analysiert. Interessanterweise zeigte C70-Peptid Komplex auch ohne die regulatorische ATPase Domäne eine signifikante Verstärkung der Antigenpräsentation auf MHC-Klasse I, wobei dieser Effekt doppelt so hoch wie der von Hsp70 war. Diese Beobachtung der stärkeren Antigenpräsentation durch C70 gegenüber Hsp70 könnte durch eine unterschiedlich effiziente Beladung der beiden Proteine hervorgerufen werden. Daher muss der Beladungszustand noch untersucht werden. Auf der andere Seite wurde mykobakterielles C70 mit der Stimulation von Chemokinen in Zusammenhang gebracht (Wang et al., 2001b). Es ist daher also auch möglich, dass die Präsentation durch die Ausschüttung von Cytokinen und Chemokinen noch zusätzlich verstärkt wird.

Wie schon in den Bindungsexperimenten sowie in dem Präsentationsassays gezeigt wurde, nimmt C70 eine Sonderstellung ein. Somit könnte die für die Antigenpräsentation verantwortliche Bindung an die Zelloberfläche über die C-terminale Domäne von Hsp70 verrmittelt werden. Kompetitionsexperimente mit N70 als Kompetitor zeigten keine Verringerung an der Antigenpräsentation im B3Z-Reporter System.

Zusammenfassend zeigen diese Daten, dass sowohl C70 als auch der C-Terminus von Hsp70 Antigenpräsentation zu vermitteln vermögen.

Mikrobielle Produkte stimulieren dendritische Zellen über *Toll-like* Rezeptoren (TLRs), was in ihnen ein Programm zu Maturierung, und dadurch bedingt die Fähigkeit T-Zellen zu aktivieren, auslöst. Obwohl bekannt ist, dass aufgrund des einsetzenden Maturierungsprozesses endozytotischen Vorgänge herabreguliert werden, konnte für TLRs gezeigt werden, dass ausgelöst durch deren Liganden zuerst eine verstärkte Makropinocytose des Antigens stattfindet. Bedingt durch den Stimulationseffekt findet dann eine verstärkte Antigenpräsentation auf MHC-Klassse I und II statt (West et al., 2004).

Für Hitzeschockproteine wurde ein solcher Stimulationseffekt bis heute noch nicht untersucht. Daher sollte in ersten Experimenten die Frage beantwortet werden, ob Hsp70 die Aufnahme von freiem extrazellulärem antigenem Peptid stimulieren kann (Makropinozytose). Erste Daten deuten darauf hin, dass durch Hsp70 und speziell dessen ATPase Domäne N70 nach Anbindung und Aufnahme ein zelluläres Programm aktiviert wird, das zur Aufnahme von antigenem Peptid mittels Makropinozytose führt. Diese Beobachtung würde der ATPase Domäne von Hsp70 eine neue Funktion zukommen lassen, nämlich die eines “Türöffners“ für antigene Substanzen. Ein LPS Effekt kann hierbei ausgeschlossen werden, da sowohl BSA als auch C70 im LAL Test einen höhere Kontamination an bakteriellen Endotoxin als Hsp70 aufwiesen. Trotz der Endotoxin Kontamination konnten weder bei BSA noch bei C70 eine signifikante Aufnahme an antigenem Peptid beobachtet werden.

Die Maschinerie, die Aktivierung von Signalkaskaden, sowie die Bedeutung des Aktin-Zytoskelets in diesem Prozess bedürfen noch weiterer Untersuchungen.

Modell zur Anbindung und Aufnahme von extrazellulärem beladenem und unbeladenem Hsp70 an antigenpräsentierenden Zellen

Die durch diese Arbeit gewonnen Informationen lassen sich im folgenden Modell zusammenfassen (Abb. 40). Im extrazellulären Raum vorkommendes Hsp70, das von Tumor- oder nekrotischen Zellen freigelassen wurde, kann mit antigenem Peptid aus der Ursprungszelle beladen sein. Für die Bindung und Aufnahme von beladenem und unbeladenem Hsp70 von antigenpräsentierenden Zellen (APC) werden folgende Möglichkeiten diskutiert: Über seine N-terminale (Bindungsstelle A) oder C-terminale Domäne (Bindungsstelle B) bindet Hsp70 an Membranbereiche, die Detergens löslich oder Detergens-resistent (DRM) sind (1). Die Internalisierung erfolgt über Rezeptor vermittelte Endozytose in voneinander getrennte frühe Endosomen, was die Kolokalisation mit Rab5 erklären würde. Von dort aus folgt der Hsp70-Antigen Komplex dem Endosomalen Weg (2). Freies vom Hsp70 abdissoziiertes Peptid wird aus dem Endosomen ausgeschleust, prozessiert und via TAP ins ER transportiert (3). Mit Peptid beladene MHC-I Moleküle gelangen über den sekretorischen Weg auf die Zelloberfläche (4). Darüber hinaus ist ein Weg für das beladene Hsp70 über ein ER-endosomales Mischkompartiment zu diskutieren (5+6), und/oder eine Verschmelzung von ER direkt mit der Plasmamembran (7), so dass der Hsp70-Antigen Komplex direkten Zugang zur MHC-I Beladungsmaschinerie erhält. Die frühe Kolokalisation mit dem Endosomen Marker Rab5 sowie mit dem ER-Marker PDI lassen die Bildung eines Endosomen-ER Mischkompartiments sowie die Rekrutierung des ER´s vermuten. Dieser Prozess wäre der schon beschriebene Bildung von Phagosom-ER-Mischkompartimenten analog (Desjardins et al., 2003).
Den Mechanismus der Prozessierung sowie der Beladung von MHC-I Molekülen mit antigenem Peptid gilt es noch zu klären. Aufgrund des bereits beschriebenen Modelles für den Phagozytosemechanismus in APCs könnte man vermuten, dass hier ebenfalls das Peptid ins Cytosol retransloziert wird, dort via Proteasom prozessiert und TAP abhängig zurück ins retikuläre/endosomale Mischkompartiment transportiert wird. Nach Beladung auf MHC-I Molekülen wird der MHC-I-Peptidkomplex zur

Plasmamembran transportiert, wodurch eine Aktivierung zytotoxischer $CD8^+$-T-Zellen und somit eine effektive und schnelle Bekämpfung infizierter Zellen stattfindet.
In beiden Fällen wird nicht mehr beladenes Hsp70 in Lysosomen transportiert und abgebaut (8).

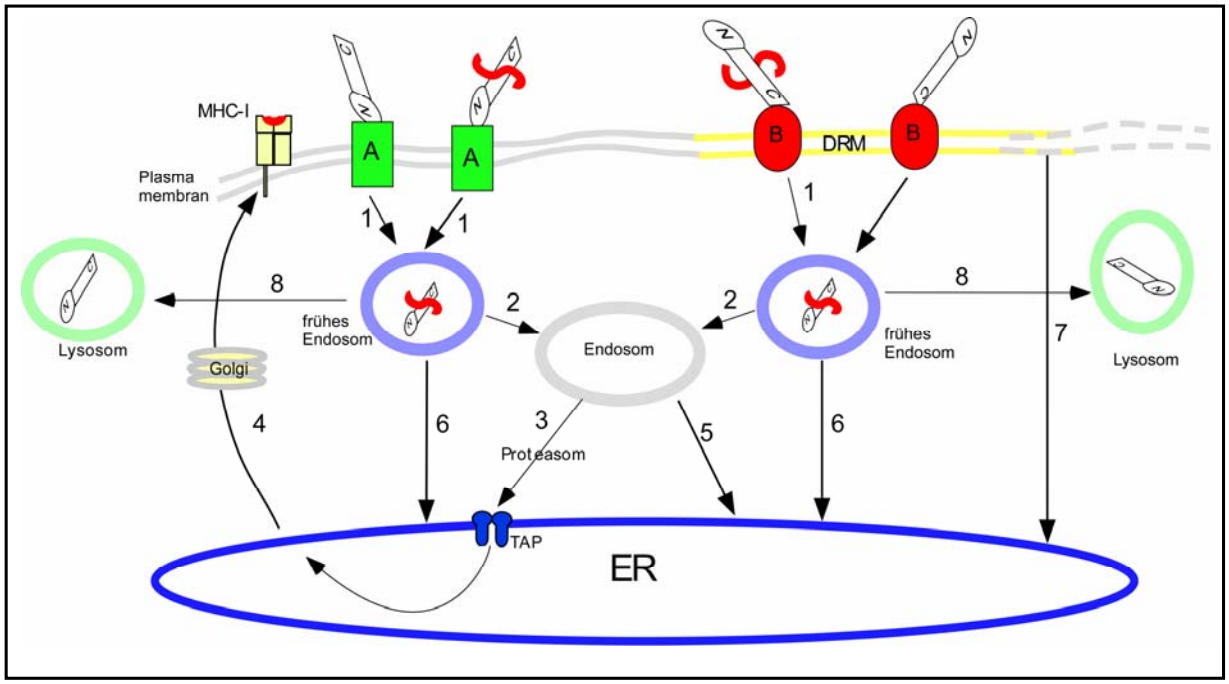

Abb.40: Die Anbindung und Aufnahme von beladenem und unbeladenem Hsp70 an antigen-präsentierenden Zellen. (1) Über seinen N- oder C-Terminus gebundenes Hsp70 wird in frühe Endosomen aufgenommen. **(2)** Endosomaler Weg. **(3)** Ausschleusung des Peptids in das Zytosol zur Prozessierung durch das Proteasom und Aufnahme ins ER via TAP. **(4)** Durchlaufen des sekretorischen Wegs und Präsentation des Antigens durch MHC-I auf der Zelloberfläche. **(5)** Weg über ER- Endosom Mischkompartiment. **(6)** Weg über frühes Endosom- ER Mischkompartiment.
(7) Verschmelzung von ER mit Plasmamembran → Hsp70- Antigen Komplex erhält direkten Zugang zur MHC-I Beladungsmaschinerie. **(8)** freies Hsp70 wandert in die Lysosomen

5. Material und Methoden

5.1 Materialien

Alle Chemikalien wurden, sofern nicht anders angegeben, von den Firmen Fluka, Sigma, Merck, Biorad, Pierce, Molecular Probes, Serva und Roth bezogen.

5.1.1 Bakterienstämme

Zur Plasmidaufreinigung wurden die Vektoren in den *E.coli* Stamm DH5α (Invitrogen) transformiert. Für die Überexpression von Proteinen wurde der *E.coli* Stamm BL 21 Star von Novagen verwendet.

5.1.2 Medien für Bakterien

Zur Kultivierung von Bakterien wurde LB-Medium (Luria Bertani) verwendet, zur Proteinexpression TB-Medium (Terific Broth). Medien und Salzlösungen wurden nach dem Ansetzen separat autoklaviert. Für das TB- Medium wurden die Salzlösungen mit dem Nährmedium erst nach dem Erkalten vereint.
Die Zugabe von Antibiotika erfolgte bei allen Medien direkt vor Gebrauch.

LB-Medium	NaCl	7,5 g/l
	Bacto-Trypton	10 g/l
	Hefeextrakt	5 g/l
	ggf. Ampicillin	100 mg/l
	ggf. Agar	7,5 g/l
TB-Medium	900 ml Nährmedium:	
	Bacto- Trypton	12g
	Hefeextrakt	24g
	Glycerin	4 ml
	ggf. Ampicillin	100 mg/ml
	100 ml Salzlösung:	
	KH_2PO_4	170 mM
	K_2HPO_4	720 mM

5.1.3 Zelllinien und Medien

Alle immunologischen Zelllinien wurden in VLE-RPMI-Medium (very low endotoxin, Biochrom), mit 10% (v/v) fötalem Kälberserum (FKS, Biochrom), 0,1% (w/v) L-Glutamin und 0,1% (w/v) Penicillin/Streptomycin (Biochrom) kultiviert. Alle CHO-Zelllinien wurden in αMEM-Medium, mit 10% fötalem Kälberserum (FCS, Biochrom) und 0,1% (w/v) Penicillin/Streptomycin (Biochrom) kultiviert.

Verwendete Zelllinien: Makrophagen, Dendriten, T- Lymphozyten

Zelle	Ursprung	Haplotyp
Raw264.7	murine primäre Makrophagen aus (BALB/c; ATCC) mit einem durch murines Leukämie Virus induziertem Tumor	d
Raw309 Cr.1	murine primäre Makrophagen aus (C57BL; ATCC) mit einem durch murines Leukämie Virus induziertem Tumor	b x d
D2.4	murine Dendriten aus BALB/c (H. Wagner)	b x d
RMA	murine T- Lymphocyten	
Jurkat	human, Lymphom (ATCC)	

Weitere verwendete Zelllinien:

Zelle	Ursprung
CHO wt	ovarial, Chinesischer Hamster (A. Roebroek)
CHO + CD91	ovarial, Chinesischer Hamster (A. Roebroek)

Die Kultivierung der Zellen erfolgte bei 37°C, 95% relativer Luftfeuchtigkeit und 5% CO_2 in einem Brutschrank (Heraeus). D2.4 und Jurkat Zellen wachsen semiadhärent, und konnten somit durch einfaches Abspülen von der Schale gelöst werden. Die

Ablösung der ausschließlich adhärent wachsenden Raw264.7 und Raw309 Cr.1 Zellen erfolgte hingegen mit Hilfe eines Zellschabers. RMA und Jurkat Zellen wachsen in Suspension. Die adhärent wachsenden CHO-Zellen wurden durch die Behandlung mit Trypsin abgelöst. Alle Zellen wurden dreimal in der Woche 1:20 geteilt und bis max. zur 13 Passage weiter kultiviert.
Während der gesamten Kultivierung wurde der Kontakt zwischen Zellen und Glas strikt vermieden.

5.1.3.1 Einfrieren von Zellen

Je 5 x 10^6 Zellen wurden in 1 ml VLE- RPMI mit 5% DMSO resuspendiert und in Kryoröhrchen überführt. Diese wurden für 20 min bei –20°C und über Nacht (ggf. noch länger) weiter bei -80°C gelagert. Für Langzeitlagerungen kamen die Zellen in flüssigen N_2.

5.1.4 Puffer und Lösungen

für Ni-NTA Aufreinigung (Puffer A): 50 mM NaH_2PO_4
300 mM NaCl
pH-Wert wird mit NaOH auf pH 8,0 eingestellt

für ATP-Agarose (PufferB): 25 mM Hepes/KOH pH 7,6
50 mM KCl
2,5 mM $MgCl_2$
1 mM EDTA
10 mM β-Mercaptoethanol (frisch dazugeben)

PBS (PBS+ falls mit $MgCl_2$): 10 mM Na_2HPO_4
1,8 mM KH_2PO_4
140 mM Nacl
2,7 mM KCl
ggf. 3 mM $MgCl_2$

TBS:	20 mM Tris/NaOH pH 7,5 154 mM NaCl 3 mM $MgCl_2$
MBS:	20 mM MES/ HCl pH 6,5 150 mM NaCl 0,5% Brij 98
K-HOP	25 mM Tris/ HCl, pH 7,5 130 mM KCl + Proteaseinhibitor – Cocktail (Roche)

5.1.5 Plasmide

Für die Expression von hHsp70, hN70 und hC70 wurde das Plasmid pProEx (Invitrogen) verwendet. Hsp70, N70 und C70 wurden über die Restriktionsschnittstellen EcoRI und XhoI inseriert.

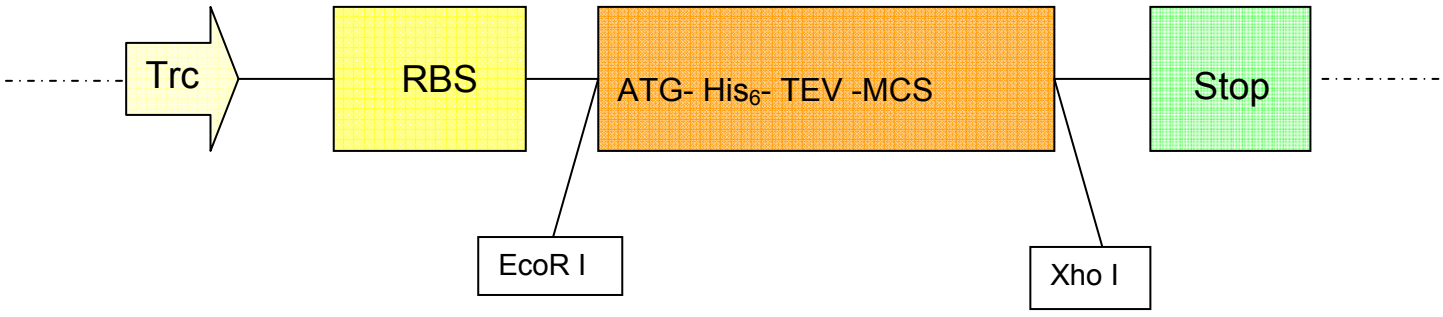

Abb.41: Schematische Darstellung des Expressionsplasmids pProEx. Trc = Trc-Promotor; RBS = Ribosomen- Bindestelle; ATG = Startcodon; His_6 = 6 x His Affinitätsdomäne; TEV = Erkennungsstelle für TEV Protease; MCS = *Multiple Cloning Site* mit entweder Hsp70, N70 oder C70 flankiert von den Restriktionsschnittstellen Eco RI und Xho I.

Neben den in Abb. 41 dargestellten Elementen enthält das 4,7 kb große Plasmid ein Ampicillinresistenzgen, einen f1-Replikationsursprung zur Herstellung einzelsträngiger DNA, sowie das *lac* I^q Repressorgen zur Regulation der Expression.

5.1.6 Primärantikörper

Tab.1 : Verwendete Antikörper

Marker	**Spezies**	**Biologische Funktion**	**Verdünnung**	**Firma**
anti- PDI	Maus, monoklonal	Protein-Disulfidisomerase im ER lokalisiert, involviert in der Prozessierung und Maturierung von sekretorischen Proteinen	1: 20	Stressgen
anti- Rab 5	Maus, monoklonal	GTP- bindendes Protein, welches mit frühen Endosomen assoziert ist und im vesikulären Transport eine Rolle spielen soll	1:20	BD Transduction Laboratories
Lyso Tracker Green			50 nM (Endkonzentration)	Molecular Probes
weitere Antikörper:				
anti- CD40	Kanninchen, polyklonal		1:100 für FACS	Pineda
anti- CD 91	Maus, monoklonal		1:500 für WB	Progen
anti- PentaHis	Maus, monoklonal		1:2000 für WB	Qiagen
Enzyme:				
Streptavidin-HRP			1:5000 für WB	Molecular Probes

5.1.6.1 Herstellung eines polyklonalen CD40 Antikörpers

Zur Herstellung des CD40 Antikörpers wurde das zur Immunisierung verwendete Peptid mit Hilfe von Glutaraldehyd an KLH gekoppelt. Hierzu wurden 8 mg Peptid in 800 µl und 10 mg KLH gemischt und gelöst. Für die Quervernetzung wurde im Abstand von 5 min mehrmals hintereinander gleiche Volumina an 5% Glutaraldehyd dazugegeben bis eine Endkonzentration von 0,1% erreicht war. Anschließend wurde für 30 min auf Eis inkubiert und die Reaktion mit einer 1M Glycin pH 8,4 (bis zu einer Endkonzentration von 25mM) Lösung abgestoppt.

5.1.6.2 Sekundärantikörper

Alle Sekundärantikörper wurden von den Firmen Biorad und Molecular Probes bezogen.

- Ziege-anti-Maus- HRP (polyklonal); Verdünnung im WB 1:5000
- Ziege-anti-Kanninchen (polyklonal); Verdünnung im WB 1:5000
- Ziege-anti-Maus- Alexa 633 (polyklonal); Verdünnung für Immunfloureszenz 1:1000
- Ziege-anti-Kanninchen- Alexa 488 (polyklonal); für FACS 1: 750

5.1.7 Peptid

Das verwendete Peptid OvaBiP wurde mit einem N-terminalen FITC Farbmolekül von R. Piepkorn, DKFZ Heidelberg, synthetisiert.

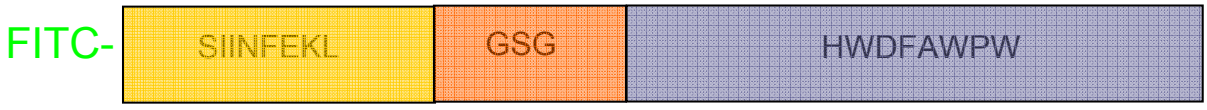

Abb.42 : Schematische Darstellung des Peptids Ova- BiP. FITC = N- terminaler Fluoreszenzfarbstoff; SIINFEKL = MHC I bindende Domäne; GSG = Linker; HWDFAWPW = Javelin, Hsp70 bindende Domäne

5.1.8 Markierung von Proteinen

5.1.8.1 Fluoreszenz-Markierung

Es wurden 1 mg Hsp70, N70 oder C70 mit Alexa 488, Alexa 546 oder Alexa 633-Farbstoff direkt markiert. Freier Farbstoff wurde mittels Gelfiltration abgetrennt. Die markierten Proteine wurden mittels SDS-PAGE und Coomassie-Färbung analysiert. Die Effizienz der Markierung wurde unter Verwendung folgender Formel berechnet:

$$\text{mol Farbstoff/ mol Protein} = \frac{A_{\text{Farbstoff}} \times \text{Verdünnungsfaktor}}{\varepsilon \times \text{Proteinkonzentration (M)}}$$

(A = Absorption bei 494nm für Alexa 488, 558nm für Alexa 546, 635 nm für Alexa 633;
ε = Extinktionskoeffizient für den jeweiligen Farbstoff)

Als Referenzprotein wurde 1 mg BSA mit Alexa 488 markiert.

5.1.8.2 Biotinylierung von Proteinen

Für die Biotinylierung wurden jeweils 2mg/ml Hsp70, N70 und C70 mit einem 20 fachen Überschuss an Sulfo-NHS-SS- Biotin (Pierce) vermischt und für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Um überschüssiges Biotin abzutrennen, folgte ein Dialyse-Schritt gegen PBS (Slide- A- Lyzer MINI Dialysis Units, Pierce). Die Proteine wurden mittels SDS-PAGE und anschließendem Western Blot (vgl. 5.2.4) unter Verwendung von Streptavidin- HRP analysiert.

5.1.9 Herstellung von Hsp70/C70-Peptid-Komplexen

Zur Herstellung von Hsp70-OvaBiP-Komplexen wurden 3 µM Fluoreszenz-markiertes Hsp70 mit einem 20 fachen Überschuss an FITC markiertem Peptid, in Gegenwart von 10 µM ATP, für 15 min bei 37°C inkubiert. Unter Zugabe von 100 µM ADP wurde der Komplex für weitere 30 min bei 37°C inkubiert. Die Beladung von Hsp70 mit OvaBiP konnte anschließend mittels Gelfiltration überprüft werden.

Fluoreszenz-markiertes C70 wurde unter den gleichen Bedingungen wie Hsp70 mit FITC markiertem OvaBiP beladen.
Für den Präsentationsassay wurde Hsp70 wie bereits beschrieben mit einem 20 fachen Überschuss an unmarkiertem OvaBiP inkubiert. Überschüssiges Peptid wurde mittels Gelfiltration abgetrennt. Die Proteinkonzentration der Hsp70-OvaBiP Komplex enthaltenen Fraktionen wurde nach Bradford (vgl. 5.2.3) bestimmt und entsprechende Mengen für den Präsentationsassay eingesetzt.
Die Beladung von C70 erfolgte, aufgrund der fehlenden regulatorischen ATPase Domäne, über Nacht. Hierdurch konnte eine effizientere Beladung von C70 und eine damit verbundene verstärkte Präsentation von SIINFEKL auf MHC-Klasse I erreicht werden.

5.2 Biochemische Methoden

5.2.1 SDS- PAGE Gelelektophorese nach Lämmli (Lämmli, 1970)

Zur Auftrennung von SDS-denaturierenden Proteinen, in Abhängigkeit ihrer molekularen Masse, wurde ein diskontinuierliches Gelsystem verwendet.
Entsprechend der gewünschten Acrylamidkonzentration wurden die entsprechenden Mengen der Stammlösungen gemischt, in eine Gelkassette gegossen und mit Isopropanol überschichtet. Nach abschließender Polymerisation des Trenngels wurde das Isopropanol verworfen und das Trenngel mit Sammelgel überschichtet. Bei konstanter Spannung von 200 V wurde die Gelelektrophorese in 1x SDS-Laufpuffer durchgeführt.

Acrylamid-Lösung (Roth): 30% Acrylamid (w/v)
0,8% N,N´- Methylenbisacrylamid (w/v)
4x-Trenngelpuffer: 1,5 M Tris/HCl pH 8,8
4x-Sammelgelpuffer0,5 M Tris/HCl pH 6,8
10x SDS-Laufpuffer:250 mM Tris
1,92 M Glycin
4% SDS

Acrylamidkonzentration	**7,5% Trenngel**	**10% Trenngel**	**12% Trenngel**	**Sammelgel**
Acrylamid [ml]	2,5	3,3	4,0	1,3
4x TP [ml]	2,5	2,5	2,5	
4x SP [ml]	-	-	-	2,5
H_2O [ml]	4,85	4,05	3,35	6,1
10% SDS (w/v) [µl]	100	100	100	100
10% APS (w/v) [µl]	50	50	50	50
TEMED [µl]	5	5	5	10

5.2.1.1 Probenvorbereitung

Die Proteinproben wurden vor dem Auftragen in die Geltaschen mit 4x SDS-Probenpuffer (auf eine Endkonzentration von 1x SDS- Probenpuffer) versetzt, 5 min bei 95°C erhitzt und abzentrifugiert.

4x SDS- Probenpuffer:	200 mM	Tris/HCl pH 6,8
	12%	β – Mercaptoethanol (v/v)
	8%	SDS (w/v)
	40%	Glycerin (v/v)
	0,2%	Bromphenolblau (w/v)

4x SDS- Probenpuffer (native):	200 mM	Tris/HCl pH 6,8
	8%	SDS (w/v)
	40%	Glycerin (v/v)
	0,2%	Bromphenolblau (w/v)

5.2.1.2 Protein-Molekulargewichtsmarker

Als Molekulargewichtsmarker wurde je nach Fragestellung entweder “all blue prestained Precision Plus“ Marker (Biorad) oder Standard PeqGold von Peqlab verwendet

5.2.2 Färbemethoden für Proteine

5.2.2.1 Coomassie-Färbung

Zur Anfärbung der durch SDS-PAGE aufgetrennten Proteine, wurden die Gele für 20 min in der Coomassie-Färbelösung geschwenkt und anschließend solange mit Entfärbelösung gewaschen bis der gewünschte Färbegrad erreicht war.

Coomassie- Färbelösungen:	40%	Ethanol (v/v)
	10%	Acetat (v/v)
	0,25%	Coomassie R-250 (w/v)
Entfärbelösung:	20%	Ethanol (v/v)
	5%	Essigsäure (v/v)

5.2.2.2 Ponceau Färbung

Durch die Färbung der Membranen mit Ponceau-Rot sollte der Transfer von Proteinen nach einem Western Blot überprüft werden. Hierzu wurde die Membran für 1-2 min bei RT in der Färbelösung geschwenkt und anschließend mit $H_2O_{Milli\text{-}Q}$ entfärbt.

Färbelösung:	0,8%	Ponceau S (w/v)
	4%	TCA

5.2.3 Proteinbestimmung nach Bradford

Die Proteinbestimmung wurde mittels Bradford-Test (BioRad) durchgeführt. Hierzu wurden die zu messenden Proteinlösungen in einem Volumen von insgesamt 800 µl H_2O verdünnt und mit 200 µl Bradford- Reagenz vermischt. Die Eichgerade wurde mit einem BSA Gehalt von 2,5- 20 µg/ml erstellt. Jeweils 200 µl der Probe wurde in eine 96-Loch Platte überführt und in einem ELISA Reader bei 620 nm gemessen. Anhand der Eichgerade konnte die unbekannte Proteinkonzentration ermittelt werden.

5.2.4 Western Blot Analyse

Nach der Proteingelelektrophorese wurden die Proteine durch das Nass- Blot Verfahren auf eine PVDF- Membran (Immobilon-P, Millipore) transferiert.
Hierzu wurde die Membran zunächst mit absolutem Methanol dehydratisiert und dann in 1x Blotpuffer äquilibriert. Je 2 Whatman Filterpapiere (3 mm) wurden mit 2 Schwämme in 1x Blotpuffer äquilibriert und nacheinander in der vorgesehenen Halterung (BioRad) wie folgt gestapelt: ein Schaumstoff, 2 Whatman Filterpapiere, PVDF- Memmbran, Gel, 2 Whatmans und ein Schaumstoff. Mögliche Luftblasen wurden aus dem Stapel entfernt. Bei konstanter Spannung (100 V) wurde für 1 h unter Kühlung geblottet. Nach dem Transfer wurde die Membran mit Ponceau gefärbt, um den Proteintransfer zu überprüfen.

1x Blotpuffer:	36 g	Glycin
	7,5 g	Tris
	0,5 l	Methanol
	2 l	H_2O

Zur Immundetektion wurde die Membran entweder 30 min bei RT oder über Nacht bei 4°C mit 5% Milchpulver in PBS + 0,1% TWEEN (PBS-T) blockiert. Anschließend wurde die Membran 2x für 5 min mit PBS-T gewaschen und für 1 h bei RT mit Erstantikörper (verdünnt in 1,5% BSA in PBS-T) inkubiert. Nach gründlichem Waschen mit PBS-T (2x sofort abgießen, 1x 15 min, 1x 5 min) erfolgte die Inkubation mit Zweitantikörper (1,5% (w/v) Milchpulver in PBS-T) für 30 min bei RT.
Nach dreimaligem Waschen für 5 min erfolgte die ECL Detektion (Amersham Bioscience).

5.2.4.1 Dot Blot

Für die Aufnahme von wässrigen Lösungen wurde die hydrophobe PVDF-Membran wie folgt behandelt: die Membran wurde zunächst mit Methanol benetzt, in PBS-T äquilibriert und dann auf 2 befeuchtete Whatman Filterpapiere gelegt. Anschließend

wurde die Probe in 1µl Schritten punktförmig aufgetragen und wie ein Immunoblot (vgl. 5.2.4) weiterbehandelt.

5.2.4.2 Detektion von Biotin

Zur Detektion biotinylierter Proteine (vgl. 5.1.8.2) erfolgte im Anschluß an die Blockierung für 30 min (RT) die Inkubation mit Streptavidin- HRP (verdünnt in 1% BSA in PBS-T).

5.2.5 Gelfiltration

Um den Oligomerisierungszustand sowohl von Hsp70, N70 als auch C70 zu untersuchen, wurde eine analytische Gelfiltartion durchgeführt. Für Hsp70 und C70 konnte zudem noch der Beladungszustand ermittelt werden. Alle Läufe wurden mit Superdex 200 (Pharmacia) oder Superdex 75 (Pharmacia) Säulen durchgeführt. Die Säule wurde vor Probenzugabe mit filtriertem und entgasten $H_20_{Milli\text{-}Q}$ und PBS gewaschen. Um Proteinaggregate zu entfernen wurden ca. 50 µl (ca. 30-50 µg Protein) der Probe für 15 min bei 100.000 x g und 4°C abzentrifugiert. Bei einer Flussrate von 50 µl/min und 4°C wurde die Probe über die Säule gegeben.
Als Marker wurde der Proteinstandard für Gelfiltrationen von BioRad verwendet. Er enthält Thyroglobulin (670 kD), Rinder γ-Globulin (158 kD), Hühner- Ovalbumin (44 kD), Pferde- Myoglobin (17 kD) und Vitamin B_{12} (1,35 kD).

5.3 Herstellung von rekombinaten Proteinen

Für die Expression der Proteine wurde der *E. coli*- Stamm BL 21 Star von Novagen eingesetzt. Als Expressionssystem für die Herstellung von hHsp70, hN70 und h C70 wurde das Plasmid pProEx von Invitrogen verwendet. Das Plasmid enthält vor der eigentlichen Proteinsequenz eine Sequenz für einen N-terminalen His_6-tag, sowie zur Entfernung der Histidin- Reste eine Erkennungsschnittstelle für die rTEV Protease. Die Proteine wurden, sofern nicht anders angegeben, unter den gleichen Bedingungen aufgereinigt. Am Beispiel von Hsp70 soll repräsentativ für N70 und C70 die Proteinaufreinung dargestellt werden.

5.3.1 Expression in *E.coli*

5.3.1.1 Transformation von pProEx in E. coli BL 21 Star

Mit Hilfe der Hitzeschock-Transformation wurde das entsprechende Plasmid in kompetente *E.coli* BL21 (Typ D3) Star Bakterien eingebracht. Hierzu wurden 5 µl kompetente Bakterien mit 1 µl Plasmid- DNA gemischt und nach 5 min auf Eis für 20 Sekunden bei 42°C ein Hitzeschock herbeigeführt. Nach weiteren 5 min auf Eis wurden 80 µl LB-Medium (vgl. 5.1.2) zugegeben und für 30 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen auf LB-Platten mit Ampicillin (100mg/ml) ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

5.3.1.2 Überexpression in Bakterien

Zur Herstellung der Übernachtkultur wurde jeweils eine Kolonie der entsprechenden LB-Platte gepickt, in 200 ml LB-Medium mit Ampicillin (100 µg/ml) überführt und über Nacht bei 37°C (180rpm) geschüttelt. Die Übernachtkulturen wurden vereint und jeweils 200 ml zu 1800 ml (5 L Kolben) vorgewärmtem TB-Medium mit Ampicillin gegeben. Die Bakterien wurden bei 37°C und 180rpm bis zu einer OD_{600} von ca. 0,6- 0,7 kultiviert. Anschließend erfolgte die Induktion durch Zugabe von IPTG (Endkonzentration von 1 mM). Die Temperatur wurde auf 30°C verringert, um die Aktivität von Proteasen zu reduzieren. Nach 3 h wurden die Bakterien bei 4000 x g für 20 min abzentrifugiert.

5.3.2 Aufreinigung von hHsp70

5.3.2.1 Zellaufschluß

Die Bakterienpellets wurden in 40 ml Puffer A mit 1 Tablette Proteaseinhibitor komplett resuspendiert. Durch eine anschließende Zentrifugation bei 500 x g für 5 min wurden unlösliche Bestandteile abgetrennt. Der Überstand wurde in einem Zellhomogenisator (Emulsiflex C5 von Avestin) mechanisch aufgeschlossen. Durch Zentrifugation bei 100.000 x g für 1 h und 4°C wurden unlösliche Zellbestandteile sowie Proteinaggregate entfernt. Der Überstand wurde für die Proteinisolierung eingesetzt.

5.3.2.2 Ni-NTA Affinitätsreinigung

Die anschließende Proteinaufreinigung erfolgte über den N-terminalen His_6-tag. Hierzu wurde das Zelllysat mit 10mM Imidazol versetzt und über Nacht bei 4°C mit Ni-NTA Agarose (1 ml Bettvolumen/Liter Expressionskultur) inkubiert.

Die beladene Ni-NTA-Agarose wurde dann mit Hilfe einer peristaltischen Pumpe (1 ml/min) in eine Säule (Biorad, ø 1 cm, Länge 10 cm) überführt. Unspezifisch gebundene Proteine wurden durch dreimaliges Waschen mit je 5 Säulenvolumen Puffer A (10 mM Imidazol) entfernt. Zur Elution des His_6- getagten Proteins wurde ein Imidazolgradient von 10 mM → 500 mM über 8 Bettvolumen angelegt. Es wurden 1 ml Fraktionen gesammelt und mittels SDS-PAGE und Coomassie-Färbung analysiert. Fraktionen mit Hsp70 wurden vereint und gegen einen Puffer, der 50mM KCl und 10mM ß-Mercaptoethanol enthielt, bei 4°C dialysiert (Dialyseschlauch von Reichelt Chemietechnik, MWCO 12 000-14 000).

C70 wurde nach Ni-NTA Aufreinigung, aufgrund der fehlenden ATPase Domäne, direkt zweimal gegen PBS dialysiert, und mittels Zentricon (Amicon Ultracel, 10 000 MWCO) auf 1 ml aufkonzentriert.

5.3.2.3 ATP-Affinitätsreinigung

Zur Entfernung von Proteinaggregaten wurde das Dialysat 1 h bei 100.000 x g abzentrifugiert. Die zuvor mit 8 fachem Bettvolumen gewaschene ATP- Agarose (ca.

1 ml Bettvolumen für 8 mg Protein; Jena Bioscience) wurde mit dem löslichen Überstand bei 4°C für 1 h am Drehrad inkubiert. Mit Hilfe einer peristaltischen Pumpe (0,5 ml/min) wurde die beladene ATP-Agarose auf eine Säule überführt. Nach dreimaligem waschen mit a.) 2 Bettvolumen Puffer B, b.) 5 Bettvolumen Puffer B/ 0,5 mM NaCl und c.) 2 Bettvolumen Puffer B erfolgte die Elution über 8 Bettvolumen mit Puffer B (10 mM ATP; pH 7,4/NaOH). Es wurden 1 ml Fraktionen gesammelt und mittels SDS-PAGE und Coomassie-Färbung analysiert. Fraktionen mit Hsp70 wurden vereint und bei 4°C gegen PBS, um vorhandenes ATP zu entfernen, dialysiert.
Das Dialysat wurde mittels Zentricon (Amicon Ultracel, 10 000 MWCO) auf 1 ml aufkonzentriert.

5.3.2.4 Aufreinigung über Detoxi-Gel™ (Polymixin B)

Die Entfernung von bakteriellem Lipopolysaccharid erfolgte durch eine Dekontamination der Proteine über eine Polymixin B Säule.
Die Polymixin B Säule (Pierce) wurde mit 5 Säulenvolumen 1% Natrium-Desoxycholat und 3 - 5 Säulenvolumen pyrogen freiem Wasser (frisch abgefülltes $H_2O_{Milli\text{-}Q}$) gewaschen, bevor mit PBS äquilibriert wurde. Das entsprechende Protein wurde für 1h bei RT mit Detoxi-Gel inkubiert und mit pyrogenfreiem PBS in 100 µl Fraktionen eluiert. Der Proteingehalt jeder Fraktion wurde nach Bradford bestimmt. Fraktionen mit Hsp70 wurden vereint und aliquotiert. Diese wurden in flüssigem N_2 schockgefroren und bei –80°C gelagert. Vor jedem Gebrauch wurden die entsprechenden Proteine bei 4°C 100.000 x g für 30 min abzentrifugiert, um Proteinaggregate zu entfernen.

Die Polymixin B Säule wurde zum Regenerieren mit 5 Säulenvolumen 1% Natrium-Desoxycholat und 3-5 Säulenvolumen pyrogen freiem Wasser gewaschen. Die Säule wurde in 25% ETOH bei 4°C gelagert.
Der Endotoxin- Gehalt wurde mit Hilfe des *Limulus*- Tests (LAL-Test) bestimmt.

5.3.2.5 Limulus Amöbozyten Lysat Test

Der **L**imulus **A**möbozyten **L**ysat (LAL) Test wird als quantitativer Nachweis von bakteriellem Endotoxin eingesetzt. Hierbei wurden die zu untersuchenden Proteine (Hsp70, N70, C70, BSA) mit dem LAL vermischt und für 10 min bei 37°C inkubiert. Nach Zugabe einer Substratlösung und anschließender Inkubation für weitere 6 min bei 37°C, wurde die Reaktion mit Hilfe eines Stop-Reagenz beendet. Enthielt die Probe Endotoxin, so entwickelte sich eine gelbe Farbe, deren Absorption spektrophotometrisch bei 405-410 nm bestimmt werden konnte. Die Absorption ist proportional zur Menge an Endotoxin, wodurch anhand einer Standardkurve die unbekannte Endotoxinkonzentration ermittelt werden konnte.

5.3.2.6 Abspaltung des His-tags

Negative Auswirkungen auf die Bindung von Hsp70 an die Zelloberfläche wurde durch die Entfernung des N-terminalen His_6-tag ausgeschlossen. Hierzu wurde His_6-getagtes Hsp70 mit His_6-getagter Tev-Protease im Verhältnis 25:1 gemischt und für 3 h bei 16°C inkubiert (300rpm).
Zur Entfernung des abgespalteten His_6-tag und der Tev-Protease, wurde die Probe mit ca. 100 µl äquilibrierter Ni-NTA-Agarose (entspricht dem Bettvolumen) für 1h bei 4°C am Drehrad inkubiert. Nach kurzer Zentrifugation wurde der Überstand abgenommen, und die Abspaltung des His_6-tags mittels SDS-PAGE und Western Blot überprüft.
His_6-abgespaltenes Hsp70 wurde zur Fluoreszenzmarkierung eingesetzt.

5.3.2.7 Kontrollproteine

Als Kontrolle diente sowohl Fluoreszenz-markiertes (Molecular Probes) BSA als auch aus Schweinehirn isoliertes Hsc70 (MPI, Martinsried).

5.4 Zellbiologische Arbeiten

5.4.1 Fluoreszenz-Mikroskopie

Für die mikroskopischen und zellulären Arbeiten wurde vorwiegend die Maus Makrophagen Zelllinie Raw264.7 verwendet. Bei allen Experimenten wurden die Zellen 24 h vorher in 24-Loch Platten auf Deckgläschen gesetzt. Alle Proteine bzw. Peptide wurden Fluoreszenz-markiert (im weiteren Text mit * markiert) eingesetzt, und vor jedem Gebrauch 30 min 100.000 x g abzentrifugiert. Die Deckgläschen wurden mit der Zelloberseite nach unten in 30 - 50µl Probe inkubiert. Die Analysen wurden am konfokalen Mikroskop LSM 510 meta von C. Zeiss durchgeführt.

5.4.1.1 Bindungsexperimente

Diese Versuche wurden an der Maus Makrophagen Zelllinie Raw264.7, Raw309 Cr.1 sowie der Maus Dendriten Zellinie D2.4 durchgeführt.
3 µM Fluoreszenz- markiertes Hsp70 (+/- His-tag), N70, C70 oder BSA wurden für 30 min 37°C in Gegenwart von 100 µM ADP in TBS inkubiert. Die angegebenen Zellen wurden anschließend mit dem jeweiligen Protein für 30 min auf Eis inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit TBS und Fixierung mit 3% PFA (w/v) PBS für 20 min auf Eis, erfolgte die Einbettung in Mowiol.

5.4.1.1.1 Kompetitionsexperimente

Raw264.7 Zellen wurden mit 1 µM Hsp70* in Gegenwart von einem 10 fachen Überschuss an unmarkiertem Hsp70, N70 oder C70 für 30 min auf Eis inkubiert.

Nach dreimaligem Waschen mit TBS und Fixierung mit 3% PFA (w/v), wurden die Zellen im konfokalen Mikroskop untersucht.
Für beladenes C70* oder N70* wurden entsprechende Experimente durchgeführt. Raw264.7 Zellen wurden mit 1µM Fluoreszenz-markiertem N70 in Gegenwart von einem 10 fachen Überschuss an unmarkiertem C70, N70 oder Hsp70 inkubiert.
Anschließend wurde nicht gebundenes Protein entfernt, die Zellen mit 2% (w/v) Paraformaldehyd fixiert und analysiert. Für beladenes C70 wurden die gleichen Bedingungen gewählt, mit Ausnahme der Kompetitoren. Hier wurde ein 10 facher Überschuss an unmarkiertem N70, C70 oder Hsp70 als Kompetitoren eingesetzt. Die Versuche wurden in Gegenwart eines 10 fachen Überschusses an unmarkiertem Rinderserumalbumin durchgeführt.

5.4.1.2 Anbindung und Aufnahme

Raw264.7 Zellen wurden mit 3 µM Hsp70*-OvaBiP*-Komplex für 30 min auf Eis inkubiert, gewaschen und fixiert.
Für die Aufnahme des Komplexes wurden die Zellen nach Anbindung erneut gewaschen und in 37°C vorgewärmtem Medium überführt. Zu den angegebenen Zeiten wurden die Deckgläschen entnommen, die Zellen mit 2% (w/v) PFA fixiert und in Mowiol eingedeckt.
Die Anbindung und Aufnahme von N70* und beladenem Fluoreszenz- markiertem C70 wurde unter den gleichen Bedingungen wie Hsp70*-OvaBiP* durchgeführt.

5.4.1.3 Immunfluoreszenzen

Raw264.7 Zellen wurden mit je 3 µM Hsp70*-OvaBiP* oder nur Hsp70* für 30 min auf Eis inkubiert. Die Zellen wurden anschließend gewaschen und fixiert. Für die angegebenen Zeitpunkte wurden die Deckgläschen in das 19°C bzw. 37°C vorgewärmte Medium überführt. Die Aufnahme des Hsp70*-OvaBiP*-Komplexes wurde durch einen 4°C Block abgestoppt und die Zellen fixiert.

Fixieren von Zellen:

- Methanol: die Zellen wurden 20 sec mit -20°C kaltem Methanol fixiert und gleichzeitig permeabilisiert.
- 80% Methanol (v/v) / 20% Aceton (v/v): die Zellen wurden 10 sec mit -20°C kaltem Methanol fixiert und gleichzeitig permeabilisiert.

Die Blockierung erfolgte für 10 min in 1% BSA TBS. Anschließend wurden die Deckgläschen für 30 min bei 37°C mit dem Erstantikörper inkubiert. Nach dreimaligem Waschen erfolgte bei 37°C für 30 min die Inkubation mit dem Zweitantikörper. Nach Entfernen von ungebundenem Zweitantikörper wurden die Proben kurz in H_2O gewaschen und in Mowiol eingebettet. Die Dokumentation wurde am konfokalen Mikroskop durchgeführt.

5.4.2 Durchflusszytometrie (FACS)

5.4.2.1 Anbindung

Um die Anbindung von Hsp70 an weiteren Zelltypen zu testen, wurde 1µM Fluoreszenz-markiertes Hsp70 mit 1 x 10^6 Raw264.7, D2.4, RMA sowie Jurkat Zellen für 30 min 4°C inkubiert. Ungebundenes Protein wurde durch Waschen entfernt und die Zellen unter Zugabe von Propidium Jodid (1:1000) mittels Durchflusszytometrie (Beckton Dickinson) analysiert.

5.4.2.2 Kompetitionsexperiment

1 x 10^6 Raw 264.7 Zellen wurden mit 1 µM fluoreszenz- markiertem Hsp70, N70 oder C70 in Gegenwart eines 10 fachen Überschusses an entsprechenden Kompetitoren für 30 min auf Eis inkubiert. Ungebundenes Protein wurde durch Waschen entfernt, die Zellen in 3% PFA (w/v) aufgenommen und anschließend mittels Durchflusszytometrie analysiert.

5.4.2.3 Kompetitionsexperimente mit unterschiedlichen Liganden

Als mögliche Kompetitoren für die bereits postulierten Hsp70 Rezeptoren wurden Poly [A], Poly [I] (SIGMA) und ein Antikörper gegen CD40 eingesetzt. 1×10^6 Raw264.7 Zellen wurden mit einem 10 fachen Überschuss an entsprechenden Kompetitoren für 30 min auf Eis vorinkubiert. Nach zwei Waschschritten wurden die Zellen für weitere 30 min mit 1 µM N70* oder C70* inkubiert. Ungebundenes Protein

wurde durch Waschen entfernt, und die Zellen unter Zugabe von Propidium Jodid mittels Durchflusszytometrie analysiert.

5.4.3 CD91 Nachweis

Um CD91 als Rezeptor für die Anbindung von Hsp70 zu untersuchen, wurden die Maus Makrophagenzelllinien Raw264.7 und Raw309 Cr.1, sowie als Referenz die von A. Roebroek generierte, mit CD91 stabil transfizierte CHO (CHO+CD91) und CHO Wildtyp (CHOwt) verwendet.

5.4.3.1 Exotoxin A Test

Exotoxin A aus *Pseudomas aerigunosa* ist ein Zellgift, welches über CD91 aufgenommen wird. Somit ist es möglich über das Toxin die Funktionalität von CD91 zu überprüfen. Die entsprechenden Zelllinien wurden in 6-Loch Platten so umgesetzt, dass sie am nächsten Tag zu ca. 50% konfluent waren. Nach Zugabe von 1 µg/ml Exotoxin A (Sigma) wurden die Zellen nach 24 h, 48 h und 72 h unter dem Lichtmikrsoskop untersucht.

5.4.3.2 Immunoblot

Die entsprechenden Zelllinien wurden in 20 cm Schalen kultiviert. Zum Ernten wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen, um tote Zellen zu entfernen. Mit Hilfe eines Zellschabers wurden die Zellen von der Platte gelöst und in 2 ml K-HOP

mit Proteaseinhibitor (EDTA free, Roche) aufgenommen. Die Zellen wurden durch wiederholtes Pressen durch eine Kanüle (G27, Braun, ø 0,4mm) mechanisch lysiert. Die Effizienz der Lyse wurde mittels Trypanblau-Färbung überprüft. Mit einem ersten Zentrifugationschritt für 15 min bei 3000 x g wurden Zelltrümmer, Zellkerne und nicht lysierte Zellen abgetrennt. In einem zweiten Zentrifugationsschritt, 1h bei 100.000 x g und 4°C, wurden Membranbestandteile von löslichen Bestandteilen abgetrennt. Das Membranpellet wurde in K-HOP Puffer mit 0,1% (w/v) SDS solubilisiert und die Proteinkonzentration der Proben nach Bradford bestimmt.

Von den Proben wurden gleiche Proteinmengen auf ein SDS-PAGE Gel aufgetragen und im Immunoblot mittels eines CD91 Antikörpers auf CD91 Expression untersucht.

5.4.4 Separierung von Detergens- Resistenten Mikrodomänen (DRM)

Die Möglichkeit zweier Bindungsdomänen von Hsp70 wurde in einer Fraktionierung von DRM überprüft. Hierzu wurden 3 x 10^6 Raw264.7 Zellen verwendet. Um tote Zellen zu entfernen, wurden die Zellen zweimal mit TBS gewaschen und für 30 min auf Eis mit 3 µM biotinyliertem Hsp70, N70 oder C70 inkubiert. Ungebundenes Protein wurde durch Waschen entfernt, die Zellen in 400µl MBS-Puffer mit 0,5% Brij 98 (mit Proteaseinhibitor-Cocktail, Roche) aufgenommen und für 30 min auf Eis inkubiert (alle 10 min kurz vortexen). Zur vollständigen Lyse wurden die Zellen wiederholt durch eine Kanüle (G27, Braun, ø 0,4mm) gepresst und mittels Trypanblau-Färbung auf ihre Vitalität hin untersucht. Bei einer Mortalität von ca. 90% wurde das Lysat für 5 min bei 800 x g abzentrifugiert, um Zelltrümmer, Zellkerne und nicht lysierte Zellen zu entfernen. Der Überstand (*post nuclear supernatant,* PNS) wurde mit einer 60% Optiprep-Lösung (SIGMA) vermischt bis eine Endkonzentration von 40% erreicht war. Diese wurde auf den Boden eines SW 60 Röhrchen (Beckman) gesetzt. Die Probe wurde danach mit 2,5 ml einer 28% Optipreplösung und anschließend mit 600µl MBS-Puffer mit 0,5% Brij 98 überschichtet. Die Gradienten wurden für 3h bei 100.000 x g und 4°C im SW 60 (Beckman)

zentrifugiert. Jeweils 8 Fraktionen à 500µl wurden entnommen und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

5.4.4.1 Detektion über Western Blot

Jeweils 100µl einer Fraktion wurde 1: 15 mit MBS-Puffer ohne Brij 98 verdünnt, und für 2h bei 100.000 x g 4°C abzentrifugiert. Die Pellets wurden in 3 x nativen SDS-Probenpuffer resuspendiert und über Nacht bei 37°C solubilisiert. Die Proben wurden für 5 min bei 95°C erhitzt und auf ein SDS-PAGE Gel aufgetragen. Nach anschließendem Western Blot wurde über Streptavidin- HRP detektiert.

5.4.4.2 GM 1 Nachweis

Als DRM-Marker wurde HRP- gekoppeltes Choleratoxin-B verwendet, welches spezifisch mit dem DRM-Glykolipid GM 1 interagiert (Blank et al., 2002).
Hierfür wurde 1% jeder Fraktion punktförmig (vgl. 5.4.2.1) auf eine äquilibriert PVDF-Membran aufgetragen und getrocknet. Die Blockierung erfolgte mit 5% Milchpulver in PBS-T. Nach mehreren Waschschritten wurde die Membran mit 0,1µg/ml Choleratoxin- HRP (Untereinheit B, List BioLabs) in 2% BSA/PBS-T für 30 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde dreimal gewaschen und mit ECL detektiert.

5.4.5 Stimulations- Experimente an Raw264.7 Zellen

Durch LPS kann die Makropinozytose induziert werden (West et al., 2004). Dieser Effekt sollte für Hsp70 an Raw264.7 Makrophagen untersucht werden.
Als Stimulations-Substanzen wurde endotoxin-depletiertes Hsp70, N70 sowie C70 eingesetzt. Als Referenz diente BSA.

5.4.5.1 Fluoreszenz Mikroskopie

Raw 264.7 Zellen wurden mit 3 µM Hsp70, N70, C70 oder BSA für 30 min auf Eis inkubiert. Nach zweimaligem Waschen wurden die Zellen in 37°C vorgewärmten VLE- RPMI Medium überführt und für 5 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden

die Zellen mit einem 20 fachen Überschuss an FITC markiertem OvaBiP für weitere 5 min bei 37°C inkubiert. Nach Entfernen von ungebundenem Peptid wurden die Zellen im konfokalen Mikroskop analysiert.

5.4.6 Kreuzpräsentations-Test

Die Beladung von Hsp70 und C70 mit unmarkiertem OvaBiP erfolgte wie unter Punkt 5.1.9. beschrieben. Freies Peptid wurde mittels Gelfiltration abgetrennt. Fraktionen mit Hsp70- bzw. C70- OvaBiP-Komplex wurden vereint und die Proteinkonzentration nach Bradford bestimmt.
D2.4 Zellen wurden und mit den jeweils angegebenen Konzentrationen an Hsp70/C70-Peptid-Komplex für 30 min bei 4°C inkubiert. Anschließend wurden D2.4 Zellen für 4h bei 37°C mit den B3Z T–Zell Hybridoma Zellen coinkubiert. Abschließend wurden die Zellen lysiert und die Aktivität der ß-Galaktosidase über das chromogene Substrat CPRG bestimmt. Für die Kompetitionsversuche wurden die D2.4 Zellen mit den angegebenen Hsp70-OvaBiP Konzentrationen in Gegenwart der jeweiligen Kompetitoren inkubiert, gewaschen und über die B3Z T-Zelllinie analysiert.

Literaturverzeichnis

Ackerman, A.L., Kyritsis, C., Tampe, R. and Cresswell, P. (2005) Access of soluble antigens to the endoplasmic reticulum can explain cross-presentation by dendritic cells. *Nat Immunol*, **6**, 107-113.

Aderem, A. and Underhill, D.M. (1999) Mechanisms of phagocytosis in macrophages. *Annu Rev Immunol*, **17**, 593-623.

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

Alberts,B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P. (2002) Molecular Biology of the Cell. Fourth Edition

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

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

Asea, A., Kraeft, S.K., Kurt-Jones, E.A., Stevenson, M.A., Chen, L.B., Finberg, R.W., Koo, G.C. and Calderwood, S.K. (2000) HSP70 stimulates cytokine production through a CD14-dependant pathway, demonstrating its dual role as a chaperone and cytokine. *Nat Med*, **6**, 435-442.

Asea, A., Rehli, M., Kabingu, E., Boch, J.A., Bare, O., Auron, P.E., Stevenson, M.A. and Calderwood, S.K. (2002) Novel signal transduction pathway utilized by extracellular HSP70: role of toll-like receptor (TLR) 2 and TLR4. *J Biol Chem*, **277**, 15028-15034.

Ballinger, C.A., Connell, P., Wu, Y., Hu, Z., Thompson, L.J., Yin, L.Y. and Patterson, C. (1999) Identification of CHIP, a novel tetratricopeptide repeat-containing protein that interacts with heat shock proteins and negatively regulates chaperone functions. *Mol Cell Biol*, **19**, 4535-4545.

Banner, D.W., D'Arcy, A., Janes, W., Gentz, R., Schoenfeld, H.J., Broger, C., Loetscher, H. and Lesslauer, W. (1993) Crystal structure of the soluble human

55 kd TNF receptor-human TNF beta complex: implications for TNF receptor activation. *Cell*, **73**, 431-445.

Basu, S., Binder, R.J., Ramalingam, T. and Srivastava, P.K. (2001) CD91 is a common receptor for heat shock proteins gp96, hsp90, hsp70, and calreticulin. *Immunity*, **14**, 303-313.

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

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

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

Becker, T., Hartl, F.U. and Wieland, F. (2002) CD40, an extracellular receptor for binding and uptake of Hsp70-peptide complexes. *J Cell Biol*, **158**, 1277-1285.

Benveniste, E.N., Nguyen, V.T. and Wesemann, D.R. (2004) Molecular regulation of CD40 gene expression in macrophages and microglia. *Brain Behav Immun*, **18**, 7-12.

Berwin, B. and Nicchitta, C.V. (2001) To find the road traveled to tumor immunity: the trafficking itineraries of molecular chaperones in antigen-presenting cells. *Traffic*, **2**, 690-697.

Berwin, B., Rosser, M.F., Brinker, K.G. and Nicchitta, C.V. (2002) Transfer of GRP94(Gp96)-associated peptides onto endosomal MHC class I molecules. *Traffic*, **3**, 358-366.

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

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

Binder, R.J., Karimeddini, D. and Srivastava, P.K. (2001) Adjuvanticity of alpha 2-macroglobulin, an independent ligand for the heat shock protein receptor CD91. *J Immunol*, **166**, 4968-4972.

Binder, R.J. and Srivastava, P.K. (2005) Peptides chaperoned by heat-shock proteins are a necessary and sufficient source of antigen in the cross-priming of CD8+ T cells. *Nat Immunol*, **6**, 593-599.

Binder, R.J., Vatner, R. and Srivastava, P. (2004) The heat-shock protein receptors: some answers and more questions. *Tissue Antigens*, **64**, 442-451.

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

Blank, N., Gabler, C., Schiller, M., Kriegel, M., Kalden, J.R. and Lorenz, H.M. (2002) A fast, simple and sensitive method for the detection and quantification of detergent-resistant membranes. *J Immunol Methods*, **271**, 25-35.

Bodmer, J.L., Schneider, P. and Tschopp, J. (2002) The molecular architecture of the TNF superfamily. *Trends Biochem Sci*, **27**, 19-26.

Brode, S. and Macary, P.A. (2004) Cross-presentation: dendritic cells and macrophages bite off more than they can chew! *Immunology*, **112**, 345-351.

Brodsky, F.M., Chen, C.Y., Knuehl, C., Towler, M.C. and Wakeham, D.E. (2001) Biological basket weaving: formation and function of clathrin-coated vesicles. *Annu Rev Cell Dev Biol*, **17**, 517-568.

Bukau, B. and Horwich, A.L. (1998) The Hsp70 and Hsp60 chaperone machines. *Cell*, **92**, 351-366.

Carbone, F.R., Kurts, C., Bennett, S.R., Miller, J.F. and Heath, W.R. (1998) Cross-presentation: a general mechanism for CTL immunity and tolerance. *Immunol Today*, **19**, 368-373.

Cardelli, J. (2001) Phagocytosis and macropinocytosis in Dictyostelium: phosphoinositide-based processes, biochemically distinct. *Traffic*, **2**, 311-320.

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

Cavalli, V., Corti, M. and Gruenberg, J. (2001) Endocytosis and signaling cascades: a close encounter. *FEBS Lett*, **498**, 190-196.

Chan, F.K., Chun, H.J., Zheng, L., Siegel, R.M., Bui, K.L. and Lenardo, M.J. (2000) A domain in TNF receptors that mediates ligand-independent receptor assembly and signaling. *Science*, **288**, 2351-2354.

Chavrier, P. and Goud, B. (1999) The role of ARF and Rab GTPases in membrane transport. *Curr Opin Cell Biol*, **11**, 466-475.

Connell, P., Ballinger, C.A., Jiang, J., Wu, Y., Thompson, L.J., Hohfeld, J. and Patterson, C. (2001) The co-chaperone CHIP regulates protein triage decisions mediated by heat-shock proteins. *Nat Cell Biol*, **3**, 93-96.

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

Cresswell, P., Bangia, N., Dick, T. and Diedrich, G. (1999) The nature of the MHC class I peptide loading complex. *Immunol Rev*, **172**, 21-28.

Delneste, Y., Magistrelli, G., Gauchat, J., Haeuw, J., Aubry, J., Nakamura, K., Kawakami-Honda, N., Goetsch, L., Sawamura, T., Bonnefoy, J. and Jeannin, P. (2002) Involvement of LOX-1 in dendritic cell-mediated antigen cross-presentation. *Immunity*, **17**, 353-362.

den Haan, J.M. and Bevan, M.J. (2002) Constitutive versus activation-dependent cross-presentation of immune complexes by CD8(+) and CD8(-) dendritic cells in vivo. *J Exp Med*, **196**, 817-827.

Desjardins, M. (2003) ER-mediated phagocytosis: a new membrane for new functions. *Nat Rev Immunol*, **3**, 280-291.

Desjardins, M. and Griffiths, G. (2003) Phagocytosis: latex leads the way. *Curr Opin Cell Biol*, **15**, 498-503.

Desjardins, M., Houde, M. and Gagnon, E. (2005) Phagocytosis: the convoluted way from nutrition to adaptive immunity. *Immunol Rev*, **207**, 158-165.

Desjardins, M., Huber, L.A., Parton, R.G. and Griffiths, G. (1994) Biogenesis of phagolysosomes proceeds through a sequential series of interactions with the endocytic apparatus. *J Cell Biol*, **124**, 677-688.

Dziarski, R., Viriyakosol, S., Kirkland, T.N. and Gupta, D. (2000) Soluble CD14 enhances membrane CD14-mediated responses to peptidoglycan: structural requirements differ from those for responses to lipopolysaccharide. *Infect Immun*, **68**, 5254-5260.

Ellis, J. (1987) Proteins as molecular chaperones. *Nature*, **328**, 378-379.

Ellis, R.J., van der Vies, S.M. and Hemmingsen, S.M. (1989) The molecular chaperone concept. *Biochem Soc Symp*, **55**, 145-153.

Esser, C., Alberti, S. and Hohfeld, J. (2004) Cooperation of molecular chaperones with the ubiquitin/proteasome system. *Biochim Biophys Acta*, **1695**, 171-188.

Farmery, M.R., Allen, S., Allen, A.J. and Bulleid, N.J. (2000) The role of ERp57 in disulfide bond formation during the assembly of major histocompatibility complex class I in a synchronized semipermeabilized cell translation system. *J Biol Chem*, **275**, 14933-14938.

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

FitzGerald, D.J., Fryling, C.M., Zdanovsky, A., Saelinger, C.B., Kounnas, M., Winkles, J.A., Strickland, D. and Leppla, S. (1995) Pseudomonas exotoxin-mediated selection yields cells with altered expression of low-density lipoprotein receptor-related protein. *J Cell Biol*, **129**, 1533-1541.

Fruci, D., Rovero, P., Butler, R.H., Sorrentino, R., Tosi, R. and Tanigaki, N. (1993) HLA class I binding of synthetic nonamer peptides carrying major anchor residue motifs of HLA-B27 (B*2705)-binding peptides. *Immunogenetics*, **38**, 41-46.

Frydman, J. (2001) Folding of newly translated proteins in vivo: the role of molecular chaperones. *Annu Rev Biochem*, **70**, 603-647.

Funatsu, N., Kumanogoh, H., Sokawa, Y. and Maekawa, S. (2000) Identification of gelsolin as an actin regulatory component in a triton insoluble low density fraction (raft) of newborn bovine brain. *Neurosci Res*, **36**, 311-317.

Gagescu, R., Gruenberg, J. and Smythe, E. (2000) Membrane dynamics in endocytosis: structure--function relationship. *Traffic*, **1**, 84-88.

Gagnon, E., Duclos, S., Rondeau, C., Chevet, E., Cameron, P.H., Steele-Mortimer, O., Paiement, J., Bergeron, J.J. and Desjardins, M. (2002) Endoplasmic reticulum-mediated phagocytosis is a mechanism of entry into macrophages. *Cell*, **110**, 119-131.

Gallucci, S., Lolkema, M. and Matzinger, P. (1999) Natural adjuvants: endogenous activators of dendritic cells. *Nat Med*, **5**, 1249-1255.

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

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

Gardner, R.G., Nelson, Z.W. and Gottschling, D.E. (2005) Degradation-mediated protein quality control in the nucleus. *Cell*, **120**, 803-815.

Garin, J., Diez, R., Kieffer, S., Dermine, J.F., Duclos, S., Gagnon, E., Sadoul, R., Rondeau, C. and Desjardins, M. (2001) The phagosome proteome: insight into phagosome functions. *J Cell Biol*, **152**, 165-180.

Gassler, C.S., Wiederkehr, T., Brehmer, D., Bukau, B. and Mayer, M.P. (2001) Bag-1M accelerates nucleotide release for human Hsc70 and Hsp70 and can act concentration-dependent as positive and negative cofactor. *J Biol Chem*, **276**, 32538-32544.

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

Glas, R., Bogyo, M., McMaster, J.S., Gaczynska, M. and Ploegh, H.L. (1998) A proteolytic system that compensates for loss of proteasome function. *Nature*, **392**, 618-622.

Glickman, M.H. (2000) Getting in and out of the proteasome. *Semin Cell Dev Biol*, **11**, 149-158.

Goldstein, J.L. and Brown, M.S. (1985) The LDL receptor and the regulation of cellular cholesterol metabolism. *J Cell Sci Suppl*, **3**, 131-137.

Goloubinoff, P., Mogk, A., Zvi, A.P., Tomoyasu, T. and Bukau, B. (1999) Sequential mechanism of solubilization and refolding of stable protein aggregates by a bichaperone network. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96**, 13732-13737.

Gross, C., Schmidt-Wolf, I.G., Nagaraj, S., Gastpar, R., Ellwart, J., Kunz-Schughart, L.A. and Multhoff, G. (2003) Heat shock protein 70-reactivity is associated with increased cell surface density of CD94/CD56 on primary natural killer cells. *Cell Stress Chaperones*, **8**, 348-360.

Guermonprez, P., Saveanu, L., Kleijmeer, M., Davoust, J., Van Endert, P. and Amigorena, S. (2003) ER-phagosome fusion defines an MHC class I cross-presentation compartment in dendritic cells. *Nature*, **425**, 397-402.

Hacker, U., Albrecht, R. and Maniak, M. (1997) Fluid-phase uptake by macropinocytosis in Dictyostelium. *J Cell Sci*, **110 (Pt 2)**, 105-112.

Hampton, R.Y. (2002) ER-associated degradation in protein quality control and cellular regulation. *Curr Opin Cell Biol*, **14**, 476-482.

Hampton, R.Y., Golenbock, D.T., Penman, M., Krieger, M. and Raetz, C.R. (1991) Recognition and plasma clearance of endotoxin by scavenger receptors. *Nature*, **352**, 342-344.

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

Hartl, F.U. and Hayer-Hartl, M. (2002) Molecular chaperones in the cytosol: from nascent chain to folded protein. *Science*, **295**, 1852-1858.

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

Hendrick, J.P., Langer, T., Davis, T.A., Hartl, F.U. and Wiedmann, M. (1993) Control of folding and membrane translocation by binding of the chaperone DnaJ to nascent polypeptides. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **90**, 10216-10220.

Herz, J. and Strickland, D.K. (2001) LRP: a multifunctional scavenger and signaling receptor. *J Clin Invest*, **108**, 779-784.

Houde, M., Bertholet, S., Gagnon, E., Brunet, S., Goyette, G., Laplante, A., Princiotta, M.F., Thibault, P., Sacks, D. and Desjardins, M. (2003) Phagosomes are competent organelles for antigen cross-presentation. *Nature*, **425**, 402-406.

Ichihara, A. and Tanaka, K. (1995) Roles of proteasomes in cell growth. *Mol Biol Rep*, **21**, 49-52.

Jacobson, K. and Dietrich, C. (1999) Looking at lipid rafts? *Trends Cell Biol*, **9**, 87-91.

Janeway, C.A., Jr. (2002) A trip through my life with an immunological theme. *Annu Rev Immunol*, **20**, 1-28.

Jutras, I. and Desjardins, M. (2005) Phagocytosis: at the crossroads of innate and adaptive immunity. *Annu Rev Cell Dev Biol*, **21**, 511-527.

Kang, P.J., Ostermann, J., Shilling, J., Neupert, W., Craig, E.A. and Pfanner, N. (1990) Requirement for hsp70 in the mitochondrial matrix for translocation and folding of precursor proteins. *Nature*, **348**, 137-143.

Karnovsky, M.L. (1981) Metchnikoff in Messina: a century of studies on phagocytosis. *N Engl J Med*, **304**, 1178-1180.

Kita, T. (1999) LOX-1, a possible clue to the missing link between hypertension and atherogenesis. *Circ Res*, **84**, 1113-1115.

Kita, T., Kume, N., Yokode, M., Ishii, K., Arai, H., Horiuchi, H., Moriwaki, H., Minami, M., Kataoka, H. and Wakatsuki, Y. (2000) Oxidized-LDL and atherosclerosis. Role of LOX-1. *Ann N Y Acad Sci*, **902**, 95-100; discussion 100-102.

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

Klein, J. and Sato, A. (2000b) The HLA system. Second of two parts. *N Engl J Med*, **343**, 782-786.

Kodama, T., Freeman, M., Rohrer, L., Zabrecky, J., Matsudaira, P. and Krieger, M. (1990) Type I macrophage scavenger receptor contains alpha-helical and collagen-like coiled coils. *Nature*, **343**, 531-535.

Kume, N. and Kita, T. (2001) Lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor-1 (LOX-1) in atherogenesis. *Trends Cardiovasc Med*, **11**, 22-25.

Kurts, C., Heath, W.R., Carbone, F.R., Kosaka, H. and Miller, J.F. (1998) Cross-presentation of self antigens to CD8+ T cells: the balance between tolerance and autoimmunity. *Novartis Found Symp*, **215**, 172-181; discussion 181-190.

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

Langer, T. and Neupert, W. (1991) Heat shock proteins hsp60 and hsp70: their roles in folding, assembly and membrane translocation of proteins. *Curr Top Microbiol Immunol*, **167**, 3-30.

Langer, T. and Neupert, W. (1996) Regulated protein degradation in mitochondria. *Experientia*, **52**, 1069-1076.

Li, Y., Wood, N., Yellowlees, D. and Donnelly, P. (1997) Expression of alpha 2 macroglobulin receptor/low density lipoprotein receptor-related protein is cell

culture density-dependent in human breast cancer cell line BT-20. *Biochem Biophys Res Commun*, **240**, 122-127.

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

Lilley, B.N. and Ploegh, H.L. (2004) A membrane protein required for dislocation of misfolded proteins from the ER. *Nature*, **429**, 834-840.

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

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

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

Marrack, P., Hannum, C., Harris, M., Haskins, K., Kubo, R., Pigeon, M., Shimonkevitz, R., White, J. and Kappler, J. (1983) Antigen-specific, major histocompatibility complex-restricted T cell receptors. *Immunol Rev*, **76**, 131-145.

Matzinger, P. (2002) The danger model: a renewed sense of self. *Science*, **296**, 301-305.

McCoy, S.L., Kurtz, S.E., Hausman, F.A., Trune, D.R., Bennett, R.M. and Hefeneider, S.H. (2004) Activation of RAW264.7 macrophages by bacterial DNA and lipopolysaccharide increases cell surface DNA binding and internalization. *J Biol Chem*, **279**, 17217-17223.

McDonough, H. and Patterson, C. (2003) CHIP: a link between the chaperone and proteasome systems. *Cell Stress Chaperones*, **8**, 303-308.

Means, T.K., Lien, E., Yoshimura, A., Wang, S., Golenbock, D.T. and Fenton, M.J. (1999) The CD14 ligands lipoarabinomannan and lipopolysaccharide differ in their requirement for Toll-like receptors. *J Immunol*, **163**, 6748-6755.

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

Medzhitov, R. and Janeway, C.A., Jr. (2000b) How does the immune system distinguish self from nonself? *Semin Immunol*, **12**, 185-188; discussion 257-344.

Mellman, I. (1996) Endocytosis and molecular sorting. *Annu Rev Cell Dev Biol*, **12**, 575-625.

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

Miki, S., Tsukada, S., Nakamura, Y., Aimoto, S., Hojo, H., Sato, B., Yamamoto, M. and Miki, Y. (1996) Functional and possible physical association of scavenger receptor with cytoplasmic tyrosine kinase Lyn in monocytic THP-1-derived macrophages. *FEBS Lett*, **399**, 241-244.

Mohrmann, K. and van der Sluijs, P. (1999) Regulation of membrane transport through the endocytic pathway by rabGTPases. *Mol Membr Biol*, **16**, 81-87.

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

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

Mousavi, S.A., Malerod, L., Berg, T. and Kjeken, R. (2004) Clathrin-dependent endocytosis. *Biochem J*, **377**, 1-16.

Mukherjee, S., Ghosh, R.N. and Maxfield, F.R. (1997) Endocytosis. *Physiol Rev*, **77**, 759-803.

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

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

Nguyen, V.T. and Benveniste, E.N. (2002) Critical role of tumor necrosis factor-alpha and NF-kappa B in interferon-gamma -induced CD40 expression in microglia/macrophages. *J Biol Chem*, **277**, 13796-13803.

Noessner, E., Gastpar, R., Milani, V., Brandl, A., Hutzler, P.J., Kuppner, M.C., Roos, M., Kremmer, E., Asea, A., Calderwood, S.K. and Issels, R.D. (2002) Tumor-derived heat shock protein 70 peptide complexes are cross-presented by human dendritic cells. *J Immunol*, **169**, 5424-5432.

Norbury, C.C. (2006) Drinking a lot is good for dendritic cells. *Immunology*, **117**, 443-451.

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

Norkin, L.C., Anderson, H.A., Wolfrom, S.A. and Oppenheim, A. (2002) Caveolar endocytosis of simian virus 40 is followed by brefeldin A-sensitive transport to the endoplasmic reticulum, where the virus disassembles. *J Virol*, **76**, 5156-5166.

Ohashi, K., Burkart, V., Flohe, S. and Kolb, H. (2000) Cutting edge: heat shock protein 60 is a putative endogenous ligand of the toll-like receptor-4 complex. *J Immunol*, **164**, 558-561.

Palade, G.E. (1953) An electron microscope study of the mitochondrial structure. *J Histochem Cytochem*, **1**, 188-211.

Peiser, L. and Gordon, S. (2001) The function of scavenger receptors expressed by macrophages and their role in the regulation of inflammation. *Microbes Infect*, **3**, 149-159.

Pelkmans, L., Burli, T., Zerial, M. and Helenius, A. (2004) Caveolin-stabilized membrane domains as multifunctional transport and sorting devices in endocytic membrane traffic. *Cell*, **118**, 767-780.

Pelkmans, L. and Helenius, A. (2002) Endocytosis via caveolae. *Traffic*, **3**, 311-320.

Peters, J.M. (1994) Proteasomes: protein degradation machines of the cell. *Trends Biochem Sci*, **19**, 377-382.

Platt, N., da Silva, R.P. and Gordon, S. (1999) Class A scavenger receptors and the phagocytosis of apoptotic cells. *Immunol Lett*, **65**, 15-19.

Podolsky, D.K. (1999) Mucosal immunity and inflammation. V. Innate mechanisms of mucosal defense and repair: the best offense is a good defense. *Am J Physiol*, **277**, G495-499.

Pooley, J.L., Heath, W.R. and Shortman, K. (2001) Cutting edge: intravenous soluble antigen is presented to CD4 T cells by CD8- dendritic cells, but cross-presented to CD8 T cells by CD8+ dendritic cells. *J Immunol*, **166**, 5327-5330.

Ramirez, M.C. and Sigal, L.J. (2002) Macrophages and dendritic cells use the cytosolic pathway to rapidly cross-present antigen from live, vaccinia-infected cells. *J Immunol*, **169**, 6733-6742.

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

Raynes, D.A. and Guerriero, V., Jr. (1998) Inhibition of Hsp70 ATPase activity and protein renaturation by a novel Hsp70-binding protein. *J Biol Chem*, **273**, 32883-32888.

Reyes-Moreno, C., Girouard, J., Lapointe, R., Darveau, A. and Mourad, W. (2004) CD40/CD40 homodimers are required for CD40-induced phosphatidylinositol 3-kinase-dependent expression of B7.2 by human B lymphocytes. *J Biol Chem*, **279**, 7799-7806.

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

Rock, K.L. and Shen, L. (2005) Cross-presentation: underlying mechanisms and role in immune surveillance. *Immunol Rev*, **207**, 166-183.

Roth, T.F. and Porter, K.R. (1964) Yolk Protein Uptake in the Oocyte of the Mosquito Aedes Aegypti. L. *J Cell Biol*, **20**, 313-332.

Rudiger, S., Buchberger, A. and Bukau, B. (1997) Interaction of Hsp70 chaperones with substrates. *Nat Struct Biol*, **4**, 342-349.

Rupp, F., Brecher, J., Giedlin, M.A., Mosmann, T., Zinkernagel, R.M., Hengartner, H. and Joho, R.H. (1987) T-cell antigen receptors with identical variable regions but different diversity and joining region gene segments have distinct specificities but cross-reactive idiotypes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **84**, 219-222.

Sallusto, F., Cella, M., Danieli, C. and Lanzavecchia, A. (1995) Dendritic cells use macropinocytosis and the mannose receptor to concentrate macromolecules

in the major histocompatibility complex class II compartment: downregulation by cytokines and bacterial products. *J Exp Med*, **182**, 389-400.

Schneeberger, A., Wagner, C., Zemann, A., Luhrs, P., Kutil, R., Goos, M., Stingl, G. and Wagner, S.N. (2004) CpG motifs are efficient adjuvants for DNA cancer vaccines. *J Invest Dermatol*, **123**, 371-379.

Shen, L. and Rock, K.L. (2004) Cellular protein is the source of cross-priming antigen in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **101**, 3035-3040.

Shi, F.D., Ljunggren, H.G. and Sarvetnick, N. (2001) Innate immunity and autoimmunity: from self-protection to self-destruction. *Trends Immunol*, **22**, 97-101.

Simons, K. and Ikonen, E. (1997) Functional rafts in cell membranes. *Nature*, **387**, 569-572.

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

Sondermann, H., Becker, T., Mayhew, M., Wieland, F. and Hartl, F.U. (2000) Characterization of a receptor for heat shock protein 70 on macrophages and monocytes. *Biol Chem*, **381**, 1165-1174.

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

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

Stumptner-Cuvelette, P. and Benaroch, P. (2002) Multiple roles of the invariant chain in MHC class II function. *Biochim Biophys Acta*, **1542**, 1-13.

Takeuchi, O., Hoshino, K., Kawai, T., Sanjo, H., Takada, H., Ogawa, T., Takeda, K. and Akira, S. (1999) Differential roles of TLR2 and TLR4 in recognition of gram-negative and gram-positive bacterial cell wall components. *Immunity*, **11**, 443-451.

Tamura, Y., Peng, P., Liu, K., Daou, M. and Srivastava, P.K. (1997) Immunotherapy of tumors with autologous tumor-derived heat shock protein preparations. *Science*, **278**, 117-120.

Theriault, J.R., Mambula, S.S., Sawamura, T., Stevenson, M.A. and Calderwood, S.K. (2005) Extracellular HSP70 binding to surface receptors present on antigen presenting cells and endothelial/epithelial cells. *FEBS Lett*, **579**, 1951-1960.

Tone, M., Tone, Y., Fairchild, P.J., Wykes, M. and Waldmann, H. (2001) Regulation of CD40 function by its isoforms generated through alternative splicing. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**, 1751-1756.

Touret, N., Paroutis, P., Terebiznik, M., Harrison, R.E., Trombetta, S., Pypaert, M., Chow, A., Jiang, A., Shaw, J., Yip, C., Moore, H.P., van der Wel, N., Houben, D., Peters, P.J., de Chastellier, C., Mellman, I. and Grinstein, S. (2005) Quantitative and dynamic assessment of the contribution of the ER to phagosome formation. *Cell*, **123**, 157-170.

Trombetta, E.S. and Parodi, A.J. (2003) Quality control and protein folding in the secretory pathway. *Annu Rev Cell Dev Biol*, **19**, 649-676.

Turnquist, H.R., Kohlgraf, K.G., McIlhaney, M.M., Mosley, R.L., Hollingsworth, M.A. and Solheim, J.C. (2004) Tapasin decreases immune responsiveness to a model tumor antigen. *J Clin Immunol*, **24**, 462-470.

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

Ungermann, C., Neupert, W. and Cyr, D.M. (1994) The role of Hsp70 in conferring unidirectionality on protein translocation into mitochondria. *Science*, **266**, 1250-1253.

van der Drift, A.C., van Noort, J.M. and Kruse, J. (1990) Catheptic processing of protein antigens: enzymic and molecular aspects. *Semin Immunol*, **2**, 255-271.

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

Wagner, I., Arlt, H., van Dyck, L., Langer, T. and Neupert, W. (1994) Molecular chaperones cooperate with PIM1 protease in the degradation of misfolded proteins in mitochondria. *Embo J*, **13**, 5135-5145.

Wang, L.H., Rothberg, K.G. and Anderson, R.G. (1993) Mis-assembly of clathrin lattices on endosomes reveals a regulatory switch for coated pit formation. *J Cell Biol*, **123**, 1107-1117.

Wang, R., Kovalchin, J.T., Muhlenkamp, P. and Chandawarkar, R.Y. (2005) Exogenous Heat Shock Protein-70 binds macrophage-lipid raft-microdomain and stimulates phagocytosis, processing and MHC-II presentation of antigens. *Blood*.

Wang, R., Kovalchin, J.T., Muhlenkamp, P. and Chandawarkar, R.Y. (2006a) Exogenous heat shock protein 70 binds macrophage lipid raft microdomain and stimulates phagocytosis, processing, and MHC-II presentation of antigens. *Blood*, **107**, 1636-1642.

Wang, R., Town, T., Gokarn, V., Flavell, R.A. and Chandawarkar, R.Y. (2006b) HSP70 Enhances Macrophage Phagocytosis by Interaction With Lipid Raft-Associated TLR-7 and Upregulating p38 MAPK and PI3K Pathways. *J Surg Res*.

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

Wang, Y., Kelly, C.G., Karttunen, J.T., Whittall, T., Lehner, P.J., Duncan, L., MacAry, P., Younson, J.S., Singh, M., Oehlmann, W., Cheng, G., Bergmeier, L. and Lehner, T. (2001b) CD40 is a cellular receptor mediating mycobacterial heat shock protein 70 stimulation of CC-chemokines. *Immunity*, **15**, 971-983.

Wassenberg, J.J., Dezfulian, C. and Nicchitta, C.V. (1999) Receptor mediated and fluid phase pathways for internalization of the ER Hsp90 chaperone GRP94 in murine macrophages. *J Cell Sci*, **112 (Pt 13)**, 2167-2175.

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

Watts, C. (2004) The exogenous pathway for antigen presentation on major histocompatibility complex class II and CD1 molecules. *Nat Immunol*, **5**, 685-692.

Watts, C. and Amigorena, S. (2000) Antigen traffic pathways in dendritic cells. *Traffic*, **1**, 312-317.

West, M.A., Wallin, R.P., Matthews, S.P., Svensson, H.G., Zaru, R., Ljunggren, H.G., Prescott, A.R. and Watts, C. (2004) Enhanced dendritic cell antigen capture via toll-like receptor-induced actin remodeling. *Science*, **305**, 1153-1157.

Whitman, S.C., Daugherty, A. and Post, S.R. (2000) Macrophage colony-stimulating factor rapidly enhances beta-migrating very low density lipoprotein metabolism in macrophages through activation of a Gi/o protein signaling pathway. *J Biol Chem*, **275**, 35807-35813.

Whittall, T., Wang, Y., Younson, J., Kelly, C., Bergmeier, L., Peters, B., Singh, M. and Lehner, T. (2006) Interaction between the CCR5 chemokine receptors and microbial HSP70. *Eur J Immunol*, **36**, 2304-2314.

Wickner, S., Maurizi, M.R. and Gottesman, S. (1999) Posttranslational quality control: folding, refolding, and degrading proteins. *Science*, **286**, 1888-1893.

Williams, A., Peh, C.A. and Elliott, T. (2002) The cell biology of MHC class I antigen presentation. *Tissue Antigens*, **59**, 3-17.

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

Yamada, E. (1955) The fine structure of the renal glomerulus of the mouse. *J Histochem Cytochem*, **3**, 309.

Ye, Y., Shibata, Y., Yun, C., Ron, D. and Rapoport, T.A. (2004) A membrane protein complex mediates retro-translocation from the ER lumen into the cytosol. *Nature*, **429**, 841-847.

Zenni, M.K., Giardina, P.C., Harvey, H.A., Shao, J., Ketterer, M.R., Lubaroff, D.M., Williams, R.D. and Apicella, M.A. (2000) Macropinocytosis as a mechanism of entry into primary human urethral epithelial cells by Neisseria gonorrhoeae. *Infect Immun*, **68**, 1696-1699.

Zerial, M. and McBride, H. (2001) Rab proteins as membrane organizers. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **2**, 107-117.

Zhu, X., Zhao, X., Burkholder, W.F., Gragerov, A., Ogata, C.M., Gottesman, M.E. and Hendrickson, W.A. (1996) Structural analysis of substrate binding by the molecular chaperone DnaK. *Science*, **272**, 1606-1614.

Zinkernagel, R.M. (2000) On immunological memory. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, **355**, 369-371.

Danksagung

Der an dieser Stelle ausgesprochene Dank gilt in erster Linie Herrn Professor Dr. Wieland für die Möglichkeit an einem sehr interessanten Thema arbeiten zu können. Sein immer reges Interesse am Fortgang dieser Arbeit waren Motivation und Herausforderung zugleich.
Ein besonderer Dank gilt Herrn Professor Dr. Ulrich Hartl vom Max Planck Institut für Biochemie in Martinsried für die konstruktive und interessante Kooperation.
Dr. Petra Diestelkötter-Bachert schulde ich besonderen Dank für die konstruktiven Diskussionen, für das Korrekturlesen und für die stets hilfsbereite Betreuung.
Außerdem möchte ich Alice Levin ebenfalls vom Max Planck Institut für Biochemie in Martinsried für die Zusammenarbeit und für die motivierenden Diskussionen danken.
Für die Übernahme des Zweitgutachtens danke ich Herrn Professor Dr. Brunner, sowie dem Komitee meiner Disputation.
Die für mich sehr wertvolle Hilfe in Form von wissenschaftlichem Rat, der Hilfsbereitschaft beim Korrekturlesen und der Unterstützung bei vielen nichtwirklichen Problemen kam von Christoph Rutz. Für diese Bereitschaft, die intensive Freundschaft und noch für vieles mehr, möchte ich mich herzlich bedanken.
Esther Draken und Frau Ingrid Meißner danke ich für eine sehr anregende Arbeitsatmosphäre, offene Ohren für so manche Probleme und die praktische Unterstützung.
Der “french connection“ unseres Labors Julien Béthune, Per Haberkant und Oliver Schmitt danke ich für die unverzichtbare wissenschaftliche aber auch freundschaftliche Hilfe.
Vielen anderen Mitarbeitern des Labors schulde ich Dank: Britta Brügger für so manchen wissenschaflichen Rat; Ingeborg Reckmann für die Bereitstellung von Antikörpern und Plasmide; Gabi Weiß für Fragen in der Zellkultur; Jörg Moelleken, Frank Anderl und Emily Stoops für die Hilfsbereitschaft beim Korrekturlesen; Barbara Schröter für jegliche Hillfsbereitschaft in Terminvereinbarungen und anderen organisatorischen Dingen; Stefanie Hubich, Carolin Weimar, Julian Langer, Rainer Beck und Matthjis Kol für die vielen “social events“ und amüsanten Skitrips sowie

Claudia Seelenmeyer für die Hilfe bei Problemen jeglicher Art. Ibrahim Kebbewar und Leonardo Serrano für eine Freundschaft auch außerhalb des Labors.
Rafael Backhaus möchte ich herzlich für die Jahre der Freundschaft, die vielen schönen Momente aber auch für die Unterstützung bei Problemen danken.
Anke Brockmann sei herzlich gedankt für die Hilfsbereitschaft beim Korrekturlesen und für die Hilfe während der letzten Monate.
Zuletzt möchte ich besonders meinen Eltern und Geschwistern für die liebevolle Unterstützung danken auch dafür, dass sie immer fest an mich geglaubt haben, und mir immer mit menschlichen Rat und vor allem Rückhalt zur Seite standen.