

# INAUGURAL – DISSERTATION

Zur  
Erlangung der Doktorwürde  
der  
Naturwissenschaftlichen Gesamtfakultät  
der  
Ruprecht – Karls – Universität  
Heidelberg

vorgelegt von  
**Diplom-Biotechnologe Boris-Christian Marincek**  
aus Stanford, USA

Tag der mündlichen Prüfung: \_\_\_\_\_

# **HSP-Antigen-Fusionsproteine als Tumor-Vakzinen in der Maus**

Gutachter: Prof. Dr. Günter J. Hämmerling  
PD Dr. Frank Breitling

## Danksagung

Die vorliegende Dissertation wurde in der Arbeitsgruppe von PD Dr. Frank Momburg in der Abteilung „Molekulare Immunologie“ (Leiter: Prof. Dr. G. J. Hämmerling) des Deutschen Krebsforschungszentrums (DKFZ) in Heidelberg angefertigt.

Ich möchte mich hier ganz herzlich bei all denen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Zunächst möchte ich PD Dr. Frank Momburg für die Themenbereitstellung, die wissenschaftliche Betreuung der Arbeit, für seine aktive Hilfe bei den molekularbiologischen Arbeiten, für sein großes Interesse am Fortgang der Arbeit und für seine ständige Diskussionsbereitschaft danken. Auch danke ich ihm dafür, dass ich die Unterstützung seiner Auszubildenden Jessica Zell genießen konnte.

Prof. Dr. Günter J. Hämmerling danke ich für seine Bereitschaft zu anregenden Gesprächen, sowie für seine Unterstützung durch die Bereitstellung aller notwendigen Arbeitsmittel.

PD Dr. Frank Breitling danke ich dafür, dass er sich bereit erklärt hat, meine Arbeit als Zweitgutachter vor der Fakultät zu vertreten.

Ich möchte mich außerdem bei Jessica Zell bedanken, die mich als Auszubildende tatkräftig unterstützt hat.

Bei Cathy Srokowski und Prof. Dr. Hansjörg Schild möchte ich für die IL-6-Sezernierungs-Experimente in Mainz bedanken.

Prof. Dr. Stefan Kaufmann möchte ich für die TLR4-/- Mäuse danken, die er mir freundlicherweise zur Verfügung gestellt hat.

Für die unermüdliche Pflege der vielen Mäuse möchte ich Elke Deibel, Beatrix Imkeit, Walter Henrich, Alexander Voise und Gabriele Schulze danken.

Weiterhin möchte ich mich bei allen Mitarbeitern der Abteilung für die große Hilfsbereitschaft und gute Zusammenarbeit bedanken. Insbesondere möchte ich Marie Kühnle, Jörg Striegler, Tewfik Miloud, Natalio Garbi und Thomas Schüler für ihre stetige Diskussionsbereitschaft, Unterstützung und Anteilnahme während dieser Zeit danken.

Besonders bedanken möchte ich mich bei meiner Freundin Elodie und meinem Bruder Nicolas für Ihre fortwährende Unterstützung, sowie für das mir entgegenbrachte Verständnis und die Aufmunterungen während der Anfertigung der Dissertation.

Meinen Eltern Helga und Borut möchte ich besonders für das in mich gesetzte Vertrauen, den Rückhalt und die Unterstützung in jeder Hinsicht danken.

# Inhaltsverzeichnis

<b>ABBILDUNGSVERZEICHNIS .....</b>	<b>V</b>
<b>TABELLENVERZEICHNIS .....</b>	<b>VI</b>
<b>ZUSAMMENFASSUNG.....</b>	<b>VII</b>
<b>SUMMARY.....</b>	<b>IX</b>
<b>1. EINLEITUNG .....</b>	<b>1</b>
1.1. DAS IMMUNSYSTEM.....	1
1.1.1. <i>Das angeborene Immunsystem</i> .....	1
1.1.2. <i>Das adaptive Immunsystem</i> .....	3
1.1.3. <i>Die zentrale Rolle von DC in der Aktivierung der adaptiven Immunantwort</i> .....	7
1.2. TUMORVAKZINIERUNG .....	9
1.2.1. <i>Ziel der Tumorstimmulierung</i> .....	9
1.2.2. <i>Verschiedene Strategien der Tumorstimmulierung</i> .....	9
1.2.3. <i>Vakzinierungen mit Hitze-Schock-Proteinen (HSP)</i> .....	13
1.3. HITZE-SCHOCK-PROTEINE (HSP) SIND MEHR ALS MOLEKULARE CHAPERONE .....	15
1.3.1. <i>HSP sind molekulare Chaperone</i> .....	15
1.3.2. <i>Immunologische Eigenschaften von HSP</i> .....	17
<b>2. ZIELSETZUNG .....</b>	<b>22</b>
<b>3. MATERIAL UND METHODEN .....</b>	<b>23</b>
3.1. MATERIAL .....	23
3.1.1. <i>Bezugsquellen</i> .....	23
3.1.2. <i>Verwendete Kits</i> .....	23
3.1.3. <i>Geräte</i> .....	24
3.1.4. <i>Puffer und Lösungen</i> .....	25
3.1.5. <i>Bakterienstämme</i> .....	28
3.1.6. <i>Zelllinien</i> .....	28
3.1.7. <i>Medien</i> .....	28
3.1.8. <i>Mauslinien</i> .....	31
3.1.9. <i>Antikörper</i> .....	32
3.1.10. <i>Plasmide</i> .....	33
3.1.11. <i>cDNA</i> .....	33
3.1.12. <i>PCR-Primer und andere Oligonukleotide</i> .....	34
3.1.13. <i>Peptide</i> .....	35
3.2. MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN .....	35
3.2.1. <i>Lagerung und Kultivierung von Bakterien</i> .....	35
3.2.2. <i>Präparation, enzymatische Manipulation, Analyse und Sequenzierung von DNA</i> .....	37

3.3. BIOCHEMISCHE METHODEN .....	40
3.3.1. <i>Polyacrylamid-Gelelektrophorese</i> .....	40
3.3.2. <i>Western Blot</i> .....	42
3.3.3. <i>Herstellung und Aufreinigung von rekombinanten Proteinen</i> .....	44
3.3.4. <i>Endotoxin-Abreicherung</i> .....	46
3.3.5. <i>Proteinbestimmung mittels BCA</i> .....	47
3.3.6. <i>Quantitativer Endotoxin-Nachweis</i> .....	47
3.3.7. <i>Abspaltung des SBP-His6-tags</i> .....	48
3.4. ZELLBIOLOGISCHE ARBEITSTECHNIKEN .....	49
3.4.1. <i>Kultivierung eukaryontischer Zelllinien</i> .....	49
3.4.2. <i>Lagerung eukaryontischer Zellen</i> .....	49
3.4.3. <i>Durchflusszytometrische Analyse von Zellen</i> .....	50
3.4.4. <i>Isolierung von Zellsubpopulationen mittels MACS</i> .....	51
3.4.5. <i>In vivo Proliferations-Assay</i> .....	52
3.4.6. <i>Generierung von dendritischen Zellen aus dem Knochenmark</i> .....	52
3.5. METHODEN ZUR ARBEIT MIT MÄUSEN .....	53
3.5.1. <i>Typisierung von transgenen und Knockout-Mäusen</i> .....	53
3.5.2. <i>Organentnahme</i> .....	55
3.5.3. <i>Injektion bei Mäusen</i> .....	57
3.5.4. <i>Adoptiver Transfer von T-Zellen</i> .....	58
3.5.5. <i>In vivo Zytotoxizitäts-Assay</i> .....	58
3.5.6. <i>Injektion von Tumorzellen und Überwachung des Tumorwachstums</i> .....	59
<b>4. ERGEBNISSE</b> .....	<b>60</b>
4.1. GENERIERUNG UND EXPRESSION DER HSP70-ANTIGEN-FUSIONSPROTEINE .....	60
4.1.1. <i>Herstellung von N-terminalen His6-tag Hsp70-Antigen-Fusionsproteinen</i> .....	60
4.1.2. <i>Herstellung von C-terminalen His6-tag Hsp70-Antigen-Fusionsproteinen</i> .....	67
4.2. INDUKTION VON SPEZIFISCHER IMMUNITÄT DURCH HSP70-OVA-FUSIONSPROTEINE .....	71
4.2.1. <i>Aktivierung von Ovalbumin-spezifischen TCR-transgenen T-Zellen</i> .....	71
4.2.2. <i>Aktivierung von Ovalbumin-spezifischen zytotoxischen T-Zellen aus dem polyklonalen T-Zell-Gemisch durch Hsp70-OVA-Fusionsproteine</i> .....	78
4.3. AUSWIRKUNGEN DER ENDOTOXIN-KONTAMINATION AUF DIE IMMUNSTIMULATORISCHEN FÄHIGKEITEN DER HSP70-OVA-FUSIONSPROTEINE .....	81
4.3.1. <i>Analyse der immunstimulatorischen Wirkung der Hsp70-OVA-Fusionsproteine in TLR4-defizienten Mäusen</i> .....	81
4.3.2. <i>Endotoxin-Abreicherung der Fusionsproteine</i> .....	82
4.3.3. <i>In vivo Zytotoxizitäts-Assay mit Endotoxin-depletierten Hsp70-OVA-Fusionsproteinen</i> .....	83
4.3.4. <i>Aktivierung von TCR-transgenen T-Zellen durch Endotoxin-freie Fusionsproteine</i> .....	84
4.4. TUMORVAKZINIERUNG MIT HSP70-OVA-FUSIONSPROTEINEN .....	86
4.4.1. <i>Mehrfache Immunisierung mit Endotoxin-freien Fusionsproteinen</i> .....	87
4.4.2. <i>Kombination von Hsp70-OVA-Fusionsproteinen mit TLR-Liganden</i> .....	91

4.4.3. <i>Therapeutische Tumorthherapie mit mtubHsp70-OVA</i> .....	96
4.5. VERGLEICH VON HSP70-OVA-FUSIONSPROTEINEN MIT OVALBUMIN .....	99
4.5.1. <i>Immunisierung mit Endotoxin-freiem rekombinanten OVA-Fragment</i> .....	99
4.5.2. <i>Vergleich der Fusionsproteine mit nativem Ovalbumin</i> .....	102
4.6. HERSTELLUNG UND ANALYSE VON NATIVEN FUSIONSPROTEINEN.....	110
4.7.1 <i>Die Hsp70-OVA-induzierte Kreuzpräsentation wird primär durch dendritische Zellen in vivo</i> <i>ausgeführt.</i> .....	114
4.7.2. <i>Aktivierung von BMDC durch Hsp70-OVA-Fusionsproteine</i> .....	116
4.7.3. <i>Aktivierung von DC durch Hsp70-OVA in vivo</i> .....	118
4.7.4. <i>Hsp70-OVA induzierte Kreuzpräsentation in BMDC</i> .....	120
<b>5. DISKUSSION</b> .....	<b>124</b>
<b>6. SCHLUSSFOLGERUNGEN</b> .....	<b>138</b>
<b>7. LITERATURVERZEICHNIS</b> .....	<b>140</b>
<b>8. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS</b> .....	<b>150</b>
<b>ANHANG</b> .....	<b>152</b>

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1-1: Nur HSP-Peptid-Komplexe zeigen eine Immunogenität.....	18
Abbildung 1-2: Aktivierung des angeborenen und adaptiven Immunsystems durch HSP.....	19
Abbildung 4-1: Generierung von N-terminalen His6-tag Hsp70-OVA Fusionskonstrukten .....	61
Abbildung 4-2: Expressionsanalyse der N-terminalen His6-Fusionsproteine .....	62
Abbildung 4-3: Analyse der Elutionsbedingungen für die Aufreinigung mittels Ni-NTA.....	63
Abbildung 4-4: Analyse der Aufreinigung der Fusionsproteine.....	64
Abbildung 4-5: Analyse des Eluats im Western Blot.....	66
Abbildung 4-6: Generierung von C-terminalen His6-tag Hsp70-OVA Fusionskonstrukten .....	68
Abbildung 4-7: Analyse der Aufreinigung der C-terminalen His6-Fusionsproteine .....	69
Abbildung 4-8: Vergleich von N-terminalen und C-terminalen His6-Fusionsproteinen .....	70
Abbildung 4-9: FACS-Diagramme der Aktivierung von OT-I CD8 <sup>+</sup> T-Zellen durch Hsp70-Fusionsproteine und Kontrollen .....	72
Abbildung 4-10: Analyse der Aktivierung der OT-I Zellen durch Hsp70-OVA-Fusionsproteine .....	73
Abbildung 4-11: Antigen-spezifische Aktivierung der OT-I T-Zellen durch Fusionsproteine .....	74
Abbildung 4-12: Titration von mtubHsp70-OVA bei der Immunisierung .....	75
Abbildung 4-13: Analyse der OT-II Proliferation und intrazellulären IL-2-Produktion.....	76
Abbildung 4-14: Analyse der OT-II Proliferation und intrazellulären TNF $\alpha$ -Produktion .....	77
Abbildung 4-15: Aktivierung von S8L-spezifischen polyklonalen T-Zellen.....	79
Abbildung 4-16: <i>In vivo</i> Zytotoxizitäts-Assay nach Immunisierung mit mtubHsp70-OVA.....	80
Abbildung 4-17: <i>In vivo</i> Zytotoxizitäts-Assay in TLR4-defizienten Mäusen .....	82
Abbildung 4-18: Analyse der Endotoxin-freien Fusionsproteine im <i>in vivo</i> Zytotoxizitäts-Assay .....	84
Abbildung 4-19: Endotoxin-freie HSP-OVA-Fusionsproteine induzieren Effektor OT-I Zellen .....	85
Abbildung 4-20: <i>In vivo</i> Zytotoxizität durch Dreifach-Immunisierung mit Endotoxin-freiem Fusionsprotein ....	88
Abbildung 4-21: Tumorwachstum nach prophylaktischer Immunisierung mit Fusionsproteinen.....	89
Abbildung 4-22: Einfluß von Endotoxin-Kontaminationen auf die Immunisierung.....	91
Abbildung 4-23: Kombination von mtubHsp70-OVA und TLR-Liganden .....	92
Abbildung 4-24: Vergleich aller Fusionsproteine in Kombination mit CpG .....	93
Abbildung 4-25: Vergleich von Mehrfachimmunisierungen und der Kombination mit CpG .....	93
Abbildung 4-26: Langanhaltende Tumormunität durch Kombination von CpG und mtubHsp70-OVA .....	95
Abbildung 4-27: Therapeutische Antitumor-Immunisierung mit mtubHsp70-OVA .....	97
Abbildung 4-28: Vergleich des Tumorwachstums nach prophylaktischer Immunisierung mit rOVA und mtubHsp70-OVA .....	100
Abbildung 4-29: Therapeutische Immunisierung zur Tumorbehandlung mittels rOVA .....	101
Abbildung 4-30: Titration von mtubHsp70-OVA und rOVA im <i>in vivo</i> Zytotoxizitäts-Assay.....	102
Abbildung 4-31: Vergleich von nativem und rekombinantem Ovalbumin.....	103
Abbildung 4-32: Entfernung der C-terminalen tags und Auswirkung auf die Immunantwort.....	104

Abbildung 4-33: Zentrifugation von löslichen und aggregiertem Protein.....	106
Abbildung 4-34: Native PAGE zur Untersuchung des Aggregationszustandes der Fusionsproteine .....	107
Abbildung 4-35: Vergleich der aus Hitze-Aggregation resultierenden Zytotoxizität .....	108
Abbildung 4-36: Vergleich von Hitze-aggregierten Fusionsproteinen .....	109
Abbildung 4-37: Verschiedene Bedingungen zur Aufreinigung von löslichen Protein .....	111
Abbildung 4-38: Testexpression für die Aufreinigung unter nativen Bedingungen.....	112
Abbildung 4-39: Aufreinigung von rOVA und mtubHsp70-OVA unter nativen Bedingungen .....	113
Abbildung 4-40: <i>In vivo</i> Zytotoxizitäts-Assay von nativ aufgereinigten Fusionsproteine.....	113
Abbildung 4-41: CD11c <sup>+</sup> DC sind <i>in vivo</i> für die Kreuzpräsentation von HSP-gebundenen Antigen verantwortlich.....	115
Abbildung 4-42: Aktivierung von DC durch HSP-OVA-Fusionsproteinen .....	117
Abbildung 4-43: Aktivierung von BMDC durch gp96, aber nicht durch mtubHsp70-OVA .....	118
Abbildung 4-44: <i>In vivo</i> Aktivierung von CD11c <sup>+</sup> DC und F4/80 <sup>+</sup> Makrophagen durch mtubHsp70-OVA.....	119
Abbildung 4-45: Aggregiertes, nicht aber natives Fusionsprotein induziert eine starke Kreuzpräsentation..	121
Abbildung 4-46: Aktivierung von BMDC durch mtubHsp70-OVA und rOVA .....	122

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1-1: Die HSP-Familien (nach Srivastava, 2002b).....	16
Tabelle 4-1: Maßnahmen zur Erhöhung der Reinheit der aufgereinigten Fusionsproteine .....	65
Tabelle 4-2: Auftreten seltener Codons in den N-terminalen His6-tag Fusionsproteinen.....	67
Tabelle 4-3: Übersicht der Methoden zur Endotoxin-Abreicherung der Fusionsprotein-Präparate .....	83



## Zusammenfassung

Hitze-Schock-Proteine (HSP) sind bekannt dafür, die Kreuzpräsentation von Antigenen in dendritischen Zellen (DC) zu induzieren sowie DC zu aktivieren (Adjuvans-Effekt). Diese Eigenschaften machen HSP-Antigen-Komplexe zu geeigneten Kandidaten, um antigenspezifische CD8<sup>+</sup> T-Zellen-Antworten gegen Tumor-assoziierte-Antigene zu initiieren. Es gibt ca. 15-20 verschiedene HSP, aber bis jetzt ist wenig über ihre relativen immunologischen Eigenschaften (Aktivierung des Immunsystems und Kreuzpräsentation) bekannt. In dieser Arbeit wurden verschiedene HSP der HSP70-Familie (*M.tuberculosis* Hsp70, murines induzierbares Hsp70, murines Hsp70L1 und murines konstitutiv exprimiertes Hsc70) verglichen, die an ein Fragment von Ovalbumin (OVA) als Modell-Tumor-Antigen fusioniert wurden. Selbst geringe Mengen (100 pmol) an in *E.coli* hergestellten rekombinanten Hsp70-OVA konnten effiziente Antworten von OVA-spezifischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen in Kurzzeitimmunisierungen *in vivo* hervorrufen. Im direkten Vergleich der hier untersuchten vier Hsp70-Typen zeigte sich *M.tuberculosis* Hsp70 (mtubHsp70) als das HSP mit der stärksten Immunogenität. Die Immunisierung mit Hsp70-OVA war abhängig von DC, da nach Depletion der DC in CD11c.DTR Mäusen keine CD8<sup>+</sup> T-Zell-Antworten mehr beobachtet werden konnten.

Die Immunisierung mit mtubHsp70-OVA führte zu einer signifikanten zytotoxischen Aktivität *in vivo*, während die Immunisierung mit dem Fusionsprotein ohne Hsp-Anteil (rekombinantes OVA-Fragment) zu keiner Zytotoxizität führte. Um zu untersuchen, ob die starken immunostimulatorischen Fähigkeiten des HSP-Anteils (Adjuvans-Effekt) durch Endotoxin-Kontamination zustande kamen, wurden die Versuche in LPS-Rezeptor (TLR4)-defizienten Mäusen wiederholt. In diesen Mäusen konnte die Immunisierung mit mtubHsp70-OVA nur eine schwache Zytotoxizität induzieren. Nach Endotoxin-Abreicherung der Hsp70-OVA Präparate konnte keine zytotoxische Aktivität nach einmaliger Immunisierung von Wildtyp-Mäusen gemessen werden. Folglich scheint die Endotoxin-Kontamination wesentlich zu der Immunogenität der rekombinanten Hsp70-OVA-Fusionsproteine beizutragen.

Mehrfache Immunisierung mit Endotoxin-freiem Hsp70-OVA führte zu einer zytotoxischen Aktivität *in vivo* und konnte signifikant das Wachstum eines OVA-exprimierenden B16

Melanoms verlangsamen. Auch die einmalige Immunisierung mit Endotoxin-abgereichertem Hsp70-OVA in Kombination mit geringen Mengen TLR9-Ligand CpG-Oligodesoxynukleotid 1668 führte zu ähnlichen Ergebnissen in der *in vivo* Zytotoxizität und in der Anti-Tumorimmunität.

Allerdings konnte kein signifikanter Unterschied in der Stärke der Immunantworten zwischen Endotoxin-abgereichertem Hsp70-OVA und Endotoxin-abgereichertem rekombinantem OVA-Fragment gefunden werden. Im Gegensatz zu rekombinantem OVA-Fragment war aber kommerziell erhältliches Ovalbumin aus Hühnereiweiß ein sehr schwaches Antigen. Weiterführende Untersuchungen zeigten, dass die starke Aggregation der Fusionsproteine wichtig für den Erfolg der Vakzinierung ist, da Hitze-Aggregation von kommerziell erhältlichem Ovalbumin zu gleich starken Immunantworten wie die Immunisierung mit Endotoxin-abgereichertem Hsp70-OVA und rekombinantem OVA-Fragment führte. Unter nativen Bedingungen aufgereinigtes, Endotoxin-abgereichertes Hsp70-OVA induzierte keine signifikanten zytotoxischen Immunantworten.

Zusammengefasst zeigen die Ergebnisse, dass der bisher beobachtete Adjuvans-Effekt des Hsp70-Anteil der Fusionsproteine durch die Endotoxin-Abreicherung weitgehend verloren geht. Folglich scheinen Endotoxin-abgereicherte Hsp70-OVA-Proteine keine erhöhte Fähigkeit im Vergleich zum Antigen ohne HSP-Anteil zu besitzen, zytotoxische und teilweise tumorprotektive T-Zell-Antworten zu induzieren. Daher erscheinen Endotoxin-freie Hsp70-Antigen-Fusionsproteine ungeeignet, eine starke Anti-Tumorimmunität zu induzieren. Andererseits konnte gezeigt werden, dass die Aggregation des Antigens zu einer deutlichen Verstärkung der Immunogenität führt. Diese kann auf die verstärkte Kreuzpräsentation der aggregierten Proteine zurückgeführt werden. In Kombination mit einem starken Adjuvans (hier CpG-ODN) konnte eine signifikante Anti-Tumorimmunität induziert werden.

## Summary

Heat shock proteins (HSPs) are known to induce cross-presentation of antigens by dendritic cells (DC) as well as DC maturation (Adjuvant effect). These properties make HSP antigen complexes good candidates to prime CD8<sup>+</sup> T cell responses against tumor-associated antigens. There exist about 15-20 different HSPs, but little is known about their relative capacity to cross-present antigen and to activate the immune system. In this study different HSPs of the HSP70 multigene family (*M.tuberculosis* Hsp70, mouse inducible Hsp70, mouse Hsp70L1, and mouse constitutive Hsc70) have been compared, which were fused to a fragment of ovalbumin (OVA) used as a model tumor antigen. As little as 100 pmol *E. coli*-derived recombinant Hsp70-OVA fusion protein efficiently primed OVA-specific cytotoxic T cells in short-term *in vivo* immunization assays. *M.tuberculosis* Hsp70 (mtubHsp70) was found to be the most potent activator of the four studied Hsp70 fusion proteins. The vaccination with Hsp70-OVA was dependent on DCs, as depletion of DCs in CD11c.DTR mice resulted in an abrogation of CD8<sup>+</sup> T cell responses.

The vaccination with mtubHsp70-OVA led to a significant cytotoxicity *in vivo*, whereas recombinant OVA without the Hsp70 part did not do so. In order to study if the adjuvant effect of the Hsp70 part is due to endotoxin contamination, these experiments were repeated in mice deficient for the LPS receptor TLR4. Only weak cytotoxic T cell responses were found after vaccination with mtubHsp70-OVA in these mice. After careful removal of endotoxins, a single administration of Hsp70-OVA failed to prime cytotoxic T cell responses in wild-type mice. This suggests that endotoxins were mainly responsible for the observed immunogenicity of the recombinant HSP-OVA fusion proteins.

Multiple immunizations with endotoxin-depleted Hsp70-OVA resulted, however, in cytotoxic activity *in vivo* and were able to significantly delay the outgrowth of OVA-expressing B16 melanoma. When endotoxin-depleted Hsp70-OVA was used in a single immunization in combination with low amounts of the TLR9 ligand CpG oligodeoxynucleotide 1668, *in vivo* cytotoxicity and antitumor immunity were efficiently induced as well.

However, we did not detect significant differences in the strengths of the immune responses against endotoxin-depleted recombinant OVA vs. endotoxin-depleted Hsp70-OVA fusion protein. In contrast to a recombinant OVA fragment, commercially available OVA from hen egg white was, however, a very weak antigen. Further experiments showed that protein aggregation was important for the success of the vaccination, as heat denaturation of commercially available OVA restored its priming capacity to the levels of Hsp70-OVA and recombinant OVA, respectively. Native, endotoxin-depleted Hsp70-OVA was not able to induce significant cytotoxic immune responses.

Altogether, my results indicate that the adjuvant effect of the Hsp70 part of the fusion protein is mostly lost after endotoxin removal. Consequently, endotoxin-depleted Hsp70-OVA fusion proteins do not appear superior to unconjugated recombinant OVA antigen in inducing cytotoxic, partially tumor-protective T cell responses. Thus, endotoxin-depleted Hsp70-OVA fusion proteins seem inadequate for the induction of strong antitumor-immunity. On the other hand, antigen aggregation strongly enhanced immunogenicity. This can be ascribed to the improved cross-presentation of aggregated proteins. In combination with a strong adjuvant (CpG-ODN), it was possible to induce a potent antitumor immunity, using aggregated antigen.

# 1. Einleitung

## 1.1. Das Immunsystem

Das Immunsystem hat die Fähigkeit, den Körper von eindringenden Pathogenen wie z.B. Bakterien, Viren, Pilzen, Protozoen und Würmern zu schützen. Für eine erfolgreiche Abwehr der Krankheitserreger sind dabei zwei Teile des Immunsystems wichtig: Man unterscheidet hierbei das evolutionär weitaus ältere, angeborene Immunsystem von dem, nur bei höheren Vertebraten vorkommenden, adaptiven Immunsystem. Die Erkennung von körperfremden Strukturen durch das angeborene Immunsystem erfolgt durch Keimbahn-kodierte Rezeptoren (Gordon, 2002; Janeway und Medzhitov, 2002), während beim adaptiven Immunsystem somatische Rekombinationen der T- und B-Zellrezeptorgene für eine hohe Diversität von antigenspezifischen Effektorzellen sorgen (Brack et al., 1978; Schatz et al., 1992).

### 1.1.1. Das angeborene Immunsystem

Das angeborene Immunsystem besteht aus Natürlichen Killerzellen (NK), Granulozyten, Monozyten, Makrophagen und DC, sowie dem Komplementsystem. Die schnell agierenden Zellen des angeborenen Immunsystem können Pathogene über die sogenannten "pattern recognition receptors" (PRR) erkennen. Diese PRR erkennen "pathogen associated molecular patterns" (PAMP), die nicht vom Wirt, sondern nur von Mikroorganismen exprimiert werden (Gough und Gordon, 2000). Im Laufe der Evolution von Invertebraten und Vertebraten ist das angeborene Immunsystem konserviert und die Spezifität der PRR genetisch fixiert worden (Janeway und Medzhitov, 2002). Rezeptoren, die zu dieser Klasse von PRR gehören, sind unter anderem die „Toll-like receptors“ (TLR), das Mannose-bindende Lektin, der Makrophagen-Mannose-Rezeptor und die Familie der Scavenger-Rezeptoren. Jeder dieser PRR erkennt unterschiedliche PAMP. Das Mannose-bindende Lektin erkennt auf Bakterien eine Anordnung von Zuckern, die spezifisch für Mikroben sind. Der Makrophagen-Mannose-Rezeptor erkennt spezifisch

einzelne Zuckermoleküle, die nur so auf Bakterien und Viren wieder zu finden sind. Scavenger-Rezeptoren erkennen die Abwesenheit von Sialinsäureresten auf der Oberfläche von Zellen (z.B. gealterten, roten Blutkörperchen) bzw. Pathogenen. Diese drei Rezeptortypen führen zur Erkennung und Phagozytose der Pathogene und damit zur Beseitigung dieser Pathogene (Janeway et al., 2004).

Im Unterschied zu den anderen oben genannten PRR zeichnet sich die Familie der TLR dadurch aus, dass sie zu einer Produktion von Zytokinen und Chemokinen sowie der Hochregulation von kostimulatorischen Molekülen führt. Dies kann wiederum das adaptive Immunsystem aktivieren (Janeway et al., 2004). Jeder der 10 bekannten TLR (TLR1 bis 10) erkennt verschiedene PAMP, die nicht auf Vertebratenzellen gefunden werden können. So werden zum Beispiel Peptidglykane, Lipoproteine bzw. Zymosan von einer Gruppe der TLR (TLR1, TLR2, TLR6) erkannt, während Lipopolysaccharide (LPS) von TLR4, doppelsträngige RNA von TLR3, Flagelline von TLR5 und nicht-methylierte DNA mit CpG-Motiven von TLR9 erkannt werden (Barton und Medzhitov, 2002).

Das Komplementsystem besteht aus einer Reihe von Plasmaproteinen, die miteinander reagieren können, um Pathogene zu opsonisieren. Einige dieser Plasmaproteine sind Proteasen, die selbst durch proteolytische Abspaltung aktiviert werden und unter dem Namen Zymogene bekannt sind. Dadurch ist es möglich, dass nur wenige Komplementproteine eine Kaskade an enzymatischen Reaktionen auslösen kann, die schnell die Antwort des Komplementsystems amplifiziert. In ihrer Natur als Plasmaproteine sind sie im ganzen Körper verteilt und können so schnell am Ort einer Infektion ein starke Immunantwort auslösen (Tomlinson, 1993). Das Komplementsystem kann Pathogene über drei verschiedenen Wege erkennen. Die Erkennung von Pathogenen erfolgt erstens über das Mannose-bindende Lektin (Jack et al., 2001), das direkt spezifisch die Anordnung von Zuckern auf den Pathogenen erkennt. Die zweite Möglichkeit ist der klassische Weg, bei dem Antikörper-Pathogen-Komplexe erkannt werden (Cooper, 1985). Die dritte Möglichkeit ist der so genannte alternative Weg, bei dem Komplementproteine spontan an Bakterien und Zellen binden und aktiviert werden (Tomlinson, 1993). Körpereigene Zellen besitzen Regulatorproteine (CR1, H, MCP und DAF) auf ihrer Oberfläche, welche die Aktivierung des Komplementsystems unterbinden können. Pathogene, denen diese Regulatorproteine fehlen, können die Aktivierung des Komplementsystems nicht verhindern. Die Aktivierung des Komplementsystems führt zu

Oponisierung des gebundenen Pathogens und der Anlockung von phagozytischen Zellen. Die Oponisierung erleichtert hierbei die Aufnahme der Pathogene durch die phagozytischen Zellen, da diese Rezeptoren (CR1-4) besitzen, um opsonierte Pathogene zu erkennen (Janeway et al., 2004). Zudem kann die Aktivierung des Komplementsystems zu der Bildung des Membranangriffskomplexes auf der Oberfläche der Pathogene führen. Durch die vom Membranangriffskomplex induzierte Porenbildung kommt es zur Lyse des Pathogens (Bhakdi und Trantum-Jensen, 1991).

Ein weiterer, wichtiger Bestandteil des angeborenen Immunsystems sind die NK-Zellen. Diese können abnormale körpereigene Zellen, wie Tumorzellen und virusinfizierte Zellen, erkennen und abtöten. NK-Zellen können mittels „Killer cell immunoglobulin-like“ Rezeptoren (KIR) und zwei C-Typ Lektinen (CD94 und NKG2A, B, C) abnormale Zellen von normale Zellen unterscheiden (Janeway et al., 2004). Die KIRs und der CD94-NKG2-Heterodimer erkennen auf den körpereigenen gesunden Zellen die MHC-Klasse-I-Moleküle, welche die NK-Zellen inhibieren. Tumorzellen und einige Viren sind in der Lage, die Präsentation von MHC-I Molekülen auf der Oberfläche der Zellen zu unterdrücken, um so der Zerstörung durch T-Lymphozyten zu entgehen. Bei Abwesenheit oder niedriger Expression von körpereigenen MHC-Klasse-I-Molekülen auf abnormalen Zellen (Tumor- oder virusinfizierte Zellen) werden die NK-Zellen nicht mehr inhibiert, sondern aktiviert (Karre, 2002). Dieses Prinzip der Erkennung der abnormalen Zellen durch NK-Zellen ist als „Missing-Self“-Hypothese bekannt. Die aktivierten NK-Zellen setzen nun zytotoxische Granula auf der Oberfläche der abnormalen Zellen frei, die Apoptose in diesen Zellen induziert. Die Immunantwort durch NK-Zellen kann durch Interleukin-12 (IL-12) und Interferone (IFN- $\alpha$  und IFN- $\beta$ ) verstärkt werden (Biron et al., 1999).

### 1.1.2. Das adaptive Immunsystem

Zusätzlich zum angeborenen Immunsystem entwickelte sich in Vertebraten das adaptive Immunsystem. Die Zellen des adaptiven Immunsystems sind jeweils mit einem einzigartigen, zufällig generierten Rezeptor ausgestattet, sodass ein Repertoire von Millionen verschiedenen spezifischen Rezeptoren entsteht. Das adaptive Immunsystem selbst kann in zwei Teile unterteilt werden: in das humorale und das zelluläre

Immunsystem. Beide Teile bilden nach einer Infektion das so genannte immunologische Gedächtnis aus. Dieses immunologische Gedächtnis kann bei einer wiederkehrenden Infektion mit dem gleichen Pathogen sehr viel schneller aktiv werden als bei der ersten Immunantwort und führt zu einer noch schnelleren Abtötung der Pathogene. Die Bildung des immunologischen Gedächtnisses wird auch bei Impfungen ausgenutzt.

Die Zellen des adaptiven Immunsystems zeichnen sich, wie oben schon erwähnt, durch spezifische, zufällig generierte Rezeptoren aus. Diese sind einzigartig und es kommt nur eine Rezeptorspezifität auf der Oberfläche einer Zelle vor. Diese zufällige Generierung und das dadurch entstehende breite Repertoire an Spezifitäten erfolgt durch die zufällige somatische DNA-Rekombination der Gene für die Lymphozyten-Antigen-Rezeptoren. Dadurch entstehen bis zu  $10^{18}$  verschiedene Rezeptoren bei T-Zellen und  $10^{14}$  bei Immunglobulinen (sezernierte oder membranständige B-Zell-Rezeptoren), jeweils mit unterschiedlicher Spezifität (Janeway et al., 2004).

Da bei dieser hohen Zahl an Spezifitäten nahezu alle möglichen Antigene von den B-Zell und T-Zell Rezeptoren (TCR) erkannt werden können, müssen solche, die körpereigene Antigene erkennen, aus dem Repertoire entfernt werden. Dies wird durch Toleranzmechanismen gewährleistet. Man unterscheidet zwischen zentraler Toleranz (für B-Zellen im Knochenmark und für T-Zellen im Thymus) und peripherer Toleranz. Während der zentralen Toleranz durchlaufen die Zellen einen Selektionsprozess, der vor allem bei T-Zellen sehr gut untersucht ist. T-Zellen durchlaufen eine positive (funktional exprimierbarer TCR) und negative Selektion (keine Erkennung von Selbst-Antigenen). In T-Zellen, die die Kriterien der Selektion nicht erfüllen, wird Apoptose induziert. Somit wird die T-Zelle klonal deletiert. Ein zusätzlicher Schutzmechanismus gegen autoreaktive Zellen, die der zentralen Toleranz entgangen sind (Lohmann et al., 1996), findet in der Peripherie (sekundäre Lymphorgane und Gewebe) statt. APC präsentieren fortwährend auch körpereigene Antigene auf ihren MHC-Molekülen, die auch von autoreaktiven Zellen überprüft werden. Unter normalen Bedingungen exprimieren diese APC keine kostimulatorischen Moleküle, und so können die autoreaktiven T-Zellen nicht aktiviert werden (O'Sullivan und Thomas, 2003; Tan et al., 1999). Stattdessen werden die autoreaktiven T-Zellen aus dem aktiven T-Zell Repertoire entfernt.



Das humorale Immunsystem besteht aus B-Zellen, die Antikörper-produzierende Zellen sind. Jede B-Zelle produziert nur einen Typ Antikörper (ein Immunglobulin), das auf ein spezifisches Epitop (antigene Determinante) ausgelegt ist. Die Bezeichnung B-Zellen ist von Knochenmark (englisch "bone marrow") abgeleitet, dem Ort ihrer Reifung. B-Zellen sind in der Lage, mit ihrem Membran-gebundenen B-Zell-Rezeptor körperfremde Strukturen (in Form von Antigenen) zu erkennen und daraufhin Immunglobuline mit der gleichen Spezifität (Antikörper gegen das gleiche Epitop) zu produzieren und zu sezernieren (Janeway et al., 2004). Die Antikörper-Bindung an ein Antigen hat verschiedene Auswirkungen, je nach Antigen. Bei toxischen Antigenen werden diese durch Antikörperbindung neutralisiert und können nicht mehr ihre toxische Wirkung entfalten. Bei Pathogenen führt die Antikörper-Bindung zu einer Opsonisierung, und phagozytische Zellen, die einen Antikörper-spezifischen Rezeptor haben (Fc Rezeptor), können die so opsonisierten Pathogene entfernen (Karakawa et al., 1988). Zudem führt die Antikörper-Bindung zur Aktivierung des Komplementsystems (Cooper, 1985), welches die Immunantwort noch weiter verstärkt. Des Weiteren kann die Bindung von Antikörpern an Pathogene die Wechselwirkungen des Antigens mit Körperzellen (z.B. das Eindringen von Bakterien oder Viren in Zellen oder Gewebe) verhindern. Zuletzt können Antikörper, die an körpereigene Zellen binden, NK-Zellen aktivieren, welche diese Zellen dann abtöten (Takai, 1996). Dieser Prozess wird auch als "Antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity" (ADCC) bezeichnet.

T-Zellen machen das zelluläre adaptive Immunsystem aus und können ihrerseits in zwei Subpopulationen entsprechend ihrer Oberflächenmoleküle CD4 und CD8 eingeteilt werden. CD4<sup>+</sup> T-Zellen sind vor allem als Helfer-Zellen (T-Helfer-Zellen) für die Effektorzellen des Immunsystems wichtig, können aber auch Suppressor-Eigenschaften im Fall von regulatorischen T-Zellen (Treg) haben. Sie agieren durch Zell-Zell-Interaktionen oder die Sekretion von Zytokinen. Ein Beispiel dieser Interaktion der T-Helferzellen ist die erhöhte Antikörperproduktion durch B-Zellen. CD4<sup>+</sup> T-Helferzellen sind aber auch sehr wichtig in der Induktion der Immunantwort von zytotoxischen T-Zellen. Regulatorische T-Zellen können nach Ablauf einer Infektion die Immunantwort drosseln, indem sie zytotoxische T-Zellen inaktivieren.

CD8<sup>+</sup> T-Zellen haben zytotoxische Eigenschaften und können die antimikrobiellen Zytokine Interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) und Tumor-Nekrosefaktor- $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) produzieren. Zudem

können CD8<sup>+</sup> T-Zellen direkt Virus- oder Bakterien-infizierte Zellen töten, indem sie in den befallenen Zellen den programmierten Zelltod (Apoptose) induzieren. Auch manche Tumorzellen können von den zytotoxischen T-Zellen erkannt und abgetötet werden. Die Abtötung von Zellen erfolgt über eine Calcium-abhängige Sekretierung von lytischen Granula. Diese lytischen Granula sind modifizierte Lysosome, die Effektor-Zytotoxine (Perforin, Granzyme und Granulysin) enthalten. Sie werden direkt über der Zielzelle ausgeschüttet (Lieberman, 2003). Perforin polymerisiert auf der Oberfläche der zu tötenden Zelle und formt transmembranale Löcher in der Zielzelle. Granzyme, die zu der Familie der Serin-Proteasen gehören, können im Zytoplasma der Zielzelle Apoptose induzieren. Auch Granulysin kann Apoptose in den Zielzellen induzieren und besitzt zudem eine antimikrobielle Wirkung. Diese Granula machen die Mehrheit der Zytotoxizität der CD8<sup>+</sup> T-Zellen aus. Zudem gibt es aber auch einen anderen, Calcium-unabhängigen, Mechanismus, mit denen CD8<sup>+</sup> T-Zellen und manche Effektor CD4<sup>+</sup> T-Zellen Apoptose in Zielzellen induzieren kann. Dieser wird durch Fas (CD95) vermittelt, der an den Fas-Liganden (CD178) auf den Zielzellen bindet und so die Caspasen in der Zielzelle aktivieren, die schlussendlich zur Apoptose führen (Medana et al., 2000). Zudem können aktivierte CD8<sup>+</sup> T-Zellen Interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) sezernieren, welches die virale Replikation in den Wirtszellen unterbindet und so zur Eliminierung des Virus in den infizierten Zellen ohne Abtötung der Zellen führt (Harty et al., 2000).

T-Zellen benützen für die Erkennung von Antigenen ihre T-Zell Rezeptoren (TCR), die antigene Peptide nur in Zusammenhang mit MHC-Molekülen erkennen können. Die Bindung von TCR an Peptid-MHC-Komplexe führt zu einer Rekrutierung und Aktivierung von intrazellulären Signalmolekülen. CD8<sup>+</sup> T-Zellen erkennen Peptide nur im Zusammenhang auf MHC-Klasse-I-Molekülen, während CD4<sup>+</sup> T-Zellen Peptide auf MHC-Klasse-II-Molekülen erkennen. Wichtig für die Bindung des TCRs an die MHC-Moleküle ist hierbei die Interaktion der Korezeptoren CD4 und CD8 mit MHC-Klasse II bzw. I, damit eine Reaktion der T-Zelle ausgelöst werden kann. Neben der Erkennung des Ag-MHC-Komplexes ist auch die Stimulierung durch kostimulatorische Moleküle für eine effiziente Immunantwort wichtig.

### 1.1.3. Die zentrale Rolle von DC in der Aktivierung der adaptiven Immunantwort

Dendritische Zellen spielen eine wichtige Rolle in der Aktivierung des adaptiven Immunsystems (T- und B-Zellen) und sind die potentesten APC, die primäre zytotoxische T-Zell-Antworten induzieren können (Kapsenberg, 2003). Zur Antigenerkennung sind die T-Zellen auf APC, unter anderem Makrophagen und DC, angewiesen, die Antigen einfangen, zu den Lymphknoten bringen und dort den T-Zellen auf ihrem MHC-Molekülen präsentieren (Geissmann et al., 2002). APC können Ag über Phagozytose oder Makropinozytose aufnehmen. Während einer Infektion (Aktivierung der APC durch PAMP) wird die Anzahl der MHC-Moleküle auf der Oberfläche der APC hochreguliert. MHC-Moleküle binden selektiv Peptide eines Antigens (antigene Determinante) und präsentieren diese auf der Zelloberfläche (Turley et al., 2000). T-Zellen wiederum verwenden ihren TCR, um die Antigenpeptide, die von den MHC-Molekülen präsentiert werden, zu erkennen (Hennecke und Wiley, 2001). Die Anwesenheit von PAMP führt auch zu einer Hochregulation der kostimulatorischen Moleküle auf der Zelloberfläche von APC. Durch die kostimulatorischen Moleküle können die APC zusammen mit den Peptid-MHC-Komplexen die Ag-spezifischen T-Zellen aktivieren und die zelluläre Immunantwort initiieren (Banchereau und Steinman, 1998).

DC können exogenes Ag auf ihren MHC-Klasse-II-Molekülen und endogen exprimiertes Ag (z.B. pathogene Peptide im Zytosol, die infolge Infektion der DC mit Bakterien oder Viren entstehen) auf ihren MHC-Klasse-I-Molekülen präsentieren. Die Präsentation des Ag auf MHC-Klasse-I-Molekülen erfolgt durch die Prozessierung des Ag durch das zytosolische Proteasom und den "peptide-loading complex", der aus dem "transporter associated with antigen processing" (TAP), Tapasin, ERp57 und Calreticulin besteht (Brocke et al., 2002; Lankat-Buttgereit und Tampe, 2002).

Zusätzlich verfügen APC über den Mechanismus der Kreuzpräsentation, welche sie in die Lage versetzt, endozytierte Antigene auf ihren MHC-Klasse-I-Molekülen zu präsentieren. Vor allem dendritische Zellen zeichnen sich hier unter den APC durch ihre starke Fähigkeit zur Kreuzpräsentation aus (Groothuis und Neefjes, 2005; Heath und Carbone, 2001). Der zellbiologische Mechanismus, welcher der Kreuzpräsentation zu Grunde liegt, ist noch nicht ganz aufgeklärt und kann einen oder mehrere Prozesse involvieren (Heath und

Carbone, 2001). Ein möglicher Mechanismus involviert die direkte Beladung von vorgeformten MHC-Klasse-I-Molekülen mit Ag, die in den endosomalen Kompartimenten generiert werden. Hierbei nehmen DC die exogenen Ags über Endozytose auf und die Proteine werden in Endosomen prozessiert. Die Beladung der MHC-Klasse-I-Moleküle erfolgt mit den so entstandenen Peptiden entweder im Endoplasmatischen Retikulum oder während der Regenerierung der MHC-Klasse-I-Moleküle in den endosomalen Vesikeln. In einem anderen möglichen Mechanismus werden die exogenen Proteine direkt von den endosomalen Kompartimenten ohne weitere Prozessierung in das Zytosol entlassen. Alternativ können die exogenen Proteine auch direkt über die extrazelluläre Matrix in das Zytosol aufgenommen werden. Die so ins Zytosol gelangten exogenen Proteine werden nun auf dem konventionellen Wege mit Hilfe der zytosolischen Proteasomen und dem "peptide-loading complex" auf die MHC-Klasse-I-Moleküle geladen. Wie diese Aufnahme von exogenem Protein ins Zytosol ("cytosolic diversion") vor sich geht, ist noch weitgehend offen. Kreuzpräsentation wurde bis jetzt für Hitze-Schock-Proteine (HSP), Antikörper-Komplexe, apoptotische und nekrotische Zellen beobachtet (Heath und Carbone, 2001).

Die Art der Immunantwort einer T-Zelle nach Kontakt mit dem präsentierten spezifischen Ag hängt von vielen Faktoren ab. Diese sind unter anderem die Präsenz von Pathogenen (Janeway und Medzhitov, 2002), proinflammatorische Zytokine (Leonard und O'Shea, 1998), die Stimulierung durch aktivierte CD4<sup>+</sup> T-Zellen (Bennett et al., 1998) und die Affinität des TCR zu dem Ag-MHC-Klasse-I-Komplex (Ma und Kapp, 2001). Zusätzlich spielen die auf den APC exprimierten kostimulatorischen Moleküle B7-1/2 (CD80/CD86) (Gonzalo et al., 2001), CD40 (O'Sullivan und Thomas, 2003) und 4-1BB Ligand (CD137L) (Zhang et al., 2004) eine wichtige Rolle in der klonalen Expansion der T-Zellen und ihrer Entwicklung zu Effektorzellen. Diese kostimulatorischen Moleküle werden durch die Stimulierung der APC hochreguliert.

Wichtig für eine erfolgreiche Tumorstimmulierung ist daher die vollständige Aktivierung der TAA-spezifischen zytotoxischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen. Von diesen wird erhofft, dass sie Effektor-Funktionen haben und die Tumorzellen, die das TAA exprimieren, spezifisch abtöten können und so das Tumorstamm verhindern und schlussendlich zur Eliminierung eines Tumors führen.

## **1.2. Tumorstabilisierung**

### 1.2.1. Ziel der Tumorstabilisierung

Ziel der Tumorstabilisierung ist die Zerstörung des Tumors durch das Immunsystem. Hierbei wird versucht, das Immunsystem spezifisch gegen Tumor-assoziierte Antigene (TAA) zu aktivieren, was zu einer spezifischen Lyse der Tumorzellen führen kann. Die Tumorstabilisierung hat im Gegensatz zur konventionellen Chemo- und Bestrahlungstherapie den Vorteil, nur Tumorzellen abzutöten und nicht die gesunden Zellen. Durch die Spezifität und niedrige Toxizität der Tumorstabilisierung erwartet man zudem weniger Nebenwirkungen. Eine zentrale Rolle in der hier gewünschten Immunantwort spielen zwei Zelltypen, die in den Fokus der meisten Stabilisierungsstrategien gerückt sind: zum einen die zytotoxischen T-Zellen, die Tumorzellen spezifisch lysieren sollen, und zum anderen die APC, die für die Aktivierung von zytotoxischen T-Zellen nötig sind. Zu den APC gehören die dendritischen Zellen (DC), Makrophagen und B-Zellen, wobei den DC die wichtigste Rolle bei der Aktivierung von T-Zellen eingeräumt wird (Kapsenberg, 2003).

### 1.2.2. Verschiedene Strategien der Tumorstabilisierung

Um TAA-spezifische zytotoxische T-Zellen zu aktivieren, gibt es mehrere Ansätze. Zum einen gibt es den Ansatz, der die direkte Aktivierung von TAA-spezifischen T-Zellen verfolgt. Hierzu werden T-Zellen *in vitro* aktiviert und dann adoptiv in den Patienten transferiert (adoptive Immuntherapie). Ein anderer Ansatz versucht die Tumorzellen als Antigen-präsentierende Zellen zu verwenden, damit diese selbst die zytotoxischen T-Zellen aktivieren können. Hierzu werden die Tumorzellen genetisch verändert. Eine andere, weniger aufwendige Strategie der Tumorstabilisierung besteht aus der Verabreichung des bekannten TAA oder unbekanntes TAA in einer Proteinmischung, um so eine spezifische Immunantwort gegen das TAA zu induzieren. Die verabreichten TAA werden von APC auf ihren MHC-Molekülen präsentiert, wodurch die TAA-spezifischen

zytotoxischen T-Zellen aktiviert werden können. Wichtig hierfür ist eine möglichst effiziente Aufnahme und Präsentation der TAA durch die APC. Entscheidend für die Aktivierung der TAA-spezifischen zytotoxischen T-Zellen ist neben der Präsentation der TAA auch der Aktivierungsstatus der APC, der direkten Einfluss auf die Stimulierung von T-Zell-Antworten hat.

#### **1.2.2.1. Immuntherapie durch adoptiven T-Zell Transfer**

Ein Ansatz, der direkt die Aktivierung und Vermehrung von TAA-spezifischen zytotoxischen T-Zellen verfolgt, ist der adoptive Transfer von T-Zellen. Hierzu werden T-Zellen aus dem Patienten isoliert, gefolgt von einer *in vitro* Aktivierung der TAA-spezifischen zytotoxischen T-Zellen und ihrer Expansion (Li und Chang, 1999). Die T-Zellen werden hierbei mit autologen DC aktiviert, die mit Tumor-assoziierten Protein oder Peptid beladen sind. Die expandierten und aktivierten TAA-spezifischen zytotoxischen T-Zellen können dann in den Patienten zurück transferiert werden, um nun den Tumor zu bekämpfen. Durch die Behandlung der Patienten mit T-Zell-Wachstumsfaktoren (z.B. IL-2) konnte die Stärke und Fortdauer der Zytotoxizität der transferierten T-Zellen erhöht werden (Dudley und Rosenberg, 2003).

Dieser Ansatz setzt allerdings voraus, dass es unter den isolierten T-Zellen mindestens eine TAA-spezifische T-Zelle zu finden ist, die dann expandiert werden kann. Wichtig für den Erfolg dieser Immuntherapie ist auch die TCR-Affinität/Avidität zu dem MHC/TAA-Komplex. T-Zellen mit niedriger TCR-Affinität/Avidität können nur eine schwach protektive Anti-Tumorimmunität hervorrufen. Eine Lösung, um zytotoxische T-Zellen mit einem TCR mit hoher Affinität/Avidität adoptiv zu transferieren, besteht aus einem sogenannten TCR-Transfer. Hierbei werden bekannte TCR-Gene mit hoher Affinität/Avidität gegen ein bestimmtes TAA retroviral in isolierte zytotoxische T-Zellen transduziert (Clay et al., 1999). Die transduzierten T-Zellen besitzen nun zusätzlich zu ihrem endogenen TCR diesen transferierten TCR mit hoher Affinität/Avidität gegen das TAA und können so nach Expansion und dem adoptiven Transfer Tumorzellen spezifisch und effizient abtöten.

Der Vorteil des adoptiven Transfers von zytotoxischen T-Zellen ist die hohe Anzahl von TAA-spezifischen T-Zellen, die sich auch im therapeutischen Erfolg widerspiegeln (Xue und Stauss, 2007). Jedoch ist dieser Ansatz sehr aufwendig und zeitintensiv. Für die

Expansion bzw. auch den TCR-Transfer muss das TAA und das entsprechende Epitop bekannt sein. Zudem birgt der retrovirale Transfer Gefahren, da bei der Insertion der TCR-Gene die Expression der flankierenden Gene beeinflusst werden kann.

#### **1.2.2.2. Verwendung von Tumorzellen als APC**

Ein anderer Ansatz, TAA-spezifische zytotoxische T-Zellen direkt *in vivo* zu aktivieren, ist die Tumorzellen selber als APC zu verwenden. Dies ist vor allem interessant, falls für den Tumor kein TAA bekannt ist. Dieser Ansatz beinhaltet eine genetischen Modifikation der Tumorzellen, sodass diese als APC agieren können (Pardoll, 2000). Die genetische Modifikation basiert auf der Verwendung von viralen und nichtviralen Vektoren mit denen Gene für MHC, kostimulatorischen Moleküle und Zytokine (z.B.IL-2) transfiziert werden. So können die genetisch veränderten Tumorzellen ihre TAA effizient für T-Zellen bereitstellen und durch die kostimulatorischen Moleküle und Zytokine die T-Zellen aktivieren. Jedoch ist dieser Ansatz aufwendig und der Erfolg der Therapie hängt davon ab, ob die TAA-spezifischen T-Zellen überhaupt den Tumor erreichen, um dort aktiviert zu werden. Ein alternativer Ansatz besteht darin, die APC durch Chemotaxis in den Tumor zu locken, damit sie dort die TAA aus nekrotischem Tumormaterial aufnehmen, prozessieren und dann im Lymphknoten den T-Zellen präsentiert (Pardoll, 2000). Hierzu werden die Tumorzellen mit verschiedenen Zytokinen transfiziert, die dann in den Tumorzellen überexprimiert und sekretiert werden. Durch die hohe Konzentration an Zytokinen (z.B. GM-CSF) werden die APC angelockt.

#### **1.2.2.3. Tumorstimmulierung mit TAA**

Obwohl die Details der einzelnen Stimulierungsstrategien für TAA sich unterscheiden, haben sie ein gemeinsames Prinzip: Die Bereitstellung der TAA für die APC, die Erleichterung der Aufnahme der TAA durch die APC, und die Präsentation durch die APC für die Aktivierung der TAA-spezifischen Immunantwort. Die TAA können in der Tumorstimmulierung in verschiedenen Formen verabreicht werden: als inaktivierte Tumorzellen, als Tumorzelllysate und, bei bekannten TAA, als Protein oder als antigenes Peptidepitop.

Wichtig für die Präsentation von exogenem Ag durch APC ist hierbei ein Mechanismus, der Kreuzpräsentation genannt wird. Der klassische Präsentationsweg von aufgenommenen (exogenen) Ag durch APC führt zu einer Präsentation auf den MHC-Klasse-II-Molekülen. Währenddessen werden endogene Ag, wie z.B. intrazelluläre Peptide von Pathogenen (Viren und Bakterien), auf MHC-Klasse-I-Molekülen präsentiert. Durch die Fähigkeit zur Kreuzpräsentation können APC exogene Ag aber auch auf ihren MHC-Klasse-I-Molekülen präsentieren. Dies ermöglicht die Aktivierung von zytotoxischen T-Zellen, welche Peptide nur im Kontext von MHC-Klasse-I-Molekülen erkennen, durch exogene Antigene.

Eine Möglichkeit, die Aufnahme von exogenem Ag durch APC und damit die Kreuzpräsentation zu induzieren, ist die rezeptorvermittelte Endozytose. In manchen Vakzinierungsprotokollen wird daher angestrebt, die Aufnahme von exogenem Ag über Phagozytoserezeptoren wie z.B. DEC-205 zu induzieren, der vor allem von DC exprimiert wird. Hierfür werden die TAA an einen anti-DEC-205 Antikörper gekoppelt (Guo et al., 2000; Pardoll, 2002). In einer Studie wurden Melanom-spezifische Proteine (TRP-2 bzw. gp100) an einen anti-DEC-205 Antikörper gekoppelt (Mahnke et al., 2005). Es konnte gezeigt werden, dass diese Vakzinierung erfolgreich das Wachstum von metastasierenden Melanomen verlangsamen konnte. Die Kreuzpräsentation kann aber auch von Antikörper-Komplexen, apoptotischen und nekrotischen Zellen, sowie auch Hitze-Schock-Proteinen (HSP) induziert werden (Heath und Carbone, 2001).

Bekanntes TAA können zudem über indirekte Methoden, z.B. durch DNA- oder RNA-Vakzinierung mit viralen oder nicht-viralen Vektoren in die APC gebracht werden. Hierdurch werden die TAA in den APC exprimiert und können so direkt auf den MHC-Klasse-I-Molekülen präsentiert werden (Pardoll, 2000).

Diese Methode der Tumorzakzinierung ist technisch relativ einfach, jedoch muss die Aufnahme der TAA durch APC erhöht werden. Dazu müssen die TAA an andere Moleküle komplexiert werden oder indirekt als Nukleotid-Sequenz in die APC gebracht werden. Zudem müssen die APC noch durch andere Moleküle aktiviert werden, damit die T-Zellen optimal stimuliert wird.



#### 1.2.2.4. Aktivierungsmethoden von APC

Die Stärke einer zytotoxischen T-Zell-Antwort hängt neben der Kreuzpräsentation der Antigene auch vom Status der Aktivierung der APC ab. Je besser die APC aktiviert werden, um so mehr kostimulatorische Moleküle werden auf der Oberfläche exprimiert und desto stärker ist die Aktivierung der zytotoxischen T-Zellen. Für eine erfolgreiche Vakzinierung ist es daher wichtig, die effiziente Präsentation des Antigens auf den APC mit der Stimulierung der APC zu verbinden.

DC können mit mehreren Zytokinen (Interleukine 2, 4, 7, 12, IFN- $\gamma$ , TNF $\alpha$ , GM-CSF), aber auch mit Antikörpern gegen stimulatorische Moleküle (z.B. anti-CD40 Antikörper) aktiviert werden. Zudem können auch Pathogen-assoziierte Moleküle, z.B. Liganden (Lipopolysaccharide, CpG-ODN) der Toll-like Rezeptoren (TLR), für die Aktivierung der APC verwendet werden. Außerdem finden siRNA (small interfering RNA)-vermittelte Inhibition der SOCS (suppressors of cytokine signaling)-Regulatoren Anwendung, um die APC zu aktivieren (Pardoll, 2000). Nur richtig aktivierte APC können die vollen Effektor-Funktionen der zytotoxischen T-Zellen auslösen, die für eine Tumorabstoßung nötig sind.

#### 1.2.3. Vakzinierungen mit Hitze-Schock-Proteinen (HSP)

HSP vereinigen zwei wichtige Anforderungen der Tumorstimmulierung in einem Molekül. Zum einen induzieren HSP die Kreuzpräsentation in APC, zum anderen können sie DC aktivieren. Durch ihre eigentliche Chaperon-Funktion in der Zelle können HSP Proteine und Peptide binden. HSP können somit mit TAA beladen werden. Die Interaktion der HSP-Antigen-Komplexe mit den APC führt zu der Aufnahme der HSP-Antigen-Komplexe, zur Kreuzpräsentation von HSP-gebundenen Antigenen und zur Aktivierung der APC (Srivastava, 2002a). Es wurde beobachtet, dass die Aufnahme dieser HSP-Antigen-Komplexe von APC über Rezeptor-vermittelte Endozytose erfolgt (Singh-Jasuja et al., 2000; Suzue et al., 1997). Die Aktivierung der APC wird dem sogenannten Adjuvans-Effekt der HSP zugeschrieben. Die Aktivierung durch HSP ist Rezeptor-vermittelt und führt zu einer Hochregulation von kostimulatorischen Molekülen auf der Oberfläche der APC. Zudem führt die Aktivierung der APC zu einer Sekretion von Chemokinen und Zytokinen, die wiederum andere Immunzellen aktiviert. Das Resultat der HSP-Aufnahme ist also eine

Präsentation der HSP-gebundenen Peptide auf den MHC-Klasse-I-Molekülen der stimulierten APC und die dadurch mögliche, effiziente Aktivierung von Ag-spezifischen zytotoxischen T-Zellen (Blachere et al., 1997; Moroi et al., 2000).

HSP können im Fall von bekannten MHC-Epitopen der TAA mit diesen Peptiden beladen werden. Tumorstimmung mit solchen HSP/Peptid-Komplexen kann zu starken Immunantworten gegen das gebundene Peptid führen. Die Immunisierung gegen unbekannte TAA ist aber auch möglich. Es wurde gezeigt, dass Immunisierungen mit aus Tumorzellen isolierten HSP, die mit unbekanntem Peptidmischungen beladen waren, zu starken Tumor-spezifischen Immunantwort führten (Tamura et al., 1997). Dies impliziert, dass die HSP in der Tumorzelle potentielle TAA in ihrer Chaperon-Funktion gebunden hatten.

Zusätzlich kann auch ein ganzes TAA (oder ein Fragment des TAA) an das HSP fusioniert werden. Dies hat den Vorteil, dass das genaue MHC-Epitop nicht bekannt sein muss, bzw. dass man gegen mehrere MHC-Epitope immunisieren kann. Zudem ist die Effizienz der Kreuzpräsentation bei fusionierten HSP-Antigen-Komplexen im Vergleich zu Peptid-beladenen HSP höher, da diese kovalent gebunden sind und alle HSP-Moleküle mit einem Antigen verbunden sind.

HSP-Antigen-Komplexe können relativ günstig, einfach und schnell hergestellt und verabreicht werden. Durch die Möglichkeit der Fusion der HSP mit dem Antigen kann auch theoretisch jedes beliebige TAA an das HSP gebunden werden. Vor allem zeichnen sich HSP-Antigen-Komplexe dadurch aus, dass bei Ihrer Verabreichung keine zusätzliche Aktivierung der APC nötig ist. HSP verbinden somit in einem Molekül die Fähigkeit zur Aufnahme und Kreuzpräsentation von Antigen, sowie die Aktivierung von APC.

### **1.3. Hitze-Schock-Proteine (HSP) sind mehr als molekulare Chaperone**

#### 1.3.1. HSP sind molekulare Chaperone

HSP wurden erstmals vor 40 Jahren in Fruchtfliegen entdeckt, als jemand aus Versehen die Temperatur eines Inkubators voller Fruchtfliegen hochdrehte. Die Chromosomen in den Speicheldrüsenzellen dieser Fruchtfliegen zeigten charakteristische Blasen, die auf transkriptionelle Aktivität in bestimmten Genloci hinwiesen (Lindquist und Craig, 1988). Die Genprodukte dieser Loci wurden bald unter den Namen Hitze-Schock-Proteine bekannt, und konnten in allen Zellen aller Lebewesen nachgewiesen werden. Keine der HSP kommen normalerweise im Blut oder anderen Körperflüssigkeiten vor und ihr Auftreten außerhalb von Zellen weist auf physische Beschädigung der Zellen hin (Srivastava, 2002a). Bis jetzt sind 8 verschiedene HSP-Familien mit unterschiedlicher Anzahl von Proteinen pro Familie bekannt. Die Proteine werden anhand ihres Molekulargewichts in Familien eingeteilt und werden oft mit "Hsp" plus Molekulargewicht benannt, z.B. Hsp70 (Tabelle 1-1).

Die konstitutive Expression der HSP macht ca. 5% der totalen Proteinmenge einer ruhenden Zelle aus. Stressfaktoren (Hitzeschock, Toxine, oxidativer Stress und Glukosedeprievation) verstärken die Expression der HSP, sodass die HSP bis zu 15% der gesamten Proteinmenge unter diesen Bedingungen in der Zelle ausmachen. Als molekulare Chaperone können HSP Peptide und Proteine binden. Diese Fähigkeit ist ATP-abhängig. HSP übernehmen viele wichtige Funktionen in der Zelle und sind so z.B. in der Proteinfaltung, Proteindegradation, Aufbau von Multiproteinkomplexen, Thermotoleranz und Pufferung der Expression von Mutationen impliziert. (Srivastava, 2002b). HSP kommen funktionell als Monomer (Hsp70), Dimer (Hsp90), Hexamer (Hsp100) oder Oligomer (GroEL und kleine HSP) vor. Die HSP kooperieren miteinander und stellen teilweise füreinander die Substrate zur Verfügung, wie im Fall der kleinen HSP, die nicht-gefaltete Proteine einfangen, die dann von Hsp70 gefaltet werden (Walter und Buchner, 2002) .

Tabelle 1-1: Die HSP-Familien (nach Srivastava, 2002b)

HSP Familie	Mitglied	Intrazelluläres Vorkommen
Kleine HSP 10-30 kDa	Hsp10, GroES, Hsp16, $\alpha$ -Crystallin, Hsp20, Hsp25, Hsp26, Hsp27	Zytosol
HSP40	Hsp40, DNAJ, SIS1	Zytosol
HSP47	Hsp47	Endoplasmatisches Retikulum
Calreticulin	Calreticulin, Calnexin	Endoplasmatisches Retikulum
HSP60	Hsp60, Hsp65, GroEL	Zytosol und Mitochondrien
HSP70	Hsp70 (Hsp72, Hsp70.3, Hsp1A), Hsp70L1 (HspA14), Hsc70 (Hsp73, HspA8), Hsp110/SSE, DNAK, SSC1, SSQ1, ECM10, grp78 (BiP), grp170	Zytosol  Mitochondrien Endoplasmatisches Retikulum
HSP90	Hsc84, Hsp86, HTPG, gp96 (grp94, Hsp108, Endoplasmin)	Zytosol Endoplasmatisches Retikulum
HSP100	Hsp104, Hsp110, CLP Proteine, Hsp78	Zytosol Zytosol Mitochondrien

Als molekulare Chaperone können die HSP Proteine und Peptide binden und die Struktur dieser Peptid-Bindestellen wurde für manche HSP charakterisiert. Bei Hsp70 ist die Peptid-Bindestelle im C-Terminus (Zhang et al., 2004), während sie bei gp96 im N-Terminus lokalisiert ist (Linderoth et al., 2000). Die ATPase-Domäne liegt bei Hsp70 N-terminal, bei gp96 C-terminal. ATP-Bindung führt zu ATP/ADP-Hydrolyse und zu einer konformationellen Veränderung, nämlich der Öffnung eines helikalen Deckels, der so den Zugang zur Peptid-Bindestelle freigibt.

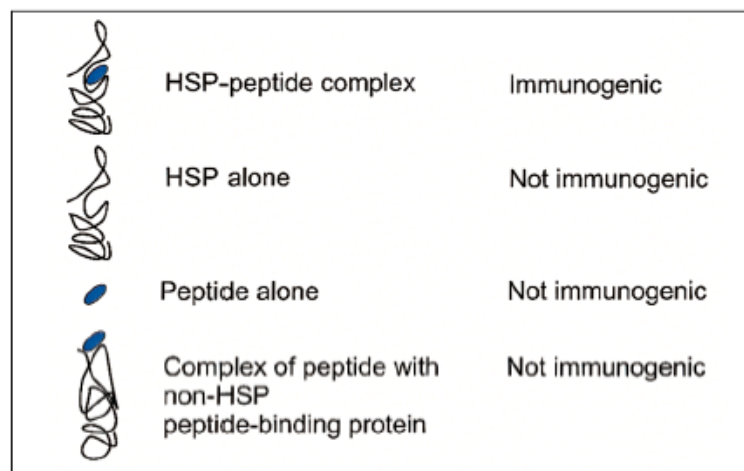
### 1.3.2. Immunologische Eigenschaften von HSP

Schon in den 40iger-Jahren des letzten Jahrhunderts wurde beobachtet, dass Mäuse, welche mit bestrahlten, gen-identischen Tumorzellen immunisiert wurden, eine protektive Anti-Tumorimmunität besaßen (Gross, 1943). Aus diesen und nachfolgenden Experimenten konnten zwei Erkenntnisse gewonnen werden (Srivastava und Old, 1988): (1) Tumorzellen sind immunogen für gen-identische Wirte und müssen sich daher von normalen Zellen unterscheiden. Dies gilt für chemisch- und UV-induzierte, sowie für spontane Tumoren. (2) Die Immunität gegen Tumorzellen ist spezifisch für einen jeweiligen Tumor, da die immunisierten Mäuse am besten vor Tumoren geschützt waren, mit deren Zellen sie immunisiert wurden. Die immunisierten Mäuse besaßen nur schwache oder keine protektive Anti-Tumorimmunität gegen andere Tumore. Diese beiden Erkenntnisse führten zur Suche nach Tumor-spezifischen Antigenen.

Auf der Suche nach diesen Tumor-spezifischen Antigenen stieß man in den 80iger-Jahren des letzten Jahrhunderts auf die immunologischen Eigenschaften der HSP. Einer der Ansätze, um Tumor-spezifische Antigene zu finden, bestand darin, ihre Eigenschaft zur Induzierung von protektiver Anti-Tumorimmunität auszunützen. Hierzu wurden chromatographische Fraktionen von Tumorzelllysaten in Tumorzellvaksinierungsversuchen eingesetzt und das Wachstum des gleichen Tumors wurde nach Vakzinierung in Mäusen analysiert. Die Fraktionen mit protektiven Eigenschaften wurden weiter aufgetrennt und getestet, bis man eine homogene Präparation aus einem Protein erhielt. Es stellte sich heraus, dass alle so identifizierten und protektiven Proteine HSP waren (Palladino et al., 1987; Srivastava und Das, 1984; Ullrich et al., 1986), unabhängig aus welchem Tumor diese isoliert wurden. Es handelt sich hierbei vor allem um Mitglieder der HSP70- und HSP90-Familien, namentlich gp96, Hsp70, Hsp90, Calreticulin, Hsp110 und grp170 (Srivastava et al., 1998).

Es wurde zuerst spekuliert, dass die Immunogenität der Tumor-HSP einem somatischen Polymorphismus zugrunde liegt, sodass sich HSP aus Tumorzellen und normalen Zellen unterscheiden. Jedoch konnte bei Sequenzanalysen der cDNA von HSP aus Tumorzellen und normalen Zellen kein Unterschied gefunden werden (Srivastava, 1993). Srivastava entdeckte 1993, dass eine anscheinend homogene und reine HSP-Präparationen eine

große Anzahl an Peptiden enthielt. Es konnte gezeigt werden, dass die Behandlung von gp96 mit ATP zu einer Elution eines breiten Spektrums an Peptiden führte (Li und Srivastava, 1993). Nach der ATP-Behandlung bleiben die HSP intakt und behalten Ihre zellbiologische Funktion, verlieren aber ihre protektive Eigenschaft der Induzierung von Anti-Tumorantworten (Udono und Srivastava, 1993). Zudem konnte nachgewiesen werden, dass nicht nur HSP-Präparationen aus Tumorzellen antigenes Peptid gebunden haben, sondern auch HSP aus transfizierten (Arnold et al., 1995) und infizierten (Nieland et al., 1996) Zellen. Daraus wurde gefolgert, dass HSP eine Art antigenen Fingerabdruck der Zelle mit sich führen. Die Elution der endogen gebundenen Peptide von Hsp70 und ihre Charakterisierung mittels Proteomics zeigte, dass diese zwischen 8 und 26 Aminosäuren lang sind (Grossmann et al., 2004). Darüber hinaus ist das Repertoire an Hsp70-gebundenen Peptiden nicht zufällig und die gebundenen Proteine besitzen alle bestimmte Bindemotive. Auch scheinen HSP Peptide unabhängig vom MHC-Haplotyp der Zellen zu binden (Srivastava, 2002a).



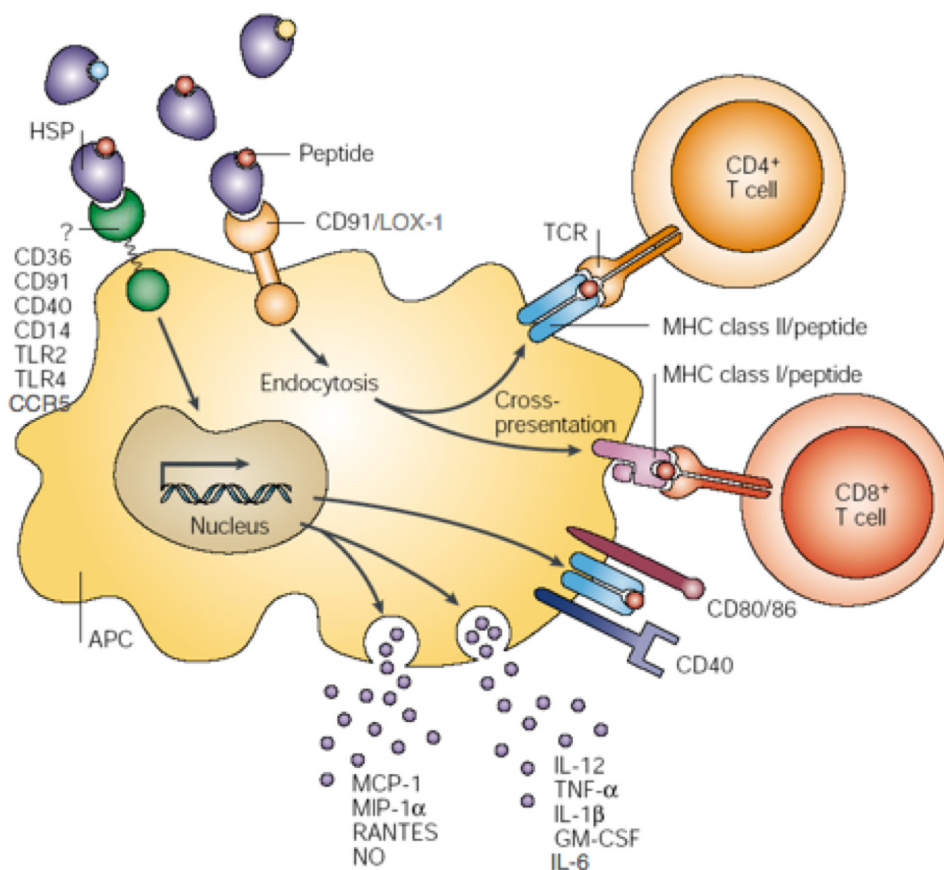
**Abbildung 1-1: Nur HSP-Peptid-Komplexe zeigen eine Immunogenität**

HSP und Peptide alleine, sowie Peptid-Komplexe mit nicht-HSP peptidbindende Proteine zeigen keine Immunogenität (nach Srivastava et al., 1998).

Die Beladung mit Peptiden ist wichtig für die Immunogenität der HSP. Abbildung 1-1 zeigt, dass unbeladene HSP, Peptide ohne HSP und Peptide, die an nicht-HSP (z.B. BSA) gebunden sind, keine Immunogenität zeigen (Srivastava et al., 1998). Die Aktivierung von zytotoxischen T-Zellen kann auch mit HSP erfolgen, die mit synthetischem Peptid

(Blachere et al., 2005) oder mit einem antigenem Protein fusioniert sind (Suzue et al., 1997).

Wie schon oben beschrieben, sind HSP in der Lage in APC, die Kreuzpräsentation zu induzieren. Hierbei werden die an HSP gebundenen und fusionierten Peptide/Proteine von den APC aufgenommen und auf MHC-Klasse-I-Molekülen präsentiert (Abbildung 1-2). Verschiedene potentielle Endozytoserezeptoren für HSP wurden beschrieben (Binder et al., 2004), darunter CD91, LOX-1, CD40, CD36, Toll-like receptor-2 (TLR-2), TLR-4 sowie der Scavenger-Rezeptor-A (SR-A). Es wurde auch gezeigt, dass die Kreuzpräsentation von HSP-gebundenem Antigen auf MHC-Klasse-I-Molekülen zytotoxische T-Zell-Antworten auslösen kann (Blachere et al., 1997; Moroi et al., 2000).



**Abbildung 1-2: Aktivierung des angeborenen und adaptiven Immunsystems durch HSP**

(nach Srivastava, 2002b)

HSP können nicht nur die Kreuzpräsentation in APC induzieren, sondern auch APC aktivieren (Asea et al., 2000; Harmala et al., 2002; Massa et al., 2005) und so über die aktivierten APC die Zellen des angeborenen und adaptiven Immunsystems stimulieren

(Abbildung 1-2). Diese Eigenschaft, die auch als Adjuvans-Effekt der HSP bekannt ist, führt zu einer Sekretion von Chemokinen und Zytokinen (Srivastava, 2002a). Die durch den Adjuvans-Effekt der HSP sekretierten Chemokine und Zytokine wirken auf DC, Makrophagen und NK-Zellen. Zudem führt der Adjuvans-Effekt zu einer Migration der APC zu den drainierenden Lymphknoten (Srivastava, 2002a). Auch die Hochregulation der DC-Maturationsmarker, sowie der kostimulatorischen Moleküle (MHC II, CD86, CD83 und CD40) auf der Oberfläche der DC (Basu et al., 2000; Singh-Jasuja et al., 2000) ist ein Resultat des Adjuvans-Effekts der HSP. Zu den sekretierten Zytokinen gehören IL-12 (Aktivierung von NK-Zellen), IL-1 $\beta$  (Aktivierung des vaskulären Endotheliums), TNF $\alpha$  (Aktivierung von Lymphozyten) und GM-CSF (stimuliert das Wachstum der DC) (Basu et al., 2000). Außerdem werden die Chemokine MCP-1, MIP1- $\alpha$ , and RANTES (Lehner et al., 2000) sezerniert, welche Makrophagen, NK-Zellen und T-Zellen anlocken. Es konnte gezeigt werden, dass der Adjuvans-Effekt der HSP von TLR2 und TLR4 vermittelt wird (Asea et al., 2002). Bemerkenswert ist, dass die Aktivierung der APC durch HSP unabhängig von den gebundenen Peptiden ist (Srivastava, 2002a). Die starken immunstimulatorischen Eigenschaften der HSP machen sie als Vakzine sehr interessant.

HSP gelten als die einzigen Säugetierproteine, die einen solchen Adjuvans-Effekt besitzen (Srivastava et al., 1998). Daher wurden in den letzten Jahren aber Zweifel am Adjuvans-Effekt der HSP vorgebracht, da einige der Rezeptoren (TLR2 und TLR4) die für die Stimulierung der APC in Frage kommen, gleichzeitig auch Rezeptoren für Endotoxine (z.B. LPS) sind und die Effekte, die durch HSP resultieren, die gleichen sind wie die der natürlichen Liganden (Wallin et al., 2002). Im Verlauf dieser Arbeit wurde 2006 für gp96 gezeigt, dass nach Endotoxin-Abreicherung kein stimulatorischer Effekt auf APC, verglichen mit nicht Endotoxin-abgereicherten gp96, zu beobachten war. Zudem konnte Endotoxin-freies gp96 *in vitro* keine zytotoxischen Effektorzellen aktivieren. Zugabe von kleinen Mengen TLR2 und TLR4 Liganden zu Endotoxin-freiem gp96 konnte die davor beobachteten Effekte wiederherstellen, obwohl alle Faktoren allein in diesen Mengen keine Wirkung auf APC hatten (Warger et al., 2006).

Wie stark, und ob überhaupt, diese Endotoxin-Kontamination Einfluss auf den Adjuvans-Effekt anderer HSP (z.B. Hsp70) hat, ist ungewiß. Zudem ist es offen, ob Endotoxin-freies gp96 oder andere Endotoxin-freie HSP *in vivo* nicht doch immunstimulatorische Eigenschaften haben.



Eine andere besondere Eigenschaft der HSP, die hier erwähnt werden sollte, ist die hohe Effizienz der induzierten Kreuzpräsentation *in vivo* und *in vitro*, verglichen mit Peptid oder Protein allein. Wenige ng bis µg von Peptid-beladenen HSP (100 pmol - 1 nmol) reichen aus, um Mäuse zu vakzinieren (Srivastava, 2002a). Dies entspricht ungefähr einem Faktor 1000 - 100000, mit welchem die HSP/Peptid-Komplexe effizienter als Peptide allein sind. HSP können zudem mit einem synthetischen Antigenpeptid beladen werden (Blachere et al., 1997). Die Beladung erfolgt durch ATP/ADP-Behandlung der HSP, welche zu einer Dissoziation/Assoziation mit dem Peptid führt. Um die Bindung eines Antigenes an die HSP zu verbessern, kann dieses auch direkt an das HSP fusioniert und rekombinant hergestellt werden (Suzue und Young, 1996; Suzue et al., 1997). Dies bedeutet, dass Herstellung, Aufreinigung und Applikation von Antigen-spezifischen HSP-Vakzinen relativ einfach und schnell durch Fusionsproteine erfolgen kann. Zudem kann die Vakzinierung rasch an ein anderes TAA angepasst werden.

Bis jetzt wurden verschiedene HSP beschrieben, die Kreuzpräsentation induzieren können und immunstimulatorische Eigenschaften haben. Neben den beobachteten Effekten für gp96 (Udono et al., 1994), gibt es in der Literatur Hinweise auf ähnliche Funktionen für mykobakterielles Hsp70 (MacAry et al., 2004; Suzue et al., 1997), murines Hsp70 (Faure et al., 2004; Udono und Srivastava, 1993), Hsc70 (Udono et al., 2001) und Hsp70L1 (Wan et al., 2004; Wu et al., 2005). Diese verschiedenen Mitglieder der Hsp70-Familie wurden jedoch noch nie in Bezug auf ihre immunstimulatorischen Eigenschaften miteinander verglichen.

## 2. Zielsetzung

Hitze-Schock-Proteine (HSP) sind bekannt dafür, die Kreuzpräsentation von Antigenen in DC zu induzieren. Zusätzlich können HSP durch ihren Adjuvans-Effekt DC aktivieren. Diese Eigenschaften machen HSP-Antigen-Komplexe zu geeigneten Vakzinen, um antigenspezifische CD8<sup>+</sup> T-Zellen-Antworten gegen Tumor-assoziierte-Antigene zu initiieren. Bis jetzt wurden die immunologischen Eigenschaften (Aktivierung des Immunsystems und Kreuzpräsentation) von verschiedenen HSP beschrieben. Jedoch ist wenig über die stimulatorischen Eigenschaften im Vergleich der HSP untereinander bekannt. In dieser Arbeit werden verschiedene HSP der HSP70-Familie miteinander verglichen. Dazu werden vier verschiedene HSP der HSP70-Familie verwendet: 3 murine HSP70 (Maus-Hsp70, Maus-Hsc70, Maus-Hsp70L1) und das *Mycobacterium tuberculosis* Hsp70, die jeweils an ein Fragment von Ovalbumin (OVA) als Modell-Tumor-Antigen fusioniert werden. Bei dem Modellantigen OVA handelt es sich um ein sehr gut charakterisiertes Antigen, für welches auch MHC-Klasse-I und II Peptidpitope bekannt sind. Zudem existieren für dieses Antigen eine Reihe von Analyse-Systemen, unter anderem transgene T-Zellen (OT-I und OT-II) mit einem OVA-spezifischen TCR und Tumorzellen, die mit dem Ovalbumin-Gen transfiziert sind (MO4). Mit Hilfe dieser vier, rekombinant in *E.coli* hergestellten, Hsp70-OVA-Fusionsproteine sollen folgende Fragen geklärt werden:

- Welches der oben beschriebenen Hsp70 hat die stärksten immunstimulatorischen Eigenschaften? Hierzu wird die Fähigkeit zur Aktivierung von OVA-spezifischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen verglichen.
- Welches Hsp70 eignet sich am besten für die Tumorstimmung? Wie weit unterscheiden sich die induzierte protektive Anti-Tumorstimmung der vier Hsp70-OVA Fusionsproteine?
- Worin besteht der Adjuvans-Effekt der HSP? Wie weit beeinflusst eine mögliche Endotoxin-Kontamination die immunologischen Eigenschaften der rekombinant hergestellten Hsp70-OVA-Fusionsproteine? Wie wirkt sich eine Endotoxin-Abreicherung auf diese Eigenschaften aus?

### 3. Material und Methoden

#### 3.1. Material

##### 3.1.1. Bezugsquellen

##### **Chemikalien**

Chemikalien und Grundsubstanzen wurden von den Firmen Sigma (Deisenhofen), Serva (Heidelberg), Merck (Darmstadt), Roche (Mannheim), Invitrogen (Eggenstein), und Roth (Karlsruhe) bezogen.

##### **Enzyme**

Restriktionsenzyme und andere DNA/RNA modifizierende Enzyme wurden von den Firma MBI Fermentas (St. Leon-Rot) bezogen. Vereinzelt wurden Enzyme der Firmen Roche (Mannheim) und New England Biolabs (Bad Schwalbach), Stratagene (Amsterdam, Niederlande), Sigma (Deisenhofen), Bioron (Ludwigshafen) und Invitrogen (Eggenstein) verwendet.

##### **Einmalartikel**

Die Plastikartikel für die Zellkultur und die molekularbiologischen Arbeiten wurden von den Firmen Eppendorf (Hamburg), Gilson (Villiers le Bel, Frankreich), Greiner (Frickenhausen), Falcon (BD Biosciences, Heidelberg), Nalgene Nunc (Rochester USA), Starlab (Ahrensburg) und TPP (Trasadingen, Schweiz) bezogen.

##### 3.1.2. Verwendete Kits

BCA Protein Assay Kit (Pierce)	Bestimmung von Proteinkonzentrationen
BD Cytofix/Cytoperm Plus (with GolgiPlug) Kit (BD Biosciences)	Nachweis intrazellulärer Antigene
QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen)	Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen über Säulen
QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen)	Aufreinigung von Plasmid-DNA aus Bakterien über Säulen

3.1.3. Geräte

AutoMACS	Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach)
Brutschrank Hera Cell 240	Kendro (Langenselbold)
Eismaschine Wessamat	Zugck (Leimen)
Elektrophorese-Kammer Miniprotean 3 Cell	Bio-Rad (München)
Elektrophorese-Kammer Protean II xi Cell	Bio-Rad (München)
Elektrophorese-Kammer B2	OWI Separation Systems (Portsmouth, Niederlande)
Endosafe-PTS	Charles River Laboratories (l'Arbresle, Frankreich)
FACScan/FACS-Calibur	BD Biosciences (Heidelberg)
Feinwaage AE163	Mettler (Gießen)
Kühlzentrifuge Biofuge fresco	Kendro (Langenselbold)
Kühl- und Gefrierschränke	Liebherr (Ochsenhausen)
Kühlschüttelinkubator innova 4230	New Brunswick Scientific (Edison, USA)
Lumi-Imager	Roche Boehringer Mannheim Diagnostics (Mannheim)
Magnetrührer, Heizplatte MR 3002	Heidolph (Schwabach)
Mikroskop Axiovert 40 C	Carl Zeiss Jena (Jena)
Mikroskop SM-LUX	Leitz (Wetzlar)
PCR-Block Peltier Thermal Cycler 200	MJ Research Inc. (Watertown, USA)
pH-Meter 761 Calimetric	Knick (Berlin)
Photometer GENESYS 10uv	Thermo Fisher Scientific (Dreieich)
Schüttelinkubator Certomat	Sartorius BBI Systems (Göttingen)
(Schüttel-)Wasserbad HAAKE SWB25	Thermo Fisher Scientific (Dreieich)
Schüttler GFL 3015	Omnilab (Mettmenstetten, Schweiz)
Semi-dry Blotter SD 1	cti (Idstein)

Semi-dry Blotter Trans-Blot SD	Bio-Rad (München)
Spannungsgeräte Consort E835	OWI Separation Systems (Portsmouth, Niederlande)
Sterilbank HeraSafe	Kendro (Langenselbold)
Taumelrollenmischer RM 5-40	CAT Ingenieurbüro (Staufen)
Thermomixer comfort	Eppendorf (Hamburg)
Tischzentrifuge Centrifuge 5415 D	Eppendorf (Hamburg)
Ultraschallgerät Sonofier 250	Branson (Connecticut, USA)
Vortexer Reax 2000	Heidolph (Schwabach)
Waage HF-3000G	A&D Company (Japan)
Zentrifuge Avanti J-25	Beckman Coulter (Krefeld)
Zentrifuge Minifuge 2	Kendro (Langenselbold)
Zentrifuge Sepatech	Kendro (Langenselbold)
Zentrifuge TJ-6	Beckman Coulter (Krefeld)

#### 3.1.4. Puffer und Lösungen

In der Regel wurden die Lösungen mit doppelt deionisiertem und autoklaviertem Wasser (ddH<sub>2</sub>O) angesetzt. Bei Lösungen, die als konzentrierte Stammlösung angesetzt werden, ist der Konzentrationsfaktor in Klammern angegeben. Lösungen, die feucht autoklaviert werden (121 °C, 25 Min) sind mit \* gekennzeichnet. Steril filtrierte Lösungen wurden durch einen Filter mit dem Porendurchmesser 0,2 µm filtrierte. Bei Lösungen, die nicht bei Raumtemperatur aufbewahrt werden, ist die Temperatur in Klammern angegeben. Die Prozentangaben beziehen sich, sofern nicht anders angegeben, auf Volumenprozent (v/v). Prozentangaben, die sich auf Gewicht pro Volumeneinheit beziehen, sind mit (w/v) gekennzeichnet.

ACK-Lyse-Puffer (steril filtriert)	0,15 M NH <sub>4</sub> Cl; 10 mM KHCO <sub>3</sub> ; 0,1 mM EDTA; pH 7,3
AutoMACS Waschpuffer (10x) (steril filtriert)	10xPBS; 20 mM EDTA; 5% (w/v) Bovine serum albumin (BSA); pH 7,2
AutoMACS Laufpuffer (10x) (steril filtriert)	1x PBS; 20 mM EDTA; pH 7,2
CD-Puffer	DPBS; 1 mg/ml Collagenase IV; 1 mg/ml DNase
CIP-Puffer (10x) (-20 °C)	100 mM Tris; 100 mM MgCl <sub>2</sub> ; pH 7,5
Coomassie-Färbelösung	40% Methanol; 12% Essigsäure; 0,16% Coomassie R-250 (w/v)
Coomassie-Entfärbelösung	40% Methanol; 12% Essigsäure;
Denaturierender Waschpuffer A	10 mM Tris; 8 M Harnstoff; 100 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ; 150 mM NaCl; 1% Triton X-114; pH 8,0
Denaturierender Waschpuffer B	10 mM Tris/HCl; 8 M Harnstoff; 100 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ; 150 mM NaCl; 20 mM Imidazol; 1% Triton X-114; pH 6,3
DNA-Ladepuffer (-20 °C)	0,1% (w/v) Bromphenol Blau; 0,1% (w/v) Xylen Cyanol FF; 15% Glycerole
dNTP-Mix (10x) (-20 °C)	10 mM dATP; 10 mM dTTP; 10 mM dCTP; 10 mM dGTP
DPBS (Dulbeccos PBS)	0,9 mM CaCl <sub>2</sub> ; 2,7 mM KCl; 1,2 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ; 0,5 mM MgCl <sub>2</sub> ; 137 mM NaCl; 8,1 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ; pH 7,4
Elutionspuffer	1x PBS (Endotoxin-frei); 200 mM Imidazol
FACS Puffer	1x DPBS; 1% fätales Kälserum (FCS); 0,015 M NaN <sub>3</sub>
Gewebepuffer	100 mM Tris; 200 mM NaCl; 5 mM EDTA; 0.2% (w/v) SDS; pH 8,5
Ligationspuffer (10x) (-20 °C)	500 mM Tris; 100 mM MgCl <sub>2</sub> ; 20 mM DTT; 20 mM Spermidin; pH 7,5
MACS Puffer (steril filtriert)	1x PBS; 2 mM EDTA; 0,5% (w/v) Bovine serum albumin (BSA); pH 7,2
Nativer PAGE Probenpuffer (2x)	62,5 mM Tris; 25% Glycerin; 1% (w/v) Bromphenolblau; pH 6,8

Nativer PAGE Laufpuffer (10x)	250 mM Tris; 1920 mM Glycin
Nativer Lyse-Puffer	50 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ; 300 mM NaCl; 10 mM Imidazol; pH 8,0
Nativer Waschpuffer	50 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ; 300 mM NaCl; 20 mM Imidazol; pH 8,0
PBS (10x) * (Phosphatgepufferte Salzlösung)	1,3 M NaCl; 0,026 M KCl; 0,015 M KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ; 0,04 M Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ; pH 7,2
PCR-Puffer (10x)	100 mM Tris; 500 mM KCl, 25 mM MgCl <sub>2</sub> ; pH 8,3
Ponceau-Rot-Lösung	0,2% (w/v) Ponceau-S-Rot, 3% Essigsäure
SDS-PAGE Probenpuffer (6x)	62,5 mM Tris; 20% Glycerin; 2% (w/v) SDS; 714 mM Beta-Mercaptoethanol; 0,025% (w/v) Bromphenolblau; pH 6,8
SDS-PAGE Laufpuffer (10x)	250 mM Tris; 1920 mM Glycin; 1% (w/v) SDS
TAE-Puffer (10x)	400 mM Tris/HCl pH 7,4; 50 mM NaAc; 10 mM EDTA
TE-Puffer (10x)	100 mM Tris/HCl pH 8,0; 10 mM EDTA
TTT-Puffer	1x PBS (endotoxin-frei); 25 mM Tris/HCl; 150 mM NaCl; 0,4% Triton X-114; 0,4% Tween 20; pH 7,8
Western Blot Transferpuffer	48 mM Tris; 39 mM Glycin; 0,0375% (w/v) SDS; 20% Methanol
Western Blot Strippingpuffer	1x PBS; 0,1% Tween 20; 2% (w/v) SDS; 100 mM Beta-Mercaptoethanol

\* 10x PBS (endotoxin-frei), pH 7,2 wurde von der Firma Invitrogen (Eggenstein) bezogen.

### 3.1.5. Bakterienstämme

<b>XL1-Blue</b>	[ <i>E. coli</i> K12 <i>recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac</i> [F' <i>proAB lacI<sup>q</sup>ZΔM15 Tn10</i> (Tet <sup>r</sup> )] Stratagene (Heidelberg)
<b>BL21(DE3)pLysS</b>	[ <i>E. coli</i> B F <sup>-</sup> <i>ompT hsdSB</i> (r <sub>B</sub> <sup>-</sup> m <sub>B</sub> <sup>-</sup> ) <i>gal dcm</i> (DE3) pLysS (Cam <sup>R</sup> )] Invitrogen (Eggenstein)
<b>BL21-Star(DE3)pLysS</b>	[ <i>E. coli</i> B F <sup>-</sup> <i>ompT hsdSB</i> (r <sub>B</sub> <sup>-</sup> m <sub>B</sub> <sup>-</sup> ) <i>gal dcm rne131</i> (DE3) pLysS (Cam <sup>R</sup> )] Invitrogen (Eggenstein)
<b>Rosetta2(DE3)</b>	[ <i>E. coli</i> B F <sup>-</sup> <i>ompT hsdSB</i> (r <sub>B</sub> <sup>-</sup> m <sub>B</sub> <sup>-</sup> ) <i>gal dcm</i> (DE3) pRARE2 (Cam <sup>R</sup> )] Novagen (Schwalbach)

### 3.1.6. Zelllinien

Für Tumorexperimente wurde die murine Melanom-Zelllinie MO4 benutzt (Falo et al., 1995; Moore et al., 1988). MO4 ist eine B16-Transfektante, die Ovalbumin exprimiert, und wurde von Tewfik Miloud (DKFZ) zur Verfügung gestellt wurde.

### 3.1.7. Medien

Die für die Zell- und Bakterienkultur verwendeten Medien und Medienzusätze wurden von den Firmen Invitrogen (Eggenstein), Difco (Detroit/USA) und Sigma (Deisenhofen) bezogen.



### 3.1.7.1. Medien für Bakterien

LB-Medium: Trypton (10 g/l), Hefeextrakt (5 g/l), NaCl (10 g/l = 171 mM)

2xYT-Medium: Trypton (16 g/l), Hefeextrakt (10 g/l), NaCl (5 g/l = 85 mM)

SOB-Medium: Trypton (20 g/l), Hefeextrakt (5 g/l), NaCl (0,85 mM),  
KCl (2,5 mM), MgCl<sub>2</sub> (10 mM), MgSO<sub>4</sub> (10 mM), pH 7,0

SOC-Medium: Trypton (20 g/l), Hefeextrakt (5 g/l), NaCl (0,85 mM),  
KCl (2,5 mM), MgCl<sub>2</sub> (10 mM), MgSO<sub>4</sub> (10 mM),  
Glucose (0,5 g/l), pH 7,0

Antibiotika Stammlösungen:

Amp<sup>50</sup> (50 mg/ml Ampicillin (Na-Salz) in ddH<sub>2</sub>O, steril filtriert)

Cam<sup>35</sup> (35 mg/ml Chloramphenicol (Na-Salz) in Ethanol, steril filtriert)

Medien für Bakterienkulturen wurden mit ddH<sub>2</sub>O angesetzt und anschließend autoklaviert (121 °C, 25 Min). Im Falle von SOB-Medium und SOC-Medium wurden die Medien mit Trypton, Hefeextrakt, NaCl und KCl angesetzt und der pH eingestellt. Nach dem Autoklavieren wurde MgCl<sub>2</sub> (10 ml/l einer steril filtrierten 1 M Lösung) und MgSO<sub>4</sub> (10 ml/l einer steril filtrierten 1 M Lösung) hinzugefügt. Für das SOC-Medium wurde zudem nach dem Abkühlen auf ca. 60 °C die Glucose (10 ml/l einer steril filtrierten 50% (w/v) Lösung) hinzugefügt.

Zum Gießen von SOB- und LB-Agarplatten wurde dem Medium vor dem Autoklavieren 1,5% Agar zugesetzt. Nach dem Abkühlen auf Handwärme wurden damit 10 cm Petrischalen gefüllt (ca. 20 ml/Schale). Die Platten wurden mit leicht geöffnetem Deckel unter der Sterilbank stehen gelassen, bis der Agar erstarrt und ausreichend getrocknet war.

Für Selektiv-Medium bzw. -Agar wurde nach dem Abkühlen auf ca. 60 °C das entsprechende Antibiotikum aus der 1000x Stammlösung zugesetzt. Nicht sofort verwendete Platten können bei 4 °C maximal 3 Monate gelagert werden.

### 3.1.7.2. Medien für die Zellkultur

	Grundmedium	Zusätze
MO4	DMEM	10% FCS, 2 mM Glutamin, 1 mg/ml G418
BMDC	RPMI	10% FCS, 10% filtrierter F1/16 Überstand, 2 mM Glutamin, 40 µM Beta-Mercaptoethanol, 100 U/ml Penicillin-Streptomycin

Die Grundmedien wurden durch Zugabe von Medienzusätzen aus in der Regel 100x Stammlösungen ergänzt. Fötales Kälberserum (FCS) wurde vor Gebrauch 1 h bei 56 °C erhitzt, um Komplementfaktoren zu inaktivieren.

Für die Kultivierung von BMDC wurde der Überstand der Zelllinie F1/16 verwendet. Diese Zelllinie sezerniert den Granulozyten-Macrophagen Kolonie-stimulierenden Faktor (granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF)) in den Überstand. Für das BMDC-Medium wurde der F1/16-Überstand 10%ig eingesetzt. F1/16 Überstand wurde von Martin Wühl (DKFZ, Heidelberg) hergestellt und zur Verfügung gestellt.

Weitere Medien und Zusätze für die eukaryontische Zellkultur:

Einfrüermedium	RPMI, 50% FCS, 10% DMSO
Trypsin/EDTA	0,05% Trypsin, 0,65 mM EDTA
T-Zell-Medium	RPMI, 10%FCS, 2 mM Glutamin, 50 µM Beta-Mercaptoethanol, 100 U/ml Penicillin-Streptomycin
G418	Stammlösung: 144 mM (100 mg/ml)

### 3.1.8. Mauslinien

	Mauslinie (MHC-Haplotyp)	Gebräuchlicher Name	Referenz
Inzuchtlinie	C57BL/6J (H-2b)	B6J	
Transgene Linie	C57BL/6J-Tg(TcraTcrb)1100Mjb/J / Thy1 <sup>a</sup> (H-2b)	OT-I (Thy1.1)	(Hogquist et al., 1994; Marshak-Rothstein et al., 1979)
	C57BL/6J-Tg(TcraTcrb)425Cbn / Thy1 <sup>a</sup> (H-2b)	OT-II (Thy1.1)	(Jung et al., 2002; Marshak-Rothstein et al., 1979)
	B6.FVB-Tg(Itgax-DTR/EGFP)57Lan/Orl	CD11c.DTR	(Jung et al., 2002)
Knockout Linie	C57BL/6J -Tlr4 <sup>tm1Aki</sup> (H-2b)	TLR4 <sup>-/-</sup>	(Hoshino et al., 1999)

Alle Mauslinien stammen aus eigener Züchtung. OT-I Mäuse exprimieren einen transgenen T-Zell-Rezeptor (TCR) V $\alpha$ 2 und V $\beta$ 5, der H-2K<sup>b</sup> zusammen mit dem Ovalbumin Peptid 257-264 (SIINFEKL) erkennt. Bei Thy1.1 handelt es sich um ein Allel des T-Zellmarkers CD90 (Thy1). Durch das Thy1.1-Allel können T-Zellen einer Spendermaus (hier Thy1.1) von denen einer Empfängermaus (Thy1.2 bei C57BL/6J Mäusen) unterschieden werden.

OT-II Mäuse exprimieren einen transgenen T-Zell-Rezeptor (TCR) V $\alpha$ 2 und V $\beta$ 5, der I-A<sup>b</sup> zusammen mit dem Ovalbumin-Peptid 323-339 (ISQAVHAAHAEINEAGR) erkennt.

CD11c.DTR besitzen einen transgenen Diphtherie-Toxin-Rezeptor unter Kontrolle des CD11c-Promotors. Durch Spritzen von Diphtherie-Toxin (DT) können so spezifisch CD11c<sup>+</sup> dendritische Zellen (DC) depletiert werden. OT-II und CD11c.DT Mäuse wurden mir freundlicherweise von Jörg Striegler (DKFZ, Heidelberg) zur Verfügung gestellt.

Die LPS-hyposensiblen TLR4<sup>-/-</sup> Mäuse haben eine Deletion in dem TLR4 codierenden Gen. Dies führt zu einem Defekt in der LPS-Signaltransduktion.

3.1.9. Antikörper

Marker	Klon	Verdünnung und Anwendung	Spezies	Isotyp
<b>FACS</b>				
Maus CD11c	HL3	1:100 FACS	Hamster, monoklonal	IgG2a
Maus CD4	RM4-5	1:200 FACS	Ratte, monoklonal	IgG2a
Maus CD40	3/23	1:100 FACS	Ratte, monoklonal	IgG2a
Maus CD8a	53-6.7	1:100 FACS	Ratte, monoklonal	IgG2a
Maus CD80	16-10A1	1:100 FACS	Hamster, monoklonal	IgG2
Maus CD86	GL1	1:100 FACS	Ratte, monoklonal	IgG2a
Maus F4/80	BM8	1:100 FACS	Ratte, monoklonal	IgG2a
Maus I-A/I-E	2G9	1:100 FACS	Ratte, monoklonal	IgG2a
Maus IL-2	JES6-5H4	1:50 FACS	Ratte, monoklonal	IgG2b
Maus IFN $\gamma$	XMG1.2	1:50 FACS	Ratte, monoklonal	IgG1
Maus H-2 K <sup>b</sup>	Y3	1:100 FACS	Maus, monoklonal	IgG2a
Maus Thy1.1	OX-7	1:400 FACS	Ratte, monoklonal	IgG1
Maus Thy1.2	53-2.1	1:200 FACS	Ratte, monoklonal	IgG2a
Maus TNF- $\alpha$	MP6-XT22	1:50 FACS	Ratte, monoklonal	IgG1
Maus SIINFEKL/H-2 K <sup>b</sup>	25.D1-16	1:100 FACS	Maus, monoklonal	IgG2a
Maus V $\alpha$ 2 TCR	B20.1	1:100 FACS	Ratte, monoklonal	IgG2a
<b>Western Blot</b>				
Maus IgG		1:5000 WB	Ziege, polyklonal	
His6	13/45/31a	1:1000 WB	Maus, monoklonal	IgG1
T7-tag (MASMTGGQMG)	T7-tag	1:20000 WB	Maus, monoklonal	IgG2b

Monoklonale Antikörper, die in der Durchflusszytometrie (FACS) verwendet wurden, wurden als Biotin- oder Fluorochrom-Konjugate (FITC, PE, PerCP-Cy5.5, APC) von der

Firma BD Biosciences (Heidelberg) bezogen. Der polyklonale Ziege-Anti-Maus-IgG Antikörper wurde von der Firma Pierce (Bonn) und der T7-tag Antikörper von der Firma Novagen (Schwalbach) bezogen. Gerd Moldenhauer (DKFZ, Heidelberg) stellte den His6 Antikörper zur Verfügung.

### 3.1.10. Plasmide

Für die Klonierung und Expression der Hsp-Antigen-Fusionsproteine wurden die Plasmide pRSET B (Invitrogen) und pET-21d(+) (Novagen) verwendet.

### 3.1.11. cDNA

Die cDNA für die murinen Hsp70-Isoformen (mHsp70, mHsc70, mHsp70L1) wurden vom RZPD Deutsches Ressourcenzentrum für Genomforschung GmbH (Berlin und Heidelberg) bezogen. Die cDNA für das Hühnereiweiß-Albumin (Ovalbumin) wurde von Yuval Reiss (Tel Aviv, Israel) zur Verfügung gestellt. Die cDNA des C-terminalen Fragments (AS 359-625) *Mycobacterium tuberculosis* Hsp70 wurde freundlicherweise von Paul Lehner (Cambridge, England) zur Verfügung gestellt. Die cDNA des SBP-tags wurde freundlicherweise von Alexandra Kienast (DKFZ, Heidelberg) zur Verfügung gestellt.

Hier gebrauchter Name	Name	Genbank Accession # bzw. Referenz
<b>mHsp70</b>	Mus musculus heat shock protein 1A	BC054782
<b>mHsc70</b>	Mus musculus heat shock protein 8	BC006722
<b>mHsp70L1</b>	Mus musculus heat shock protein 14	BC002056
<b>mtubHsp70</b>	Mycobacterium tuberculosis DnaK (C-term: AS 359-625)	NC_00962 (MacAry et al., 2004)
<b>Ovalbumin</b>	Gallus gallus ovalbumin	NM_205152
<b>SBP-tag</b>	streptavidin-binding peptide	(Keefe et al., 2001)

Für die HSP-OVA-Fusionsproteine wurde ein Fragment des Ovalbumin verwendet (AS 146-359), welches auch das H-2K<sup>b</sup> Epitop SIINFEKL (Ovalbumin AS 257-264) und das I-A<sup>b</sup> Epitop ISQAVHAAHAEINEAGR (Ovalbumin AS 323-339) enthält.

### 3.1.12. PCR-Primer und andere Oligonukleotide

Primer für die Klonierung der Hsp70-Antigen-Fusionsproteine:

<b>mtubHsp70-ct-fwd (36-mer)</b>	5'-CCG AGC TCG AGG GAG GTG AAA GAC GTT CTG CTG CTT-3'
<b>mtubHsp70-ct-rev (33-mer)</b>	5'-CGC TTC CAT GGA ATC AGC CGA GCC GGG GTG GGC-3'
<b>mHsp70-fwd (36-mer)</b>	5'-CCG AGC TCG AGG ATG GCC AAG AAC ACG GCG ATC GGC-3'
<b>mHsp70-rev (36-mer)</b>	5'-CGC TCC GGT ACC ATC CAC CTC CTC GAT GGT GGG TCC-3'
<b>mHsc70-fwd (36-mer)</b>	5'-CCG AGC TCG AGG ATG TCT AAG GGA CCT GCA GTT GGC-3'
<b>mHsc70-rev (36-mer)</b>	5'-CGC TTC GGT ACC ATC CAC CTC TTC AAT GGT GGG GCC-3'
<b>mHsp70L1-fwd (36-mer)</b>	5'-CCG AGC TCG AGG ATG GCG GCG ATC GGC GTG CAC CTG-3'
<b>mHsp70L1-rev (33-mer)</b>	5'-CGC TTC CAT GGA TGC AAC CTC AAC AGT AAT GGC-3'
<b>SBP-adap-fwd (81-mer)</b>	5'-CGC TTA AGC TTG ATC AGC TCG AGA GGT ACC ATG GAA TTC GGA TCC GAC GAT AAG ACC ACC GGC TGG AGG GGC GGC-3'
<b>SBP-adap-rev (33-mer)</b>	5'-GGG CCC GTC GAC GGG CTC CCT CTG GCC CTG GGG-3'

Primer zum Nachweis von Transgenen in Schwanz-DNA:

<b>TLR4a (27-mer)</b>	5'-CGT GTA AAC CAG CCA GGT TTT GAA GGC-3'
<b>TLR4b (29-mer)</b>	5'-GCA AGT GTG AAA ATG ACA AAT CTG CAG AG-3'
<b>TLR4c (27-mer)</b>	5'-ATC GCC TTC TAT CGC CTT CTT GAC GAG-3'

Die Primer wurden von Herrn W. Weinig (Abteilung Oligonukleotidsynthese/DNA-Sequenzierung, DKFZ, Heidelberg) synthetisiert und HPLC-gereinigt.

CpG-ODN 1668 (20-mer) mit der Sequenz 5'-TCC ATG ACG TTC CTG ATG CT-3' wurde entweder von Herrn W. Weinig (Abteilung Oligonukleotidsynthese/DNA-Sequenzierung, DKFZ, Heidelberg) oder der Firma MWG-BIOTECH (Ebersberg) synthetisiert. Das Phosphothioat-stabilisierte Oligonukleotid wurde über HPLC aufgereinigt.

### 3.1.13. Peptide

Die Peptide S8L (SIINFEKL) und I16R (ISQAVHAAHAEINEAGR) wurden mittels Festphasensynthese nach der Fmoc/tBU-Strategie von Dr. R. Pipkorn (Peptidsyntheseeinheit DKFZ, Heidelberg) synthetisiert. Die Produkte wurden über HPLC aufgereinigt und massenspektrometrisch überprüft (Reinheit > 95%).

## **3.2. Molekularbiologische Methoden**

### 3.2.1. Lagerung und Kultivierung von Bakterien

XL-1-Blue Bakterien wurden immer in LB-Medium kultiviert. Vorkulturen von Bakterien (BL21 und Rosetta), die für Überexpression verwendet wurden, wurden in SOB-Medium angesetzt. Als Hauptkulturmedium für die Überexpression wurde LB gewählt.

#### **3.2.1.1. Herstellung von chemisch kompetenten Bakterien**

Bakterien wurden aus einer Glycerinkultur auf LB-Platten ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Bei bestimmten Bakterien (BL21(DE3)pLysS, BL21-Star(DE3)pLysS und Rosetta2(DE3)) enthielt die Platte und das weiter unten verwendete LB-Medium 35 µg/ml Chloramphenicol. Aus einer einzelnen Kolonie wurde eine 20 ml Vorkultur in LB-Medium angesetzt. Am nächsten Tag wurde 1 ml der Vorkultur zu 200 ml vorgewärmtem LB-Medium gegeben und bei 37 °C im Schüttler inkubiert. Bei einer OD<sub>600</sub> von 0,6 wurden 600 ml vorgewärmtes LB-Medium dazugegeben. Nach 20 min wurde die Hauptkultur geerntet und für 10 min bei 5000 Upm (Minifuge) zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 250 ml eiskaltem 100 mM CaCl<sub>2</sub> aufgenommen. Nach einer einstündigen Inkubation auf Eis wurde für 10 min bei 5000 Upm (Minifuge) zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 5 ml eiskaltem 100 mM CaCl<sub>2</sub> mit 10% Glycerol aufgenommen. 100 µl Aliquote wurden in Eppendorf-Reaktionsgefäße pipettiert und bei -70 °C gelagert.

### **3.2.1.2. Transformation von XL1-Blue für die Klonierung**

XL1-Blue Bakterien wurden für die Klonierung der Fusionsproteine verwendet. Für eine Transformation wurden 0,1-1 µg Plasmid (in 20 µl) mit 50 µl der aliquotierten, chemisch kompetenten XL1-Blue gemischt und 20 min auf Eis gestellt. Die Bakterien wurden im Thermomixer bei 42 °C für 90 sec erhitzt und dann auf einer LB-Platte mit Ampicillin ausgestrichen. Einzelne Kolonien wurden für eine Mini-Präparation gepickt und in LB-Medium mit Ampicillin über Nacht im Schüttler bei 37 °C inkubiert.

### **3.2.1.3. Transformation von Bakterien für die Überexpression**

BL21(DE3)pLysS, BL21-Star(DE3)pLysS und Rosetta2(DE3) Bakterien wurden für die Überexpression der rekombinanten Proteine verwendet. Für eine Transformation wurden 0,1-1 µg Plasmid (in 3 µl) mit 100 µl der aliquotierten, chemisch kompetenten Bakterien gemischt und 30 min auf Eis gestellt. Die Bakterien wurden im Thermomixer bei 42 °C für 45 sec erhitzt und sofort für 2 min wieder auf Eis gestellt. Nach Zugabe von 1 ml SOC-Medium wurden die Bakterien 45 min bei 37 °C geschüttelt. 100 µl der Suspension und 100 µl einer 1:10 Verdünnung in ddH<sub>2</sub>O wurden auf einer SOB-Platte mit Ampicillin und Chloramphenicol ausgestrichen. Einzelne Kolonien wurden für eine Vorkultur in SOB-Medium mit Ampicillin und Chloramphenicol gepickt.

### **3.2.1.4. Bakterien-Glycerin-Stocks**

Um die transformierten Bakterien dauerhaft bei -70 °C lagern zu können, wurden 850 µl der Bakteriensuspension mit 150 µl Glycerin gemischt und in flüssigem Stickstoff eingefroren, bevor sie bei -70 °C gelagert wurden.



### 3.2.2. Präparation, enzymatische Manipulation, Analyse und Sequenzierung von DNA

#### **3.2.2.1. Gelelektrophorese**

Für 1,0 und 1,5 % Agarosegele wurde die Agarose mit 1x TAE aufgekocht und auf 60°C abgekühlt. Als Laufpuffer diente 1x TAE. Der DNA-Ladepuffer wurde in einem Verhältnis von 1:5 Teilen DNA eingesetzt. Nach dem Auftragen der Proben erfolgte der Lauf bei 80-100 V. Als Marker dienten entweder Lambda/Eco RI & Hind III (Fermentas) oder GeneRuler DNA Ladder Mix (Fermentas). Nach dem Lauf wurde das Agarosegel 10 min in einem Ethidiumbromid-Bad (2,5 µg/ml Ethidiumbromid in TAE-Puffer) gefärbt und 10 min mit H<sub>2</sub>O entfärbt.

#### **3.2.2.2. Isolierung von DNA-Fragmenten durch Gelextraktion**

Die Aufbereitung von DNA aus Agarosegelen wurde nach den Angaben des Herstellers mittels des QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen) durchgeführt.

#### **3.2.2.3. Restriktionsverdau und Erzeugung von glatten Enden der DNA-Doppelstränge**

Die durch Restriktionsverdau oder PCR gewonnenen DNA-Fragmente wurden mittels Gelextraktion isoliert und über Restriktionsschnittstellen in entsprechend geschnittene und dephosphorylierte Plasmide ligiert.

Der Restriktionsverdau wurde in den von Fermentas empfohlenen Puffern und Temperaturen durchgeführt. Für zwei Enzyme mit unterschiedlichen Temperatur- oder Pufferbedingungen wurden die Verdau nacheinander angesetzt und die Pufferbedingungen entsprechend angepaßt. Ein analytischer Verdau wurde mit 50-100 ng DNA durchgeführt, ein präparativer mit 250-2000 ng. Von den Restriktionsenzymen wurden im analytischen Verdau 2,5-10 U eingesetzt, im präparativen 7,5-30 U. Die Reaktion wurde für 90 min bei 37 °C durchgeführt, sofern die optimalen Bedingungen nicht bei höheren Temperaturen (z.B. 55 °C) lagen.

Für die Erzeugung von DNA-Doppelsträngen mit glatten Enden ("blunt end") wurde zu der gesamten verdauten DNA-Menge ein Mix aus T4-Polymerase-Puffer, dNTPs und T4-DNA-

Polymerase gegeben. Durch die Katalyse der DNA-Synthese in 5'→3' Richtung ermöglicht die T4-DNA-Polymerase das Auffüllen von 5'-Überhängen. 3'-Überhänge werden durch die ebenfalls vorhandene 3'→5' Exonuklease-Aktivität der T4-DNA-Polymerase verdaut. Pro Ansatz wurden 100 µM eines jeden dNTP, 1x T4-DNA-Polymerase Puffer sowie 1-3 U T4-DNA-Polymerase pro µg DNA für 20 min bei 11 °C inkubiert. Die Hitze-Inaktivierung des Enzyms erfolgt bei 75 °C für 10 min.

Um die Religation eines restriktionsgeschnittenen Vektors zu verhindern, wurde der Phosphatrest am 5'-Ende des DNA-Moleküls durch die „calf intestinal phosphatase“ (CIP) entfernt. Dazu wurde dem frisch restriktionsgeschnittenen Plasmid 0,5 U CIP pro µg Vektor DNA hinzugegeben. Die Reaktion lief bei 5'-überstehenden Enden bei 37 °C für 30 min, bei glatten und 3'-Überhängen 15 min bei 37 °C und anschließend in beiden Fällen 15 min bei 56 °C. Anschließend wurden die linearisierten Plasmide über ein Agarosegel isoliert.

#### **3.2.2.4. PCR**

Für das Einfügen von Restriktionsschnittstellen in die cDNA der HSP oder des SBP-tag wurde eine Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) durchgeführt. Mit Hilfe von zwei entgegengesetzt orientierten, spezifischen Primern lassen sich bei der PCR aus DNA-Proben Sequenzen amplifizieren (Mullis et al., 1986). Zudem können auch durch die Primer fremde Sequenzen an den 5' und 3' Enden eingefügt werden. Durch diese Technik wurden am 5' und 3' Ende der HSP cDNA bzw. des SBP-tag neue Restriktionsstellen eingesetzt. Die PCR wurde in einem Volumen von 50 µl in Gegenwart von 1x Expand High Fidelity Puffer mit 15 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,2 mM dNTPs, 2,6 U Expand High Fidelity Enzym-Mix und jeweils 300 nM fwd- und rev-Primer durchgeführt. Die Menge an Template-DNA variierte zwischen 0,2-0,5 µg. Für die PCR-Reaktion wurden folgende Bedingungen gewählt: Zunächst erfolgte die Denaturierung der doppelsträngigen DNA bei 94 °C für 3 min, danach bei 94 °C für 30 sec. Das Annealing wurde bei 55 °C für 35 sec und die Amplifikation bei 72 °C für 45 sec durchgeführt. Bei den nun folgenden 10 Zyklen wurde die Annealing-Temperatur pro Zyklus um 1 °C reduziert. Die Denaturierung erfolgte bei 94 °C für 3 min, die Amplifikation bei 72 °C für 45 sec. Anschließend wurden 20 Zyklen bei 94 °C für 30 sec, 45 °C für 35 sec und 72 °C für 45 sec durchgeführt. Die Endelongation erfolgte bei 72 °C für 6 min.

### 3.2.2.5. Ligation von DNA-Fragmenten

Die Ligation der durch Restriktion entstandenen DNA-Fragmente wurde mit T4-DNA-Ligase durchgeführt. Die Menge der aus dem Gel eluierten Insert- und Vektor-Fragmente wurde nach folgender Formel abgeschätzt:

$$\frac{\text{Vektor [ng]} \times \text{Länge des Inserts [kb]}}{\text{Länge des Vektors [kb]}} \times 3 = \text{Insert [ng]}$$

Es wurden von dem Insert- bzw. Vektor-Fragment jeweils ungefähr 10-30 ng eingesetzt.

Ligationsansatz: X µl Vektor DNA  
 Y µl Insert DNA  
 1 µl T4-DNA-Ligase (10 U/µl)  
 2 µl T4-DNA-Ligasepuffer (10x)  
 Auf 20 µl mit sterilem ddH<sub>2</sub>O auffüllen.

Der Ligationsansatz wurde für 4-8 h bei 16 °C inkubiert. Anschließend wurde der gesamte Ligationsansatz für die Transformation in XL1-Blue eingesetzt.

### 3.2.2.6. Plasmidisolierung (Mini-Präparation)

Die Isolierung der Plasmid-DNA aus transformierten XL1-Blue Zellen wurde nach der Methode von Qiagen durchgeführt. Dazu wurden von der über Nacht gewachsenen 4 ml Kultur 2x 1,5 ml abgenommen und 2 min bei 13000 Upm (Tischzentrifuge) abzentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand verworfen. Das Pellet wurde in 250 µl Puffer P1 resuspendiert, mit 250 µl Puffer P2 versetzt, 4-6 mal geschwenkt, sofort mit 350 µl Puffer N3 versetzt und erneut 4-6 mal geschwenkt. Nach 10 min Zentrifugieren bei 13000 Upm wurde der Überstand auf die QIAprep Säule überführt und 1 min bei 13000 Upm zentrifugiert. Die Säule wurde nach Entfernen des Filtrats mit 750 µl Puffer PE gewaschen und 1 min bei 13000 Upm zentrifugiert. Nach dem Verwerfen des Filtrats wurde erneut 1 min bei 13000 Upm zentrifugiert. Zur Elution der DNA wurden 150 µl TE-Puffer auf die Säule gegeben und nach 1 min bei 13000 Upm 2 min lang abzentrifugiert.

### 3.2.2.8. Bestimmung der DNA-Konzentration

Zur Bestimmung der DNA-Konzentration wurde die Absorption bei 260 nm gemessen:

Zur Umrechnung gilt:

- 1 OD<sub>260</sub> = 50 µg dsDNA/ml
- 1 OD<sub>260</sub> = 40 µg ssDNA/ml
- 1 OD<sub>260</sub> = 33 µg ssOligonukleotide/ml

Da die aromatischen Aminosäurereste in Proteinen bei 280 nm absorbieren, kann eine Verunreinigung der isolierten Nukleinsäuren nach der Warburgschen Formel

$$((1,45 \times \text{OD}_{280}) - (0,74 \times \text{OD}_{260})) = \text{mg Protein/ml}$$

berechnet werden. Der Quotient OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub> einer sauberen DNA-Präparation sollte bei 1,8 liegen.

### 3.2.2.9. Sequenzierung von DNA

Alle Sequenzierungen wurden von MWG-BIOTECH (Ebersberg) durchgeführt.

## 3.3. Biochemische Methoden

### 3.3.1. Polyacrylamid-Gelelektrophorese

#### 3.3.1.1. SDS-PAGE nach Lämmli

Zur Auftrennung von SDS-denaturierenden Proteinen in Abhängigkeit ihrer molekularen Masse wurde ein diskontinuierliches Gelsystem (Laemmli, 1970) 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. Die Gelelektrophorese wurde in 1x SDS-Laufpuffer durchgeführt. Im Fall von Mini-Gelen (8,6 cm x 6,8 cm Trenngel) wurde

die Elektrophorese-Kammer Miniprotean 3 Cell (Bio-Rad) verwendet und 2 h bei konstanter Spannung von 160 V durchgeführt. Im Falle von Standardgelen (16 cm x 16 cm Trenngel) wurde die Elektrophorese-Kammer Protean II xi Cell (Bio-Rad) verwendet und 17 h bei konstanter Spannung von 80 V lang durchgeführt.

Acrylamidkonzentration	Mini-Gel		Standardgel	
	12% Trenngel	5% Sammelgel	10% Trenngel	5% Sammelgel
Acrylamid-Lösung 30% (w/v)	2,0 ml	0,65 ml	10,0 ml	1,3 ml
ddH <sub>2</sub> O	1,6 ml	2,73 ml	11,9 ml	5,5 ml
1,5 M Tris/HCl pH 8,8	1,25 ml	-	7,5 ml	-
1,0 M Tris/HCl pH 6,8	-	0,5 ml	-	1,0 ml
10% SDS (w/v)	50 µl	40 µl	0,3 ml	80 µl
10% Ammoniumpersulfat (w/v)	45 µl	40 µl	0,3 ml	80 µl
TEMED	5 µl	5 µl	12 µl	8 µl
Total	4,945 ml	3,965 ml	30 ml	8 ml

### 3.3.1.2. SDS-PAGE Probenvorbereitung

Die Proteinproben wurden vor dem Auftragen in die Geltaschen mit 6x SDS-Probenpuffer (auf eine Endkonzentration von 1x SDS-Probenpuffer) versetzt, 5 min bei 95 °C erhitzt und abzentrifugiert.

### 3.3.1.3. Nativ-Polyacrylamid-Gelelektrophorese nach Orstein-Davis

Zur Auftrennung von nativen Proteinen in Abhängigkeit ihrer molekularen Masse und Ladung wurde ein diskontinuierliches Gelsystem (Ornstein, 1964) verwendet. Hierzu wurden „4-15% Tris HCl Ready Gel“ Precast Gele (Bio-Rad) mit einem Acrylamid-Gradient (4% - 15%) verwendet. Bei konstanter Spannung von 200 V wurde die Gelelektrophorese 35 min mit 1x Nativ-PAGE-Laufpuffer in der Elektrophorese-Kammer Miniprotean 3 Cell (Bio-Rad) durchgeführt.

#### **3.3.1.4. Nativ-PAGE Probenvorbereitung**

Die Proteinproben wurden vor dem Auftragen in die Geltaschen mit 2x Nativ-PAGE Probenpuffer im Verhältnis 1:1 (auf eine Endkonzentration von 1x Nativ-PAGE Probenpuffer) versetzt.

#### **3.3.1.5. Protein-Molekulargewichtsmarker**

Als Molekulargewichtsmarker wurde der "Dual Color Precision Plus" Marker (Biorad) verwendet. Dieser Marker enthält Fragmentgrößen zwischen 10 und 250 kDa.

#### **3.3.1.6. Coomassie-Färbung der PAGE Gele**

Zur Anfärbung der durch SDS-PAGE oder Nativ-PAGE aufgetrennten Proteine wurden die Gele für 30 min in der Coomassie-Färbelösung geschwenkt und anschließend 30 min mit der Entfärbelösung gewaschen. Danach wurde mit H<sub>2</sub>O solange gewaschen, bis der gewünschte Färbegrad erreicht war.

### 3.3.2. Western Blot

Nach der Gelelektrophorese wurden die Proteine im Semi-dry-Blot Verfahren auf eine PVDF-Membran (Immobilon-P, Millipore) transferiert. Hierzu wurde die Membran zunächst 15 s mit absolutem Methanol dehydriert und dann 2 min in ddH<sub>2</sub>O und 5 min in Western Blot Transferpuffer äquilibriert. SDS-PAGE Gele wurden 5 min in Western-Blot-Transferpuffer äquilibriert. Whatman Filterpapiere (3 mm) wurden mit Western-Blot-Transferpuffer durchnässt. Der gestapelte Aufbau im Semi-dry Blotter Trans-Blot SD (Bio-Rad) erfolgte von unten nach oben wie folgt: 3 Whatman Filterpapiere, PVDF-Membran, Gel und nochmals 3 Whatman Filterpapiere. Mögliche Luftblasen wurden aus dem Stapel entfernt. Bei konstanter Spannung (17 V) wurde für Mini-Gele 17 min und für Standardgele 1 h lang geblottet. Nach dem Transfer wurden die farbigen Banden des Markers mit einem Kugelschreiber markiert und die Membran mit Ponceau-Rot gefärbt, um den Proteintransfer zu überprüfen.

### **3.3.2.1. Ponceau-Rouge Färbung**

Durch die Färbung der Membran mit Ponceau-Rot-Lösung 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<sub>2</sub>O entfärbt.

### **3.3.2.2. Blocken und Detektion**

Zur Immundetektion wurde die Membran entweder 1 h bei RT oder über Nacht bei 4 °C mit 1% Milchpulver (w/v) in PBS + 0,1% Tween (PBS-T) blockiert. Anschließend wurde die Membran 3x für 5 min mit PBS-T gewaschen und für 1 h bei RT oder über Nacht bei 4 °C mit Erstantikörper (verdünnt in 1% Milchpulver in PBS-T) inkubiert. Nach gründlichem Waschen mit PBS-T (3x 5 min) erfolgte die Inkubation mit einem an Peroxidase gekoppelten Zweitantikörper (verdünnt in 1% Milchpulver in PBS-T) für 1 h bei RT. Alternativ wurde anstelle von Erst- und Zweitantikörper mit Streptavidin-Peroxidase (verdünnt in 1% Milchpulver in PBS-T) für 1 h bei RT inkubiert. Nach dreimaligem Waschen für 5 min mit PBS-T und anschließenden Waschen mit PBS erfolgte die ECL-Substratreaktion. Hierzu wurde der Blot 1 min mit dem „SuperSignal West Dura Extended Substrate“ (Pierce) inkubiert und dann in eine Klarsichtfolie gepackt. Die Banden des Molekulargewichtsmarkers wurden auf der Klarsichtfolie mit einem „Autoradiography Pen“ (Sigma) markiert. Die Detektion des Chemilumineszenz-Signals fand an einem Lumi-Imager (Roche Boehringer Mannheim Diagnostics) statt.

Zum „Strippen“ der Membran wurde die Membran 30 min bei RT in Western Blot Strippingpuffer gelegt. Nach intensivem Waschen mit PBS-T wurde die Membran nochmals blockiert und dann entsprechend mit den Antikörpern inkubiert.

### 3.3.3. Herstellung und Aufreinigung von rekombinanten Proteinen

#### **3.3.3.1. Expression von rekombinanten His6-tag-Proteinen**

Nach erfolgreicher Fertigstellung der Konstrukte für die Fusionsproteine wurden diese in ein Plasmid kloniert und in einem *E.coli* Expressionsstamm transformiert. Mit den resultierenden Klonen wurde eine 50 ml Starterkultur in SOB-Medium (50 µg/ml Ampicillin, 35 µg/ml Chloramphenicol) angeimpft und diese über Nacht in einem Inkubationsschüttler bei 37 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Starterkultur zu 400 ml LB-Medium (ebenso supplementiert mit Ampicillin und Chloramphenicol, auf RT vorgewärmt) gegeben und auf eine OD<sub>600</sub> von 0,1 eingestellt und erneut im Inkubationsschüttler inkubiert, bis die OD<sub>600</sub> etwa 0,5-0,7 erreicht hatte (etwa 3-4 h). Die Expression wurde dann durch Zugabe von 1 mM IPTG induziert und die Kultur 4 h weiter auf dem Schüttler inkubiert. Danach wurde die Kultur 25 min bei 6000 Upm in einer Avanti-Zentrifuge bei 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und das Bakteriensediment (etwa 2-3 g) bei -20 °C bis zur Lyse gelagert.

#### Herstellung von rekombinanten His6-tag-Proteinen (native Bedingungen)

Für die Aufreinigung unter nativen Bedingungen wurden andere Expressionsbedingungen gewählt, um die Ansammlung der Fusionsproteine in den sogenannten Einschlusskörperchen (inclusion bodies) zu verhindern und eher lösliche Proteine zu gewinnen. Dies ermöglichte eine effizientere Aufreinigung unter nativen Bedingungen. Hierzu wurde die Starterkultur zu 400 ml LB-Medium (ebenso supplementiert mit Ampicillin und Chloramphenicol, auf RT vorgewärmt) gegeben und auf eine OD<sub>600</sub> von 0,1 eingestellt und erneut im Inkubationsschüttler bei 37 °C inkubiert bis die OD<sub>600</sub> etwa 0,5-0,7 erreicht hatte (etwa 3-4 h). Die Kultur wurde nun auf 18 °C in einem Schüttler abgekühlt (ca. 30 min). Die Expression wurde dann durch Zugabe von 1 mM IPTG induziert und die Kultur über Nacht weiter auf dem Schüttler bei 18 °C inkubiert. Danach wurde die Kultur 25 min bei 6000 Upm in einer Aventis-Zentrifuge bei 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und das Bakteriensediment (etwa 2-3 g) bei -20 °C bis zur Lyse gelagert.



### **3.3.3.2. Lyse der Bakterienzellen (denaturierende und native Bedingungen)**

Um die Fusionsproteine, die bei der Überexpression vor allem in Einschlusskörperchen vorliegen, für die Aufreinigung vorzubereiten, wurde eine Lyse unter denaturierenden Bedingungen gewählt. Zum Lysieren wurden die Zellen in 25 ml 1x PBS resuspendiert. Nach Zugabe von 1 mg/ml Lysozym und 0,1% Tween 20 wurde zunächst 1-1,5 h bei Raumtemperatur auf einem Taumelrollenmischer inkubiert. Das Lysat wurde dann mit Harnstoff (8 M Harnstoff final bei einem Endlysatvolumen von 40 ml) und NaCl (150 mM final) versetzt und nochmals 30 min bei RT auf einem Taumelrollenmischer inkubiert, bis der Harnstoff vollständig gelöst war. Mittels Ultraschall-Behandlung (Sonofier 250, Branson, Einstellung 50%, 3x 30 sec) wurde der vollständige Aufschluß durchgeführt. Das Lysat wurde bei 11000 g zentrifugiert und der Überstand bei -20 °C gelagert. Das entstandene Pellet wurde gegebenenfalls nochmals lysiert.

Für die Aufreinigung unter nativen Bedingungen wurden die Bakterienzellen in 30 ml nativen Lysispuffer resuspendiert. Nach Zugabe von 1 mg/ml Lysozym wurde zunächst 1-1,5 h bei RT auf einem Taumelrollenmischer inkubiert. Mittels Ultraschall-Behandlung (Sonofier 250, Branson, Einstellung 50%, 4x 30 sec) wurde der vollständige Aufschluss durchgeführt. Das Lysat wurde bei 11000 g zentrifugiert und der Überstand bei -20 °C gelagert. Das entstandene Pellet wurde gegebenenfalls nochmals lysiert.

### **3.3.3.3. Aufreinigung der His6-Fusionsproteine (denaturierende und native Bedingungen)**

Die Aufreinigung der His6-getagten Fusionsproteine erfolgte mittels Ni-NTA Affinitätschromatographie. Hierzu wurde das Säulenmaterial nach Absetzen der 50%-igen Ni-NTA-Agarose (3-4 ml) in einer Säule mit dem finalen Lysepuffer (ohne Lysozym) vorequiliбриert. Der Überstand des Bakterienlysats wurde dann auf die Säule geladen.

Im Falle der Aufreinigung unter denaturierenden Bedingungen wurde mit 2x 10 ml denaturierendem Waschpuffer A und 3x 10 ml denaturierendem Waschpuffer B gewaschen. Im Falle der Aufreinigung unter nativen Bedingungen wurde mit 3x 10 ml nativen Waschpuffer gewaschen.

Dem Waschen folgte gegebenenfalls die Endotoxin-Abreicherung durch das Waschen des Säulenmaterials mit 700 ml TTT-Puffer. Zur Entfernung der Detergenzien diente ein Waschschrift mit 200 ml 1x PBS (Endotoxin-frei). Zudem diente dieser Schritt zur Renaturierung des Fusionsproteins bei der Aufreinigung unter denaturierenden Bedingungen (Udono et al., 2004). In den Aufreinigungen, bei denen das Endotoxin nicht direkt auf der Säule abgereichert wurde, wurde mit 2x 10 ml 1x PBS renaturiert. Die Elution erfolgte fraktionell unter beiden Bedingungen (denaturierenden und nativen) durch die Zugabe von 10 x 500 µl Elutionspuffer. Aliquote der Fraktionen wurden auf einem SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen und gefärbt wie oben beschrieben. Proteinhaltige Fraktionen wurden vereinigt und über Nacht gegen 1x PBS (Endotoxin-frei) dialysiert.

#### 3.3.4. Endotoxin-Abreicherung

Um bakterielles Endotoxin zu entfernen, wurden verschiedene Methoden angewendet und evaluiert:

Bei der ersten Methode wurde das eluierte und dialysierte Fusionsprotein mittels einer Polymyxin-B-Säule (Detoxi-Gel AffinityPak Pre-packed Columns, Pierce) dekontaminiert (Kluger et al., 1985; Morrison und Jacobs, 1976). Hierzu wurde die Polymyxin-B-Säule mit 1% Natrium-Deoxycholat regeneriert und mit Endotoxin-freiem Wasser gewaschen. Nach der Equilibrierung mit 1x PBS (Endotoxin-frei) wurde die Säule mit dem Fusionsprotein beladen. Das Endotoxin (vor allem LPS) bindet hierbei stark an Polymyxin B, während die Fusionsproteine nicht an die Säule binden und so das LPS aus der Proteinlösung entfernt wird. Die Fusionsproteine wurden nach Angaben des Herstellers mit 1x PBS (Endotoxin-frei) unter Beachtung des Eigenvolumens der Säule eluiert. Dieser gesamte Vorgang wurde insgesamt 5-mal hintereinander durchgeführt.

Bei der zweiten Methode wurde die LPS-Entfernung mittels Triton X-114 durchgeführt (Aida und Pabst, 1990). Das dialysierte Fusionsprotein wurde mit 1% des Gesamtvolumens an Triton X-114 versetzt. Die Lösungen wurden gründlich miteinander vermischt und anschließend 5 min lang im Eiswasser inkubiert. Danach wurde die so entstandene klare, homogene Lösung wieder ausgiebig durchmischt und für 5 min bei

37 °C im Wasserbad inkubiert. Die nun trübe Lösung wurde bei 37 °C zentrifugiert (1 min bei 13000 Upm, Tischzentrifuge), sodass eine Phasentrennung stattfand. Im oberen Bereich sammelte sich eine wässrige proteinhaltige Schicht (ca. 95% des Gesamtvolumens), welche vorsichtig in ein neues Gefäß überführt wurde. Die untere Phase enthielt das dazugegebene Triton X-114 und die von ihm gebundenen Endotoxine. Sie wurde beim Abpipettieren der wässrigen Phase nicht berührt. Dieser gesamte Vorgang wurde insgesamt 2-mal hintereinander durchgeführt.

Die dritte Methode der Endotoxin-Abreicherung erfolgte direkt bei der Aufreinigung der Fusionsproteine mittels der Ni-NTA-Affinitätschromatographie. Diese Abreicherung ist an die Methode von Reed und Nicchitta (Reed et al., 2003) angelehnt. Hierbei wird das an der Ni-NTA-Agarose gebundene Fusionsprotein mit einem großen Volumen (700 ml) eines Triton X-114- und Tween 20-haltigem Tris-Puffer (TTT Puffer) gewaschen. Die beiden Detergenzien binden hierbei die Endotoxine. Zur Entfernung der Detergenzien von den Proteinen wurde noch mit 200 ml 1x PBS (Endotoxin-frei) gewaschen.

### 3.3.5. Proteinbestimmung mittels BCA

Die Proteinbestimmung wurde mittels Bicinchoninic Acid-Test (BCA) Assay Kit (Pierce) durchgeführt. Hierzu wurden die zu messenden Proteinlösungen unverdünnt oder in 1x PBS verdünnt verwendet. Jeweils 25 µl der Probe wurden in eine 96-Loch Platte pipettiert und mit 200 µl BCA-Reagenz vermischt. Für die Bestimmung der Eichgerade wurden BSA-Standards in 1x PBS (12,5 - 1000 µg/ml) erstellt. Nach 30 min Inkubation bei 37 °C wurde die Extinktion bei 562 nm gemessen. Anhand der Eichgerade konnte die unbekannte Proteinkonzentration ermittelt werden.

### 3.3.6. Quantitativer Endotoxin-Nachweis

Die quantitative Bestimmung des Endotoxingehalts in den zu untersuchenden Proteinen erfolgte durch Verwendung des Endosafe-PTS (Charles River Laboratories). Dieses

System verwendet einen kinetischen kolorimetrischen Test, der auf dem Limulus-Amöbozyten-Lysat (LAL)-Test basiert. Hierdurch ist ein quantitativer Nachweis von bakteriellem Endotoxin möglich. Für den Test wird eine Kartusche benötigt, die schon alle nötigen Reagenzien enthält: eine präzise Menge an LAL-Reagenz, chromogenem Substrat und einem Kontrollstandard-Endotoxin, dem sogenannten "spike". Endotoxine führen in der Kartusche zu einer Farbreaktion (Abspaltung eines Chromophors, dem Para-Nitroanilin), die vom Endosafe-PTS photometrisch bei 385 - 410 nm ausgelesen wird. Dabei ist die Reaktionszeit der Abspaltung des Chromophors, also die kinetische Absorption, proportional zur Menge an Endotoxin. Diese Reaktionszeit wird anhand einer Kartuschenchargen-spezifischen, archivierten Standardkurve in eine Endotoxinkonzentration umgerechnet. Zudem enthält die Kartusche einen sogenannten Spike Test (Kontrollstandard-Endotoxin), der die Probe auf Hemmer/Verstärker des LAL-Tests untersucht. Nur wenn es zur Spikewiederfindung im akzeptierten Bereich (50 - 200%) kommt, ist der Test gültig. Daher besteht die Kartusche aus 4 Kanälen, mit 2 Proben-Kanälen und 2 Spike-Kanälen zur Doppelbestimmung. Die zu untersuchenden Proteine wurden 1:40 mit Endotoxin-freiem Wasser (Charles River Laboratories) verdünnt und 4 x 25 µl auf die Kartusche aufgetragen.

### 3.3.7. Abspaltung des SBP-His6-tags

Um Verfälschungen der stimulatorischen Eigenschaften der rekombinanten Proteine durch den C-terminalen SBP-His6-tag auszuschließen, wurde dieses Peptid enzymatisch entfernt. Hierzu wurden 1 mg rekombinantes Protein mit 5 U Enterokinase Max (Invitrogen) unter Zugabe von 10x Enterokinase Puffer (Invitrogen) für 16 h bei 37 °C inkubiert (300 Upm, Thermomixer). Die Abspaltung des SBP-His6-tags wurde mittels SDS-PAGE und Western Blot überprüft. Durch die Abspaltung wurde das Molekulargewicht des rekombinanten Proteins kleiner und der SBP-tag konnte nicht mehr mittels Streptavidin-Peroxidase im Western Blot detektiert werden.

### **3.4. Zellbiologische Arbeitstechniken**

#### 3.4.1. Kultivierung eukaryontischer Zelllinien

##### **3.4.1.1. Erhaltungszellkultur**

Die Zellkulturen wurden in Inkubatoren bei 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> und gesättigtem Wasserdampf gehalten. Je nach Wachstum wurden die Zellen nach 2–4 Tagen ausgedünnt. Zum Ausdünnen oder auch zum Ernten von Zellen wurde der Überstand der Zellkultur abgenommen. Adhärenz wachsende Zellen wurden mit Trypsin/EDTA inkubiert. Anschließend wurden die Zellen durch seitliches gegen die Flasche Schlagen abgelöst und der Trypsinverdau mit 4 Volumina serumhaltigem Medium abgestoppt. Die Zellen wurden zum Ausdünnen in frische Zellkulturflaschen erneut in Kultur genommen. Zum Ernten von Zellen wurde nach dem Abstoppen des Trypsinverdaus mit DPBS gewaschen. Nach Zentrifugation (1500 Upm, 5 Min, Minifuge) und Aufnahme der Zellen in DPBS folgte die Bestimmung der Zellkonzentration mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer. Die Färbung mit 0,5%iger Trypanblaulösung ermöglichte die Unterscheidung von toten, blaugefärbten und ungefärbten, lebenden Zellen.

##### **3.4.1.2. G418 Selektion**

Zur Positivselektion der Transfektante MO4 wurden die Zellen in Zellkulturmedium mit 1000 µg/ml G418 kultiviert. G418 wurde als Stammlösung (100 mg/ml in ddH<sub>2</sub>O) angesetzt.

#### 3.4.2. Lagerung eukaryontischer Zellen

##### **3.4.2.1. Einfrieren**

Zum Einfrieren wurden die Zellen in 4 °C kaltem Einfriermedium suspendiert und in speziellen Einfrierröhrchen bei -70 °C in einer Styroporbox langsam herunter gekühlt.

DMSO diffundiert in die Zellen und verhindert die Kristallbildung beim Einfrieren und somit die Zerstörung der Zellmembran. Zur langfristigen Lagerung (> 1 Jahr) wurden die Zellen nach wenigen Tagen in flüssigen Stickstoff (-196 °C) überführt.

#### **3.4.2.2. Auftauen**

Zum Auftauen wurden die Kryoröhrchen entnommen und zügig im Wasserbad bei 37 °C aufgetaut. Sobald das Medium flüssig war, wurden die Zellen schnell in 20 ml 37 °C warmes Zellkultur-Medium überführt, abzentrifugiert (5 min, 1500 Upm, Minifuge) und in Medium aufgenommen, sodass die Kulturen dicht waren. Gegebenenfalls wurde G418 zur Selektion erst am nachfolgenden Tag hinzugegeben.

#### 3.4.3. Durchflusszytometrische Analyse von Zellen

Mittels FACS (Fluorescence Activated Cell Sorting) können Einzelzellanalysen großer Zellzahlen (ca.  $5 \times 10^5$  Zellen/min) durchgeführt werden. Durch Kombination geeigneter Färbereagenzien können gleichzeitig mehrere Antigene auf der Oberfläche einer Zelle analysiert werden, vorausgesetzt die Farbstoffe unterscheiden sich in ihren Emissionsspektren. Als Farbstoffe wurden FITC (Emissionsmaxima 519 nm), PE (578 nm), PerCP-Cy5.5 (695 nm) und APC (660 nm) verwendet. Wurden biotinylierte Antikörper benutzt, so wurde das entsprechende Streptavidin-Fluorochrom-Konjugat gleichzeitig mit den Antikörpern inkubiert.

Für die Färbung wurden die zu testenden Zellen abzentrifugiert (5 min, 5500 Upm, Tischzentrifuge) und die Zellen in FACS-Medium mit den entsprechenden Antikörpern resuspendiert. Hierbei wurden die Antikörper-Fluorochrom-Konjugate zwischen 1:100 und 1:400 verdünnt eingesetzt. Nach Inkubation (20-30 min, 4 °C, im Dunkeln) wurden die Zellen gewaschen und in möglichst kleinen Volumina FACS-Medium aufgenommen. Gegebenenfalls wurde zur Unterscheidung von toten und lebendigen Zellen 1 µg/ml Propidiumiodid (PI) hinzugegeben. Propidiumiodid kann die desintegrierte Zellmembran toter Zellen im Gegensatz zur intakten lebendiger Zellen passieren und färbt sie rot, wodurch die toten Zellen von der Analyse ausgeschlossen werden können.

Für die Färbung von antigenpräsentierenden Zellen wurde zum Verhindern der unspezifischen Bindung von Antikörpern der Fc-Rezeptor geblockt. Durch eine fünfminütige Vorinkubation der Zellen in FACS-Puffer / 5% Venimmun (Aventis, Frankfurt) blockieren die im Venimmun enthaltenden humanen IgGs die Fc-Rezeptoren der antigenpräsentierenden Zellen. Nach der Vorinkubation wurden die Zellen abzentrifugiert und wie oben beschrieben in Gegenwart von 5% Venimmun mit den Antikörper-Fluorochrom-Konjugaten gefärbt.

Für den Nachweis intrazellulärer Antigene wurde der Cytofix/Cytoperm-Kit von BD Biosciences verwendet. Hierzu wurden nach der Färbung der Oberflächenantigene die Zellen zunächst in je 100 µl Cytofix/Cytoperm-Lösung für 20 min bei 4 °C im Dunkeln inkubiert und anschließend 2x mit Perm/Wash-Lösung gewaschen. Die intrazelluläre Färbung erfolgte nun mit je 50 µl der entsprechenden Antikörperverdünnung für 20 min bei 4 °C. Nach zweimaligem Waschen mit FACS-Medium wurden die Zellen in möglichst kleinen Volumina FACS-Medium aufgenommen.

Die gefärbten Zellen wurden an einem FACScan bzw. FACS-Calibur Durchflusszytometer gemessen. Die Daten wurden anschließend mit Hilfe der Software Cell-Quest Pro (BD Biosciences) oder FlowJo (Tree Star, Ashland, USA) analysiert.

#### 3.4.4. Isolierung von Zellsubpopulationen mittels MACS

Das magnetische Zellsortieren mittels des MACS-Systems (Magnetic Activated Cell Sorting) arbeitet mit submikroskopisch kleinen, superparamagnetischen, antikörpergekoppelten Kügelchen (beads). Nach der Bindung der magnetischen beads-gekoppelten Antikörper an Oberflächenantigene können die so markierten Zellen von einem Magneten zurückgehalten und so isoliert bzw. aus einer Kultur entfernt werden. Dazu werden mit Magnetpartikeln beladene Zellen im AutoMACS-Gerät durch eine Säule in einem Magneten geleitet, gewaschen und eluiert, nachdem das Magnetfeld um die Säule entfernt wurde.

Die Beladung der Zellen mit den an Antikörper gekoppelten Magnetobeads geschah nach den Angaben des Herstellers (Miltenyi Biotec). Die Zellen wurden abhängig von ihrer Zellzahl in MACS-Puffer resuspendiert und nach Zugabe von an Antikörper gekoppelten Magnetobeads wurde bei 4 °C für 15 min inkubiert. Nach Waschen mit MACS-Puffer wurden die Zellen in 0,5-2 ml resuspendiert, filtriert (40-µm-Zellsieb), und im AutoMACS auf die Säulen beladen. Die Wahl des Programms für das magnetische Zellsortieren folgte den Angaben des Herstellers.

#### 3.4.5. *In vivo* Proliferations-Assay

Für *in vivo* Proliferationsversuche wurden MACS-aufgereinigte T-Zellen in DPBS resuspendiert und anschließend mit CFSE (5,6-Carboxyfluorescein-diacetat-succinimidylester) markiert. CFSE lag als 5 mM Stammlösung in DMSO vor und wurde bei -20 °C im Dunkeln gelagert. Zur Markierung wurde eine Einzelzellsuspension ( $5 \times 10^7$  Zellen / ml DPBS) mit 5 µM CFSE im Dunkeln für 20 min bei 37 °C inkubiert. Danach wurden die Zellen 2-mal mit DPBS gewaschen und in DPBS aufgenommen.

#### 3.4.6. Generierung von dendritischen Zellen aus dem Knochenmark

Die Generierung der BMDC erfolgte in Anlehnung an das Protokoll von Lutz et al. (Lutz et al., 1999). Dieses Protokoll ermöglicht eine Präparation von  $1-3 \times 10^8$  DC nach zehn bis zwölf Tagen aus dem Knochenmark einer Maus.

Die Zellen, die aus dem Knochenmark isoliert wurden (s. Entnahme von Knochenmark zur Generierung von primären dendritischen Zellen), wurden gezählt (alle Zellen bis auf Erythrozyten). Die Zellen wurden in Petrischalen oder 6-Loch Platten ausplattiert. Hierzu wurden bakteriologische Petrischalen oder Platten verwendet und keine für die Zellkultur. Beide Arten Schalen/Platten bestehen aus Polyesterol, die Zellkultur-Schalen sind aber zudem noch behandelt, um ein homogenes Anhaften der Zellen am Boden zu ermöglichen. Dies ist hier aber unerwünscht, da sonst die Zellen auch ohne Ausreifung anhaften



würden. Es wurden entweder  $2 \times 10^6$  Zellen in 10 ml BMDC-Medium pro 10 cm-Petrischale bzw.  $2,5 \times 10^5$  Zellen in 1,5 ml pro Loch in der 6-Loch Platte ausplattiert. Nach drei Tagen folgte ein Zusatz von neuem BMDC-Medium (10 ml pro Schale bzw. 1 ml pro Loch). An Tag sechs und acht wurde das Medium gewechselt, wobei die Hälfte des Mediums abgenommen und abzentrifugiert wurde. Das Zellsediment wurde in neuem Medium aufgenommen und wieder zu den Schalen / Platten hinzugegeben. An Tag neun wurden zur Stimulation der BMDC die Fusionsproteine bzw. LPS hinzugegeben. Am nächsten Tag wurden die Zellen analysiert bzw. weiter verwendet.

### **3.5. Methoden zur Arbeit mit Mäusen**

Mäuse wurden unter spezifisch pathogenfreien Bedingungen im Zentralen Tierlabor des Deutschen Krebsforschungszentrums (Heidelberg) gehalten.

#### 3.5.1. Typisierung von transgenen und Knockout-Mäusen

##### **3.5.1.1. Isolierung von DNA aus der Schwanzspitze**

Die zur PCR-Analyse benötigte genomische DNA wurde aus einem 0.5-1 cm Stück Schwanzspitze von Mäusen gewonnen (Laird et al., 1991). Das Gewebe wurde in 700 µl Gewebepuffer aufgenommen. Nach Zugabe von 10 µl Proteinase K-Lösung (10 mg/ml) wurde über Nacht bei 56 °C inkubiert. Am folgenden Tag wurde die Probe abzentrifugiert (13000 Upm, 5 Min, Tischzentrifuge) und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Durch Zugabe des 0.6-fachen Volumens Isopropanol und mehrmaligem Schwenken wurde die genomische DNA als Flocke ausgefällt. Sie wurde mit einer zugeschmolzenen Glaskapillare aufgefischt und 10 sec zuerst in 70% Ethanol und dann in 100% Ethanol gewaschen. Die an der Glaskapillare anhaftende DNA wurde an der Luft 5 min getrocknet und das Kapillarenende in ein Reaktionsgefäß mit 100 µl TE-Puffer abgebrochen. Durch Schütteln bei 68°C auf einem Thermoschüttler löste sich die DNA in

TE-Puffer. Für PCR-Analysen wurden 5 µl einer geeigneten Verdünnung (meist 1:10) in ddH<sub>2</sub>O verwendet.

### 3.5.1.2. PCR zur Typisierung

Für die Analyse von Knockout-Genen im Mausgenom wurde die PCR eingesetzt. Hierbei wurde mittels PCR auf das Vorhandensein der Deletion in dem TLR4-codierenden Gen und des TLR4-Wildtypgens im Genom getestet. Die Primerkombination TLR4a und TLR4b führte zur Amplifikation des TLR4-Wildtyp-Gens, die Primerkombination von TLR4b und TLR4c zur Amplifikation des deletierten TLR4-Gens. Beide Primerkombinationen wurden in getrennten PCR-Reaktionsgefäßen angesetzt. Für beide Primerkombinationen erfolgte die Denaturierung der doppelsträngigen DNA bei 95 °C für 5 min, danach bei 95 °C für 1 min. Das Annealing wurde bei 62 °C für 30 sec und die Amplifikation bei 72 °C für 5 min durchgeführt. Anschließend wurden 39 Zyklen bei 95 °C für 1 min, 62 °C für 30 sec und 72 °C für 5 min durchgeführt. Die Endelongation erfolgte bei 72 °C für 10 min.

Pipettieransatz (20 µl):

- 2,5 µl 10x PCR-Puffer
- 2,5 µl TLR4b-Primer (10 µM)
- 2,5 µl TLR4a- bzw. TLR4c-Primer (10 µM)
- 1,0 µl dNTP-Mix (10 mM)
- 0,5 µl Taq-Polymerase (10 U/µl)
- 6,0 µl ddH<sub>2</sub>O
- 5,0 µl Proben DNA-Lösung

### 3.5.1.3. Isolierung von peripheren Blutlymphozyten zur Typisierung mittels Durchflusszytometrie

Zur Bestimmung der Expression des transgenen TCR und des T-Zellmarkers CD90 (Thy1) auf peripheren Blutlymphozyten (PBL) wurde den Versuchstieren durch Schnitt in die Schwanzvene 4-6 Tropfen Blut entnommen, nachdem die Tiere für drei bis fünf Minuten unter Rotlicht erwärmt wurden, um die Durchblutung anzuregen. Das Blut wurde in 400 µl DPBS/2%-Heparin aufgenommen, um die Blutkoagulation zu verhindern. Die Blutproben wurden vorsichtig auf eine Ficoll-Lösung (Lymphoprep, Axis-Shield, Oslo, Norwegen) in Zentrifugenröhrchen gegeben, sodass keine Vermischung der beiden Lösungen stattfand.

Die Dichtegradientenzentrifugation wurde bei 1800 Upm für 20 min (TJ-6 Zentrifuge) durchgeführt. Danach wurde die Lymphozyten-haltige Interphase behutsam abgenommen und mit FACS-Puffer gewaschen. Die Färbung mit Antikörper-Fluorochrom-Konjugaten erfolgte wie oben beschrieben.

### 3.5.2. Organentnahme

Für die Entnahme von Milz und Lymphknoten wurden die Mäuse durch Begasung mit CO<sub>2</sub> oder zervikale Dislokation getötet.

#### **3.5.2.1. Erythrozytenlyse**

Zellsuspensionen für die MACS-Aufreinigung und für den *in vivo* Zytotoxizitäts-Assay wurden in ACK-Lyse-Puffer aufgenommen, um die störenden Erythrozyten zu lysieren. Hierzu wurden ca.  $50 \times 10^6$  Zellen in 1 ml ACK-Lyse-Puffer aufgenommen (entspricht 2 ml ACK-Lyse-Puffer pro Milz) und 5 min bei Raumtemperatur auf einem Taumelrollenmischer inkubiert und dann mit DPBS gewaschen.

#### **3.5.2.2. Herstellung von Zellsuspensionen für MACS-Aufreinigung**

Die Milz wurde entnommen und in DPBS gelegt. Danach wurde sie in 3 Teile geschnitten und durch ein 40- $\mu$ m-Zellsieb gedrückt. Das Zellsieb wurde mit DPBS nachgewaschen. Lymphknoten wurden nach dem Entnehmen in DPBS gelegt und dann zwischen den Maträndern zweier Objektträger vorsichtig zerdrückt. Verbleibende Zellen auf den Objektträgern wurden mit DPBS abgespült. Für die MACS-Aufreinigung wurden die Zellen aus Lymphknoten und Milz vereint und mit DPBS gewaschen. Nach Zentrifugation (1500 Upm, 5 Min, 4°C, Minifuge) wurde der Überstand verworfen.

Vor der Aufnahme der Zellen in MACS-Puffer wurde die Erythrozytenlyse ausgeführt. Die Zellen wurden, wie oben beschrieben, mit den Antikörper-gekoppelten Magnetobeads (Miltenyi Biotec) inkubiert.

### 3.5.2.3. Herstellung von Zellsuspensionen für FACS-Analysen

Die Herstellung der Zellsuspension erfolgte wie unter „Herstellung von Zellsuspensionen für die MACS-Aufreinigung“. Die Zellsuspension wurde auch hier mit DPBS gewaschen und zentrifugiert (1500 Upm, 5 Min, 4 °C).

Oberflächenantigenfärbung für FACS-Analysen wurde wie oben beschrieben durchgeführt. Falls keine Färbung nötig war (wie im Fall des *in vivo* Zytotoxizitäts-Assays), wurden die Zellen direkt in FACS-Puffer aufgenommen und analysiert. Hierzu wurden Milzen in 2-3 ml FACS-Puffer und Lymphknoten in 200–300 µl resuspendiert. 1 µg/ml PI wurde zur Färbung von toten Zellen zugegeben.

### 3.5.2.4. *in vitro* Restimulation

Die Milz wurde entnommen und in DPBS gelegt. Danach wurde sie in 3 Teile geschnitten und durch ein 40-µm-Zellsieb gedrückt. Das Zellsieb wurde mit DPBS nachgewaschen und die Zellsuspension zentrifugiert (1500 Upm, 5 Min, 4 °C, Minifuge). Die Zellsuspension wurde in 1 ml T-Zell-Medium aufgenommen und 100 µl (ca.  $10 \times 10^6$  Zellen) in eine 96-Loch-Rundbodenplatte pipettiert. Der Zellsuspension wurden weitere 100 µl T-Zell-Medium mit Peptid und Brefeldin A hinzugegeben, sodass die Zellen mit 1 µM Peptid stimuliert wurden. In Anwesenheit von Brefeldin A, einem natürlichen Hemmstoff der GEF-Proteine, wird der vesikuläre Transport vom ER zum Golgi-Apparat gehemmt. Dadurch kommt es zu einer intrazellulären Ansammlung von normalerweise sezernierten Proteinen (wie z.B. IFN- $\gamma$ ). Es wurde hierbei das Brefeldin A (BD GolgiPlug, 1:1000 endverdünnt) aus dem BD Cytotfix/Cytoperm Kit verwendet. Nach 3 h Stimulation wurden die Zellen zunächst auf Oberflächenantigene gefärbt und dann mit dem BD Cytotfix/Cytoperm wie oben beschrieben auf intrazelluläre Proteine gefärbt.

### 3.5.2.5. Knochenmark-Entnahme zur Generierung von dendritischen Zellen

Mäusen wurden die Femurknochen und Tibiaknochen entfernt und die Knochen von Muskelfleisch und Sehnen befreit. Die Knochen wurden kurz in DPBS geschwenkt und ca. 1 min in 70 % EtOH desinfiziert. Die nachfolgenden Schritte wurden unter sterilen Bedingungen ausgeführt. Nach einem nochmaligen Schwenken in kaltem DPBS wurden die Knochen mit einer Pinzette fixiert und die Knochenenden mit einer kleinen Schere

gekappt. Mittels einer DPBS-gefüllten Spritze (1 ml) und einer sehr feinen Kanüle (0,4 x 19) wurde das Knochenmark mit dem DPBS aus dem Knochen in ein 15 ml Röhrchen geschwemmt. Die Knochen wurden daraufhin weiß-durchsichtig. Die Zellaggregate wurden durch Auf- und Abpipettieren mit einer Pipette aufgelöst. Nach einer zehnmütigen Zentrifugation bei 4 °C / 1500 Upm (Minifuge) wurden die Zellen in 10 ml BMDC-Medium resuspendiert. Die Zellen waren nun für die Kultivierung bereit (s. Generierung von dendritischen Zellen aus dem Knochenmark).

### **3.5.2.6. Enzymatischer Verdau von Organgeweben**

Zur Präparation von dendritischen Zellen aus Organen wurden diese Organe enzymatisch verdaut. Der enzymatische Verdau wurde in CD-Puffer durchgeführt. Hierzu wurden die entnommenen Milzen in jeweils 2 ml CD-Puffer in eine 6-Loch Platte gelegt. Nun wurde an beiden Enden der Milz 400 µl CD-Puffer in die Milz injiziert. Nach 5 min Inkubation auf Eis wurde die Milz kleingeschnitten und in ein Zentrifugenröhrchen überführt. Entnommene Lymphknoten wurden in kaltem DPBS zwischen den Matträndern zweier Objektträger zerquetscht. Die Zellsuspension wurde in Zentrifugenröhrchen überführt und abzentrifugiert. Die Zellen wurden in 1 ml CD-Puffer aufgenommen. Zu den Milzzellen und Lymphknotenzellen in CD-Puffer wurde nun ein kleiner Magnet hinzugegeben und die Suspensionen 30 min auf einem Magnetrührer (kleinste Rührgeschwindigkeit) gerührt. Nach Auf- und Abpipettieren mit einer Pipette wurde die Suspension weitere 10 min gerührt. Die Zellen wurden nun mit DPBS gewaschen und filtriert (40-µm-Zellsieb).

### 3.5.3. Injektion bei Mäusen

Der adoptive Transfer von T-Zellen und Zielzellen erfolgte stets intravenös. Die Mäuse wurden hierzu für drei bis fünf Minuten unter Rotlicht erwärmt, um die Durchblutung anzuregen. Anschließend wurden die Zellen in einem Volumen von 200 µl in die Schwanzvene injiziert. Immunisierungen erfolgten subkutan oder intravenös. Die Verabreichung von Diphtherie-Toxin erfolgte intraperitoneal.

#### 3.5.4. Adoptiver Transfer von T-Zellen

T-Zellen wurden, wie oben beschrieben, mittels Magnetobeads markiert und über den AutoMACS aufgereinigt. Ein kleiner Teil des T-Zell-haltigen Eluats wurde per FACS-Analyse auf die Reinheit überprüft. Der Rest wurde, wie oben beschrieben, für die Analyse der *in vivo* Proliferation mit CFSE markiert. Nach dem Waschen wurden die T-Zellen nochmals gezählt und in einem geeigneten Volumen DPBS aufgenommen, sodass das Volumen 200 µl für einen Transfer entsprach. Die Zellen wurden intravenös in die Schwanzvene gespritzt.

#### 3.5.5. *In vivo* Zytotoxizitäts-Assay

Eine Methode, T-Zellen bezüglich ihrer lytischen Effektoreigenschaften zu untersuchen, stellt der *in vivo* Zytotoxizitäts-Assay dar. Die Quantifizierung der T-Zell-vermittelten Lyse erfolgt direkt *in vivo*. Hierbei sind die Zielzellen Milzzellen einer syngenen Donormaus, die das relevante MHC-Allel exprimiert. Nachdem in den Versuchstieren eine Immunantwort induziert wurde, wurde der *in vivo* Zytotoxizitäts-Assay in der Regel an Tag 7 durchgeführt. Die Faustregel für die Anzahl an Donormäusen, die man für die Aufreinigung von Zielzellen benötigt, besagt, dass man pro Versuchstier ca. 1/2 Milz einer syngenen Donormaus für die Zielzellen benötigt. Die Donormilzen wurden entnommen, vereint und durch Drücken durch Metallsiebe zu Einzelzellsuspensionen verarbeitet. Nach der Erythrozytenlyse wurde der Ansatz filtriert (40-µm-Zellsiebe) und in zwei gleich große Fraktionen à ca.  $2 \times 10^7$  Milzzellen pro ml in DPBS aufgeteilt (entspricht 5 ml pro Milz). Zu einer dieser beiden Fraktionen wurde nun 1 µM antigenes Peptid hinzugegeben, während die andere Fraktion kein Peptid bekam. Beide Fraktionen wurden 15 min bei 37 °C inkubiert. Nun wurde die eine Population mit antigenem Peptid mit 1,5 µM CFSE, die andere mit 0,15 µM CFSE markiert und 15 min bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Dabei wurden die mit Peptid markierten Zielzellen als CFSE<sup>hi</sup> und die unspezifischen Zielzellen (ohne Peptid) als CFSE<sup>lo</sup> benannt. Auf diese Art und Weise hat man zwei über die CFSE-Intensität im FACS unterscheidbare Zielpopulationen generiert. Nach der Inkubation wurden beide Zielpopulationen einmal mit RMPI/10%FCS und zweimal mit DPBS gewaschen, filtriert und gezählt. Eine möglichst exakte 1:1 Mischung der Zellen wurde hergestellt. Von dieser

Mischung wurden den Versuchsmäusen ca.  $2 \times 10^7$  Zellen, d.h.  $1 \times 10^7$  jeder CFSE-Intensität, intravenös in die Schwanzvene injiziert. Nach 4 h wurden die Tiere mit CO<sub>2</sub> getötet. Die drainierende Lymphknoten (axilläre und lateral axilläre) und die Milzen wurden entnommen und, wie oben beschrieben, eine Zellsuspension für die FACS-Analyse hergestellt. Ohne weitere Färbung (außer der Zugabe von 1 µg/ml PI) wurden die Zellsuspensionen dann im FACScan bzw. FACS-Calibur analysiert. Durch die unterschiedliche CFSE-Markierung sind die beiden Populationen gut getrennt über ihre CFSE-Fluoreszenz zu analysieren. Als Negativ-Kontrolle dienten hierbei naive, d.h. nicht immunisierte Mäuse. Diese sollten keine aktivierten, peptid-spezifischen T-Zellen in relevanter Menge aufweisen. In diesen Mäusen liegen die Zielzellen in ihrem Verhältnis 1:1 unverändert vor, bzw. in dem Verhältnis, das der Experimentator durch Auszählen und Mischen zuvor injiziert hat. In allen anderen Versuchsmäusen wird sich das Verhältnis von Peptid-beladenen „CFSE<sup>hi</sup>“ zu Kontroll-„CFSE<sup>lo</sup>“ Zielzellen entsprechend der vorhandenen Immunantwort gegen das untersuchte Peptid verändert haben. Es wurde eine konstante Anzahl von „CFSE<sup>lo</sup>“ Zellen (unspezifischen Zielzellen) gemessen und anhand der im selben Zeitraum gemessenen „CFSE<sup>hi</sup>“ Zellen (Peptid-beladene Zielzellen) der Grad der spezifischen zytotoxischen Aktivität bestimmt. Die exakte Berechnung der Prozent zytotoxischen Aktivität erfolgte dabei in drei Schritten: Zuerst wurden für alle Mäuse der CFSE-Quotient berechnet: **Zellzahl CFSE<sup>hi</sup> / Zellzahl CFSE<sup>lo</sup>**.

Dann wurde für die naiven Mäuse der Mittelwert des CFSE-Quotienten ( $\emptyset$  CFSE-Quotienten naiv) berechnet. Die zytotoxische Aktivität wurde schlussendlich in Prozent nach der Formel berechnet: **100 – (100 x (CFSE-Quotient)) / ( $\emptyset$  CFSE-Quotienten naiv)**  
Die Berechnung der spezifischen zytotoxischen Aktivität erfolgte getrennt für drainierende Lymphknoten und Milz.

### 3.5.6. Injektion von Tumorzellen und Überwachung des Tumorwachstums

Die Applikation von Tumorzellen erfolgte subkutan mit  $5 \times 10^5$  Zellen in 100 µl DPBS an der rechten Flanke. Das Tumorwachstum wurde 3-mal wöchentlich kontrolliert und die Tumorgröße mittels einer Schieblehre gemessen. Die Berechnung des Tumolvolumens V erfolgte nach der Formel:  $V = 0,5 \times \text{Länge} \times \text{Breite}^2$

## 4. Ergebnisse

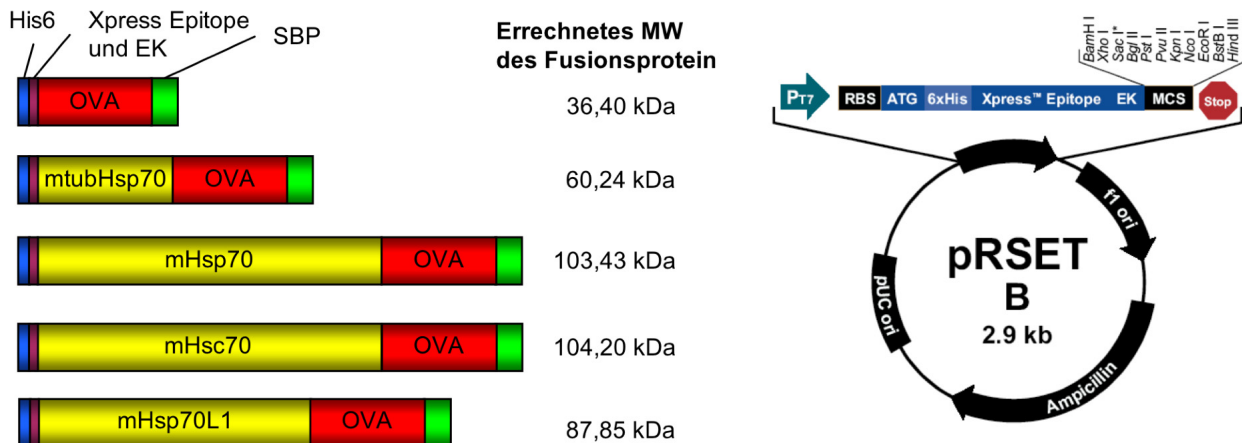
### 4.1. Generierung und Expression der Hsp70-Antigen-Fusionsproteine

#### 4.1.1. Herstellung von N-terminalen His6-tag Hsp70-Antigen-Fusionsproteinen

Das erste Ziel der vorliegenden Arbeit war die Generierung und Aufreinigung der Hsp70-Antigen-Fusionsproteine. Für die Klonierung wurden mittels PCR neue Restriktions-Schnittstellen in die cDNA der Hsp70-Gene eingefügt. Durch diese Schnittstellen konnten die Hsp70-cDNA dann schrittweise mit der cDNA des Antigen Ovalbumin (OVA) und der cDNA des Streptavidin-Binding Peptids (SBP) in pRSET B zusammengefügt werden. Für die Fusionsproteine wurde ein Fragment des Ovalbumin verwendet (AS 146-359), welches das H-2K<sup>b</sup> Epitope SIINFEKL (Ovalbumin AS 257-264) und das I-A<sup>b</sup> Epitope ISQAVHAAHAEINEAGR (Ovalbumin AS 323-339) enthält. Die Fusionskonstrukte wiesen alle die im pRSET B-Vektor schon enthaltenen N-terminalen Sequenzen mit Hexa-Histidin-tag (His6), gefolgt vom Xpress Epitop und der Enterokinase-Schnittstelle (EK) auf (Abbildung 4-1). Die Proteinsequenzen sind im Anhang abgebildet.

Die Expression erfolgte in dem *E.coli* Expressionsstamm BL21. Zuerst wurde überprüft, ob die überexprimierten Fusionsproteine Einschlusskörperchen bilden, oder löslich in den Bakterien vorkommen. Dabei wurde die Expression mit IPTG induziert und kurz vor der Induktion sowie stündlich danach wurden Proben der Kultur entnommen. Diese wurden abzentrifugiert und der Überstand und das lysierte Sediment im Western Blot nach einer denaturierenden Gelelektrophorese analysiert. Die Färbung mit Streptavidin-Peroxidase ergab jeweils eine spezifische Bande für das jeweilige Fusionsprotein, welche fast ausschließlich im Sediment vorkam (Abbildung 4-2). Eine Ausnahme bilden hier rOVA und mtubHsp70-OVA, bei denen das Fusionsprotein auch im Überstand nachgewiesen werden konnte. Das Vorkommen der Fusionsproteine im Sediment ist ein Hinweis auf Bildung von Einschlusskörperchen.

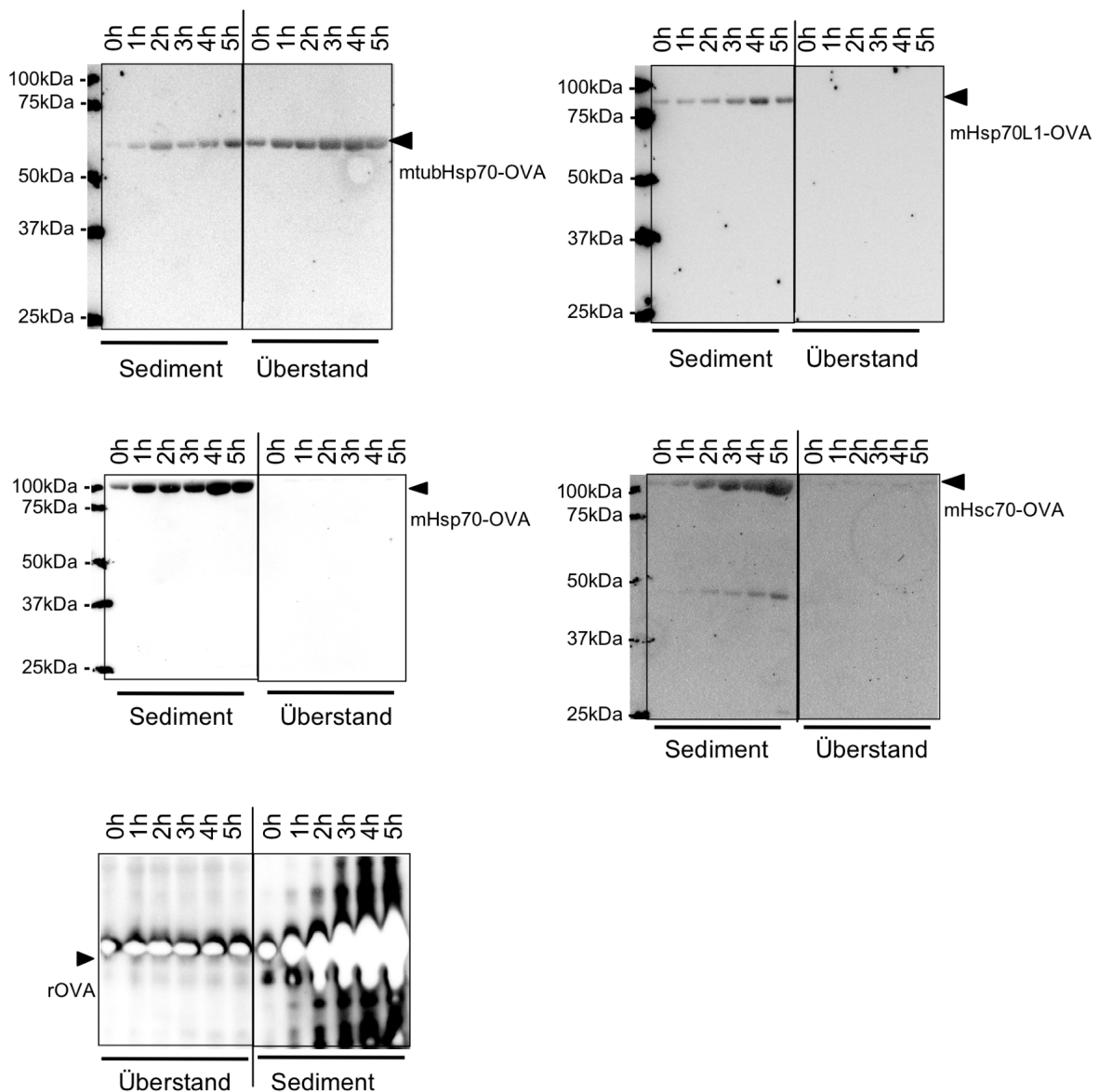




**Abbildung 4-1: Generierung von N-terminalen His6-tag Hsp70-OVA Fusionskonstrukten**

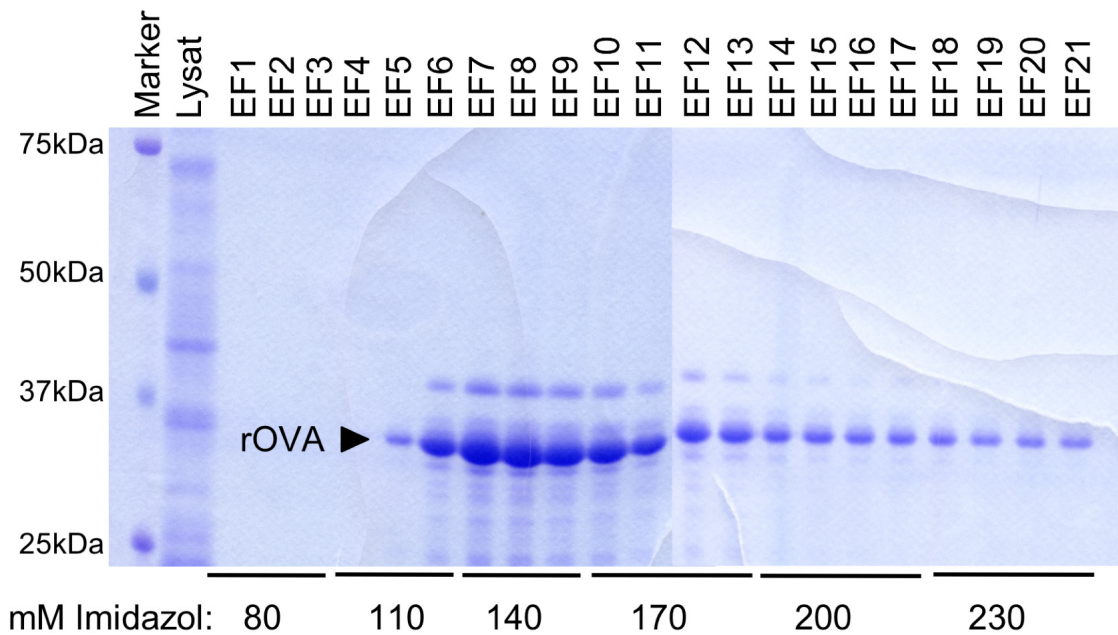
Die Hsp70-OVA Fusionskonstrukte sind von einem N-terminalen Hexa-Histidin-tag (His6) flankiert, gefolgt von einem Xpress Epitop und einer Enterokinase-Schnittstelle (EK), sowie C-terminal von einem Streptavidin-Binding-Peptid (SBP). Die N-terminalen Sequenzen für His6, Xpress Epitop und EK waren schon in dem für die Überexpression gewählten Vektor pRSET B enthalten.

Die zeitliche Analyse der Expression wies bei allen Fusionsproteinen auf eine Plateaubildung der Expressionsmenge nach 4 h hin. Diese Expressionsdauer wurde daher für die Herstellung aller Fusionsproteine gewählt. Für die Aufreinigung mittels Ni-NTA Affinitätschromatographie wurden wegen der Einschlusskörperchen denaturierende Bedingungen bei 8 M Harnstoff gewählt. Die Kultur wurde 4 h nach Induktion mit IPTG geerntet und unter denaturierenden Bedingungen lysiert. Nach Auftrag des Lysats auf die Ni-NTA Säule wurde mit einem dem Lysat entsprechenden Waschbuffer (Waschpuffer A), sowie einem Puffer (Waschpuffer B) mit geringer Imidazol-Konzentration und saurem pH gewaschen. Zur Renaturierung der Fusionsproteine wurde ein schneller Wachschriff mit 1x PBS durchgeführt. Diese schnelle Renaturierung für rekombinante Hsp70-Antigen-Fusionsproteine wurde in der Literatur als sehr effizient beschrieben und erzielte bei einem Vergleich der Renaturierungsmethoden die höchste biologische Aktivität (ATPase) der HSP (Udono et al., 2004). Als nächster Schritt wurden die Elutionsbedingungen evaluiert. Hierzu wurde sequentiell die Imidazol-Konzentration im Elutionspuffer erhöht und dann nach Gelelektrophorese der Elutionsfraktionen die Menge an eluierten Protein analysiert (rekombinantes OVA-Fragment (rOVA) als Beispiel; Abbildung 4-3). Die Analyse der Elutionsbedingungen zeigt, dass rOVA bei Imidazol-Konzentrationen zwischen 110 und 230 mM eluiert werden kann. Daher wurde für die Elutionsbedingungen eine Imidazol-Konzentration von 200 mM gewählt.



**Abbildung 4-2: Expressionsanalyse der N-terminalen His6-Fusionsproteine**

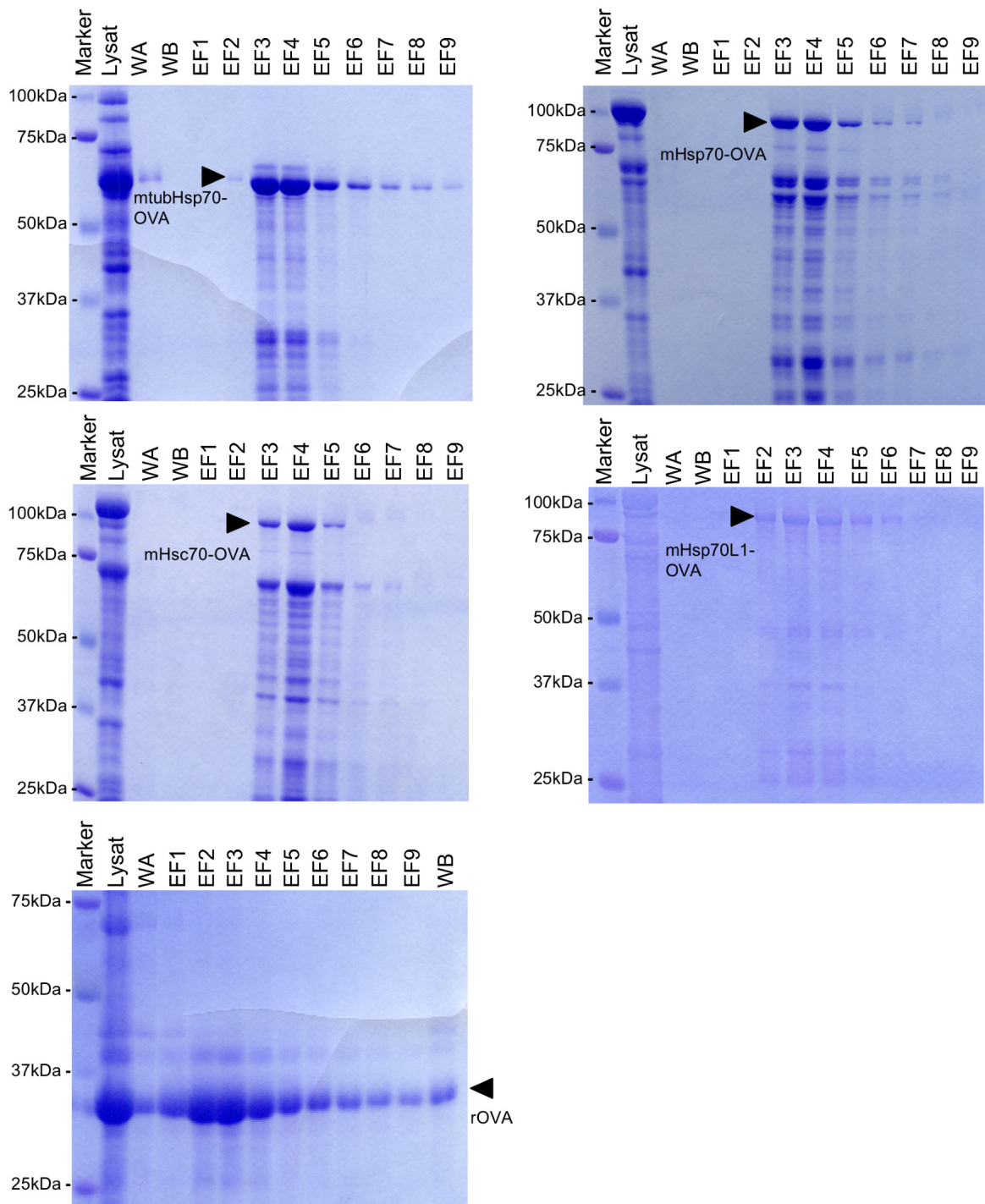
Die Induktion der Fusionsproteine wurde im Western Blot durch die Färbung mit Streptavidin-Peroxidase überprüft. Der Nachweis im Sediment weist auf die Bildung von Einschlusskörperchen hin, die die Fusionsproteine enthalten.



**Abbildung 4-3: Analyse der Elutionsbedingungen für die Aufreinigung mittels Ni-NTA**

rOVA wurde bei sequentiell erhöhten Imidazol-Konzentrationen eluiert und dann nach Gelelektrophorese durch Coomassie-Färbung analysiert. Die Elution erfolgte zwischen 110-230 mM Imidazol.

Abbildung 4-4 zeigt die Coomassie-Färbung der Aufreinigung für das jeweilige Fusionsprotein. Während sich bei mtubHsp70-OVA und rOVA noch eine geringe Anzahl von Banden anderer Molekulargrößen zeigten, zeigten sich bei den drei anderen Fusionsproteinen (mHsp70-OVA, mHsc70-OVA, mHsp70L1-OVA) eine Vielzahl von diesen zusätzlichen Banden. Auffallend ist, dass diese zusätzlichen Banden alle ein kleineres Molekulargewicht als die erwartete Bande des Fusionsproteins aufweisen. Diese möglichen Abbauprodukte führten zu einer Verunreinigung der Fusionsproteinpräparate. Densitometrische Analysen der Proteinbanden zeigten, dass die spezifischen Banden der Fusionsproteine nur etwa 20% des Gesamteluats ausmachten (Daten nicht gezeigt).



**Abbildung 4-4: Analyse der Aufreinigung der Fusionsproteine**

Nach der Elution wurden die einzelnen Elutionsfraktionen (EF), sowie das Lysat und der Durchlauf der Waschpuffer A und B (WA und WB) nach der Gelelektrophorese per Coomassie-Färbung auf Proteingehalt und Reinheit der Fusionsproteine überprüft. Hierbei zeigten sich bei den einzelnen Fusionsproteinen einige unspezifische Banden mit kleinerem Molekulargewicht als das erwartete Fusionsprotein.

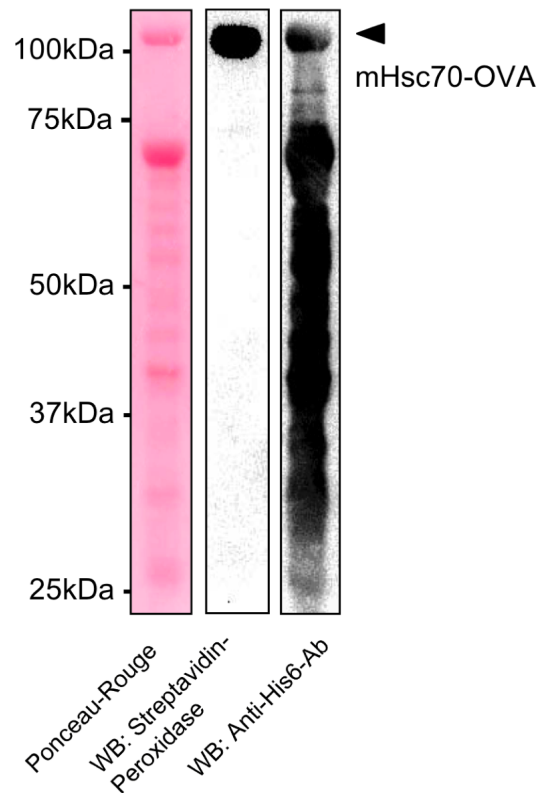
Tabelle 4-1: Maßnahmen zur Erhöhung der Reinheit der aufgereinigten Fusionsproteine

Maßnahme	Erhoffte Wirkung
Zugabe von Protease-Inhibitoren während der Lyse	Inhibition der Degradation der Fusionsproteine
Anderer <i>E.coli</i> Stamm: BL21Star(DE3)pLysS	Erhöhte mRNA Stabilität durch Mutation des <i>rne</i> Gens → höheres Expressionsniveau und daher erhöhter Anteil des erwünschten Fusionsproteins im Eluat
Verschiedene IPTG Konzentrationen bei der Induktion 0,01-0,1-0,5-1 mM IPTG	Niedrigere IPTG-Konzentrationen sollten zu weniger hohen Expressionsniveaus führen → Bessere Qualität der exprimierten Proteine. Höhere IPTG-Konzentrationen sollten zu höheren Expressionsniveaus führen
Verschiedene Induktionstemperaturen: 25-30-37 °C	Eine andere metabolische Aktivität könnte zur Verbesserung der Qualität der exprimierten Proteine führen
Induktion der Kultur bei verschiedenen OD <sub>600</sub> -Werten 0,3-0,6-1,0	Wachstum der Bakterien (metabolische Aktivität) hat einen Einfluß auf die freien Ressourcen der Bakterien für die Expression der Fusionsproteine → Die Induktion mit IPTG wurde am Anfang bzw. während des exponentiellen Wachstums (OD <sub>600</sub> =0,3 bzw. 0,6), oder in der stationären Phase (OD <sub>600</sub> =1,0) durchgeführt
Erhöhte Imidazol-Konzentrationen in den Waschpuffern während der Aufreinigung	Unspezifisch gebundene Proteine an der Ni-NTA sollten während des Waschschrittes eluiert werden
Zugabe von Detergenzien und NaCl in den Waschpuffern während der Aufreinigung	Detergenzien verhindern das Binden von unspezifischen Proteinen und Nukleinsäuren an die Ni-NTA. NaCl verhindert die ionischen Interaktionen der Proteine → erhöhte Reinheit

Um die Reinheit der Fusionsproteine zu erhöhen, wurden die Bedingungen während der Produktion und während der Aufreinigung verändert, um die Menge der unspezifischen Banden zu vermindern. Die einzelnen Maßnahmen sind in Tabelle 4-1 wiedergegeben. Keine der Maßnahmen änderte aber signifikant die Reinheit der Fusionsproteine nach der Aufreinigung (Daten nicht gezeigt).

Da alle der oben beschriebenen Maßnahmen (Tabelle 4-1) zu keiner Erhöhung der Reinheit in den Eluaten führten, wurden die Eluate im Western Blot analysiert. Hierzu wurde mHsc70-OVA exemplarisch für alle Fusionsproteinen auf das C-terminale SBP und den N-terminal His6-tag überprüft. Dafür wurde der Western Blot nach einer Gelelektrophorese zuerst mit Streptavidin-Peroxidase gefärbt, welches spezifisch an den C-terminalen SBP-tag bindet. Die Analyse zeigte eindeutig nur eine Bande, die zudem das erwartete Molekulargewicht des mHsc70-OVA-Fusionsprotein (104,20 kDa) hatte. Nach dem "Strippen" der Membran wurde der His6-tag im Western Blot analysiert. Dieser tauchte bei allen Banden auf, die auch in der Ponceau-Rouge-Färbung zu sehen waren (Abbildung 4-5). Dies ist ein Indiz dafür, dass alle Proteine, die an die Ni-NTA-Agarose

banden, einen His6-tag enthielten, und keine unspezifische Bindung stattfand. Da nur eine einzige Bande den SBP-tag vorwies, die zudem die Bande mit dem höchsten Molekulargewicht war, handelt es sich bei den kürzeren Proteinen höchstwahrscheinlich um Translationsabbruchprodukte.



**Abbildung 4-5: Analyse des Eluats im Western Blot**

Das Eluat von mHsc70-OVA wurde exemplarisch für alle Fusionsproteine auf die C-terminalen (SBP) und N-terminalen (His6) tags analysiert. Nur die Bande mit dem erwarteten Molekulargewicht von mHsc70-OVA (104,20 kDa) enthielt den SBP-tag, während zahlreiche Proteine im Eluat den His6-tag enthielten.

Das Auftreten der Translationsabbruchprodukte könnte im Zusammenhang mit "seltenen Codons" in *E.coli* erklärt werden. *E.coli* besitzt einen Vorrat an tRNAs mit unterschiedlichen Anticodons für die gleichen Aminosäuren. Die Konzentration dieser verschiedenen tRNAs variiert jedoch stark, und das Ergebnis sind sogenannte "seltene Codons" auf Ebene der mRNA, welche im allgemeinen die Proteinausbeuten verringern. Das Stoppen der Ribosomen an "seltenen Codons" kann entweder den tRNA-vermittelten proteolytischen Abbau des synthetisierten Proteins (Roche und Sauer, 1999) oder die vorzeitige Termination der Translation mit sich bringen (Komar et al., 1999). Zu diesen seltenen tRNAs gehören auch die Codons AGA, AGG, CGG (Arginin), AUA (Isoleucin), CUA

(Leucin), GGA (Glycin) und CCC (Prolin). Diese Codons sind in eukaryontischer mRNA aber nicht selten. Deshalb kommt es bei der Überexpression von eukaryontischen Genen in *E.coli* immer wieder zu Problemen bei der Expression. Die Analyse der DNA-Sequenz von mHsc70-OVA zeigte, dass von 949 Aminosäuren in diesem Protein 60 Aminosäuren durch "seltenen Codons" codiert werden (Tabelle 4-2). Werden nun die betroffenen Proteinsequenzen vom N-Terminus bis hin zu den einzelnen seltenen Codons übersetzt, ergeben sich auch nun die ungefähren Molekulargewichte der anderen unerwünschten Banden.

**Tabelle 4-2: Auftreten seltener Codons in den N-terminalen His6-tag Fusionsproteinen**

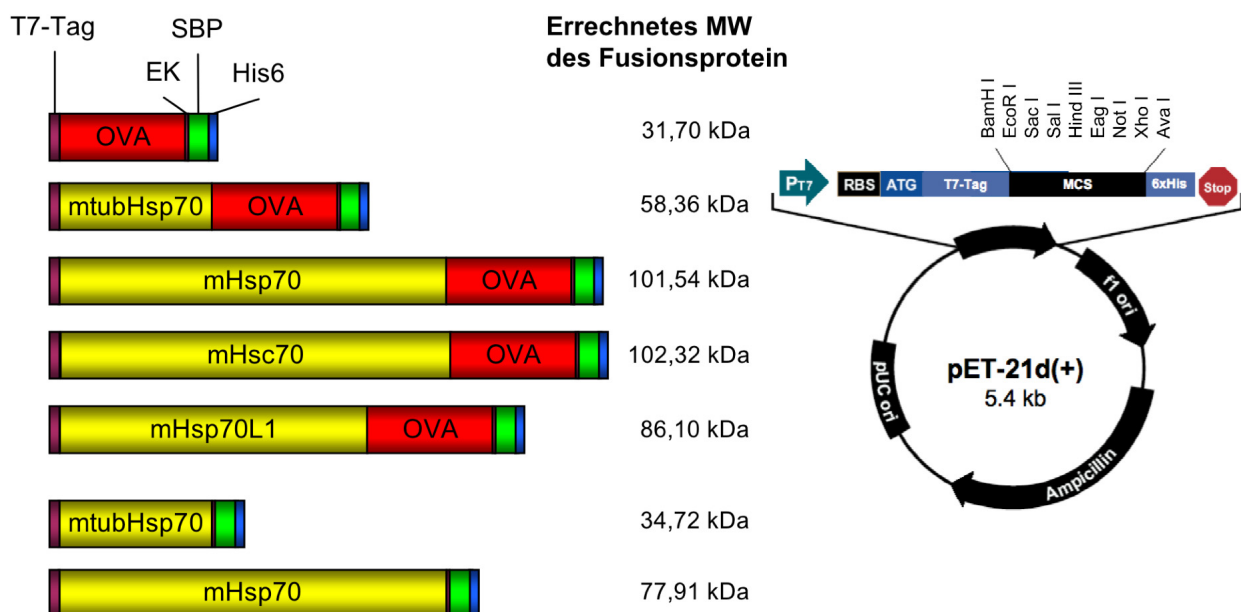
Fusionsprotein	AA / MW	Anzahl seltener Codons
rOVA	306 / 36,40 kDa	21
mtubHsp70-OVA	519 / 60,24 kDa	24
mHsp70-OVA	944 / 103,43 kDa	57
mHsc70-OVA	949 / 104,20 kDa	60
mHsp70L1-OVA	775 / 87,85 kDa	62

Der *E.coli* Stamm Rosetta2(DE3) besitzt ein Plasmid, welches die tRNA-Gene für die oben genannten seltenen Codons enthält. Die Verwendung dieses Expressionssystems veränderte jedoch nicht signifikant den Reinheitsgrad der Fusionsproteine in den Eluaten (Daten nicht gezeigt).

#### 4.1.2. Herstellung von C-terminalen His6-tag Hsp70-Antigen-Fusionsproteinen

Um das Problem der Translationsabbruchprodukte zu umgehen, wurde entschieden, Hsp70-Antigen-Fusionsproteine mit einem C-terminalen His6-tag zu generieren. Bei diesen Fusionsproteinen haben nur vollständig translatierte Proteine einen His6-tag, und nur solche können über die Ni-NTA-Matrix gebunden und aufgereinigt werden. Translationsabbruchprodukten fehlt der His6-tag und werden nicht an der Ni-NTA-Agarose gebunden.

Für die Generierung und Expression der C-terminalen His6-Fusionsproteine wurde der Vektor pET-21d(+) verwendet. Um den SBP-tag und die Enterokinase-Schnittstelle in den Vektor zu klonieren, mussten zuerst per PCR entsprechende Restriktionsschnittstellen und die Enterokinase-Schnittstelle eingefügt werden (Primer SBP-adap-fwd und -rev). Danach wurden sequentiell das Ovalbumin-Fragment (AS 146-359) und Hsp70-Sequenzen, bzw. Hsp70-Sequenzen ohne Ovalbumin in den Vektor mit dem SBP-tag kloniert. Abbildung 4-6 zeigt den Aufbau der C-terminalen His6-Fusionsproteine, die von PD Dr. F. Momburg (DKFZ, Heidelberg) produziert und zur Verfügung gestellt wurden. Die Proteinsequenzen sind im Anhang abgebildet.

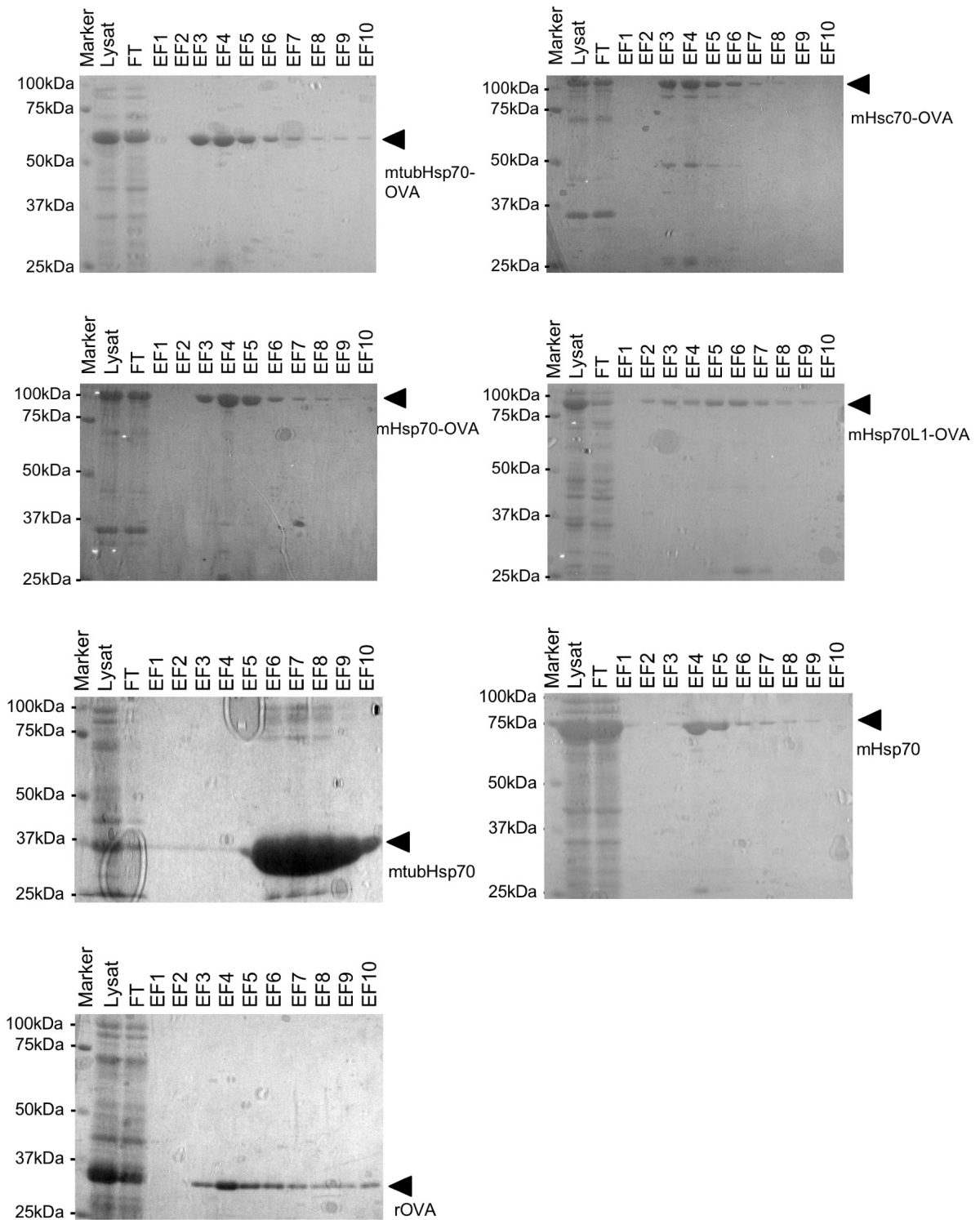


**Abbildung 4-6: Generierung von C-terminalen His6-tag Hsp70-OVA Fusionskonstrukten**

Die Hsp70-OVA Fusionskonstrukte sind von einem N-terminalen T7-tag, sowie C-terminal von SBP-tag und His6-tag umgeben. Die Enterokinase-Schnittstelle (EK) befindet sich N-terminal vor dem SBP-tag.

Für die Expression der C-terminalen His6-Fusionsproteine wurde der *E.coli* Stamm Rosetta2(DE3) verwendet. Die Aufreinigung dieser Fusionsproteine war erfolgreich und in der Coomassie-Analyse der Elutionsfraktionen war eine einzige starke Bande zu sehen (Abbildung 4-7). Ausnahmen hierbei waren mHsc70-OVA und mHsp70L1-OVA, bei denen die Elutionsfraktionen leichte Verunreinigungen aufwiesen. Aber dennoch lagen die Reinheiten dieser beiden Fusionsproteine zwischen 80% und 90%. Bei den anderen Fusionsproteinen lagen die Reinheiten bei über 90% (Daten nicht gezeigt).





**Abbildung 4-7: Analyse der Aufreinigung der C-terminalen His6-Fusionsproteine**

Nach der Elution wurden die einzelnen Elutionsfraktionen (EF), sowie das Lysat nach der Gelelektrophorese per Coomassie-Färbung auf Proteingehalt und Reinheit der Fusionsproteine überprüft. Hierbei wurden Reinheiten um die 90% erzielt.

Die relevanten Elutionsfraktionen der einzelnen Fusionsproteine wurden zusammengeführt und gegen PBS dialysiert. Abschließend wurde die Qualität der Aufreinigung und der Reinheit der C-terminalen His6-Fusionsproteine mit den N-terminalen His6-Fusionsproteinen verglichen. Die C-terminalen His6-Fusionsproteine wiesen alle eine höhere Reinheit im Vergleich zu den N-terminalen His6-Fusionsproteinen auf (Abbildung 4-8).

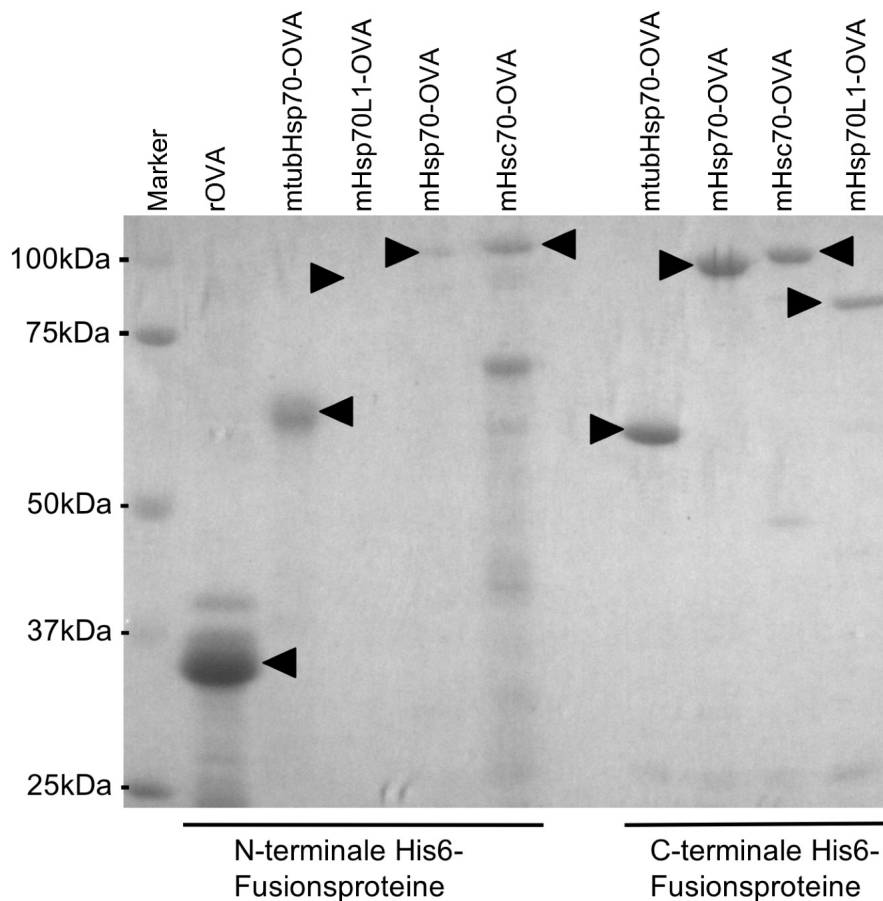


Abbildung 4-8: Vergleich von N-terminalen und C-terminalen His6-Fusionsproteinen

Es konnte hier gezeigt werden, dass die C-terminale Positionierung des His6-tag gegenüber der N-terminalen Positionierung bei Fusionsproteinen von Vorteil ist. Bei der Verwendung eines C-terminalen His6-tag werden entstehende Translationsabbruchprodukte durch die Ni-NTA-Affinitätschromatographie nicht mit aufgereinigt. Es konnte hier zudem die erfolgreiche Aufreinigung von Hsp70-OVA Fusionsproteinen mit einem C-terminalen His6-tag demonstriert werden. Densitometrische Analysen der aufgereinigten Fusionsproteine ergaben Reinheiten der Proteinpräparate zwischen 80% und 90%.

## **4.2. Induktion von spezifischer Immunität durch Hsp70-OVA-Fusionsproteine**

### 4.2.1. Aktivierung von Ovalbumin-spezifischen TCR-transgenen T-Zellen

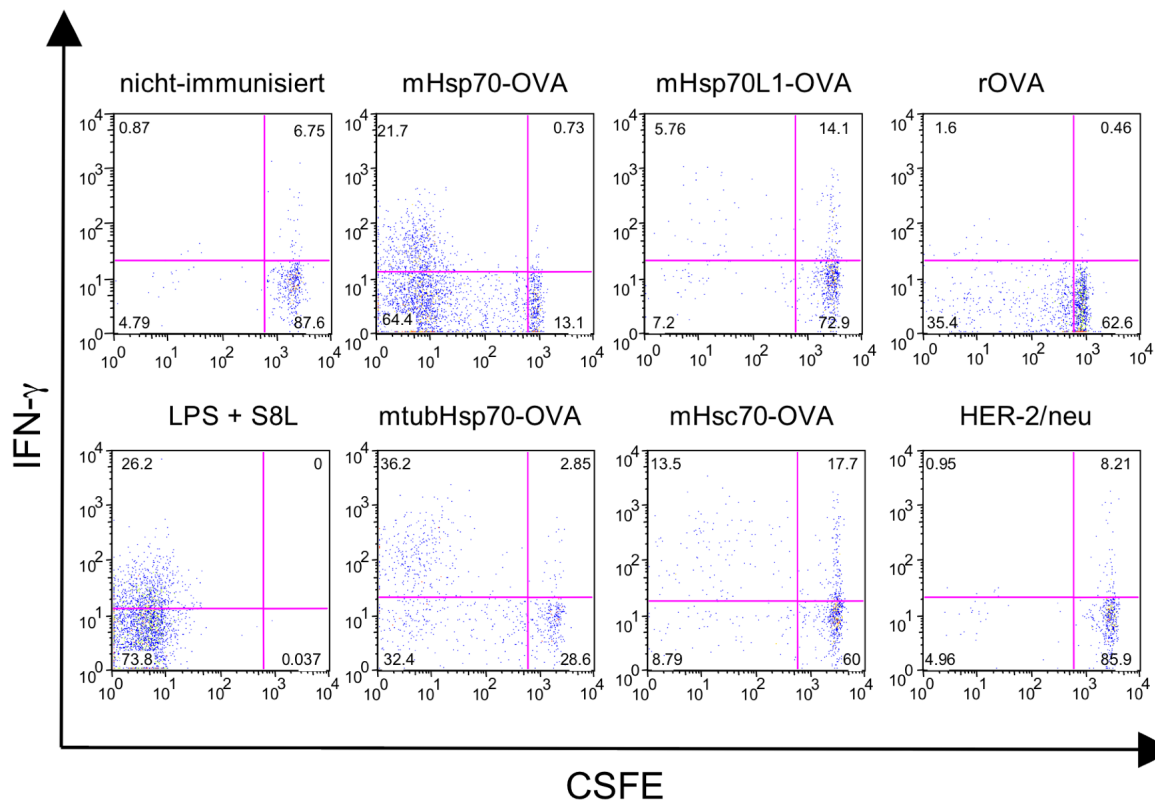
Nach der erfolgreichen Aufreinigung sollten die C-terminalen His6-Fusionsproteine auf Ihre Fähigkeit überprüft werden, Ovalbumin-spezifische T-Zellen zu aktivieren. Hierzu dienten zwei TCR-transgene T-Zelllinien, die CD8<sup>+</sup> zytotoxischen T-Zellen OT-I und die CD4<sup>+</sup> T-Helferzellen OT-II.

#### **4.2.1.1. Aktivierung von Ovalbumin-spezifischen OT-I CD8<sup>+</sup> T-Zellen**

Das Ziel des Versuches war erstens die Überprüfung der immunstimulatorischen Fähigkeiten der aufgereinigten Fusionsproteine, und zweitens ein direkter Vergleich der verschiedenen hier verwendeten Hsp70-Fusionsproteine.

3x10<sup>6</sup> MACS-aufgereinigte und CFSE-gefärbte OT-I T-Zellen wurden in unbestrahlte B6 Empfängermäuse adoptiv transferiert. Diese Empfängermäuse wurden nun am nächsten Tag intravenös mit den einzelnen Fusionsproteinen immunisiert. Sieben Tage nach der Immunisierung wurden die Milzzellen der Empfängermäuse mit dem spezifischen Ovalbumin-Peptid SIINFEKL (S8L) restimuliert und die transferierten OT-I Zellen auf ihre Proliferation (CFSE-Verdünnung) und IFN- $\gamma$ -Produktion untersucht. Aktivierte OT-I Zellen wurden als proliferierende und IFN- $\gamma$ -produzierende Zellen identifiziert.

Abbildung 4-9 gibt die FACS-Auswertungen dieser Analyse wieder. Im Falle der nicht immunisierten Empfängertiere konnte, wie erwartet, keine Proliferation (CFSE-Verdünnung) und nur eine schwache IFN- $\gamma$ -Produktion beobachtet werden. Dies bedeutet, dass die OT-I T-Zellen nicht aktiviert wurden, aber IFN- $\gamma$  bei S8L-Restimulation produzieren können. Die Positivkontrolle (Immunisierung mit 50  $\mu$ g Lipopolysaccharid (LPS) und 250  $\mu$ g S8L) zeigte eine starke Proliferation von allen OT-I T-Zellen sowie eine starke IFN- $\gamma$ -Produktion (28% aller OT-I).

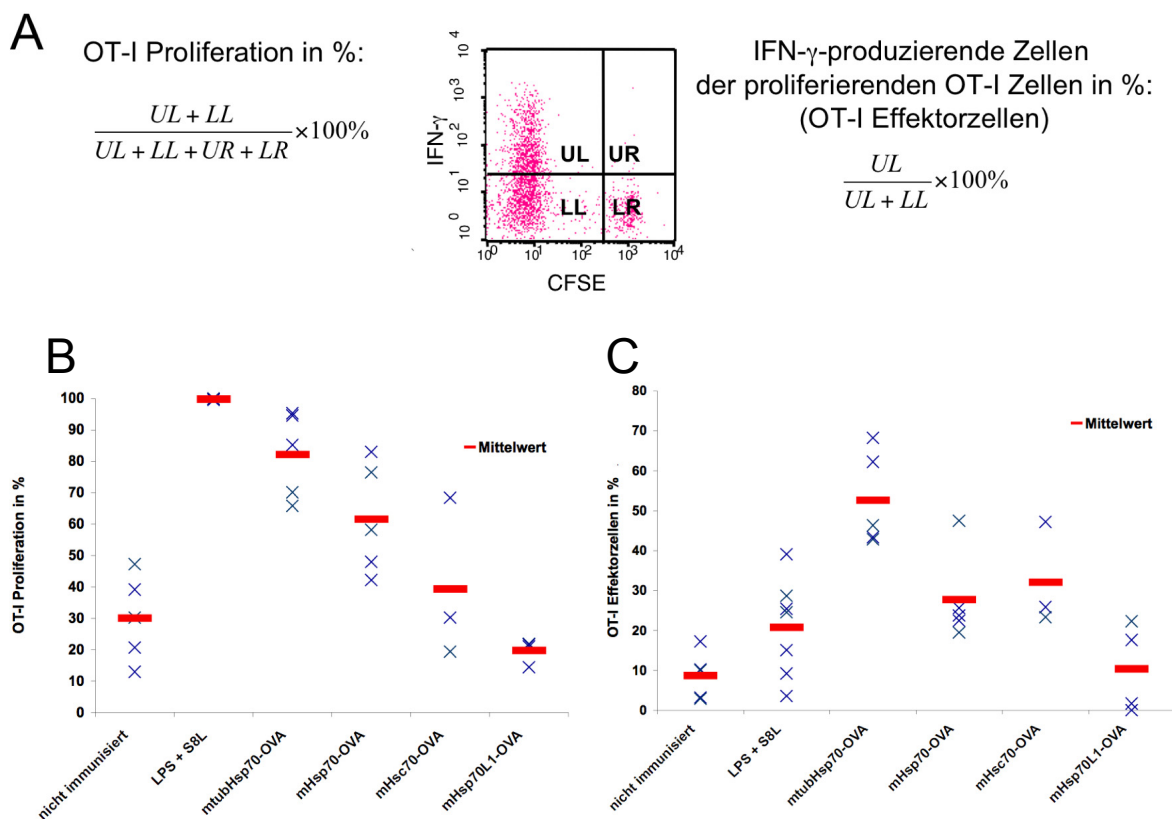


**Abbildung 4-9: FACS-Diagramme der Aktivierung von OT-I CD8<sup>+</sup> T-Zellen durch Hsp70-Fusionsproteine und Kontrollen**

$3 \times 10^6$  MACS-aufgereinigte und CFSE-gefärbte OT-I wurden in Empfängermäuse adoptiv transferiert. Die Empfängermäuse wurden einen Tag später mit 100 pmol Fusionsprotein bzw. 50  $\mu$ g LPS und 250  $\mu$ g S8L immunisiert. An Tag 7 wurden die Milzzellen mit S8L-Peptid restimuliert und die Aktivierung der OT-I Zellen im FACS analysiert. OT-I Zellen wurden hierbei als CD8<sup>+</sup> Thy1.1<sup>+</sup> Zellen identifiziert. Die FACS-Diagramme stammen von einzelnen Milzen und repräsentativ für 3 unabhängige Experimente.

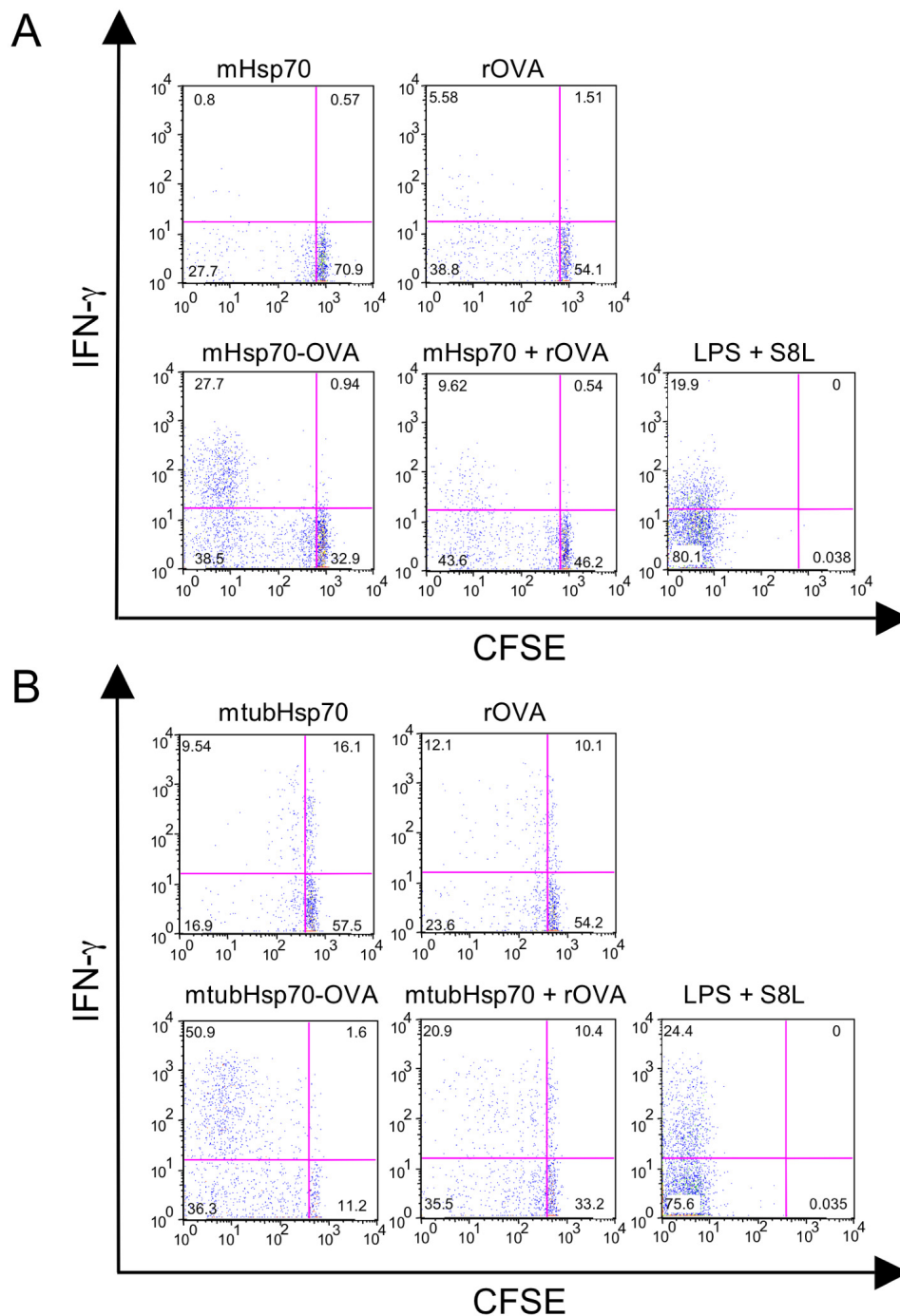
Für die Immunisierungen mit den Fusionsproteinen wurden äquimolare Mengen (100 pmol) an Fusionsproteinen verwendet. Alle Hsp70-OVA-Fusionsproteine konnten eine Proliferation und IFN- $\gamma$ -Produktion der OT-I T-Zellen induzieren. Die Proliferation betrifft aber nur einen Teil der transferierten OT-I T-Zellen im Vergleich zur Positivkontrolle. Dies kann aber durch die vergleichsweise hohe Menge an Peptidantigen erklärt werden. 250  $\mu$ g S8L (MW = 0,96 kDa) entsprechen 260,4 nmol, also 2600 mal mehr Antigenmenge als bei der Immunisierung mit den Fusionsproteinen. Rekombinantes OVA (rOVA) konnte bei äquimolarer Verabreichung nur eine schwache Aktivierung der OT-I T-Zellen induzieren. Diese Befunde belegten eindeutig eine spezifische Aktivierung der OT-I T-Zellen durch den HSP-Anteil der Fusionsproteine. Die Aktivierung durch unspezifisches Antigen (HER-2/neu) entsprach derjenigen der nicht immunisierten Gruppen und entspricht damit der Hintergrundaktivierung der OT-I Zellen. Das

unspezifische Antigen HER-2/neu wurde freundlicherweise von Marie Kühnle (DKFZ, Heidelberg) zur Verfügung gestellt und gleicht dem rOVA-Fusionsprotein in den N- und C-terminal flankierenden tags (T7-tag, SBP-tag und His6-tag). Im direkten Vergleich aller Hsp70-OVA-Fusionsproteine induzierten mHsp70-OVA und mtubHsp70-OVA am stärksten die OT-I Zellen, gefolgt von mHsc70-OVA und mHsp70L1-OVA. Einen besseren Vergleich der einzelnen Hsp70-OVA-Fusionsproteine ergibt die Analyse der induzierten Proliferation und der Effektor OT-I T-Zellen, die hier als proliferierende und IFN- $\gamma$ -produzierende Zellen definiert sind. Die Analyse (Abbildung 4-10) zeigte, dass mtubHsp70-OVA am potentesten in der Induktion von OT-I Proliferation und IFN- $\gamma$ -Produktion war, gefolgt von mHsp70-OVA, dann mHsc70-OVA und am schwächsten erscheint mHsp70-L1-OVA. Bemerkenswert ist, dass mtubHsp70-OVA, mHsp70-OVA und mHsc70-OVA stärker als die Positivkontrolle (LPS und S8L) in der Lage waren, die proliferierenden OT-I Zellen zur IFN- $\gamma$ -Produktion anzuregen.



**Abbildung 4-10: Analyse der Aktivierung der OT-I Zellen durch Hsp70-OVA-Fusionsproteine**

(A) Formeln zur Berechnung der OT-I Proliferation und dem Anteil der proliferierenden OT-I Zellen, die IFN- $\gamma$  produzieren (Effektor OT-I Zellen). Diese Formeln fanden Verwendung für die Berechnung der Werte in den Graphen B und C. (B) Analyse der induzierten OT-I Proliferation durch die Fusionsproteine. (C) Quantifizierung der Effektor OT-I Zellen. Für Auswertung der Graphen B und C wurden 3 unabhängige Experimente zusammengefasst. Einzelwerte sowie der Mittelwert sind gezeigt.

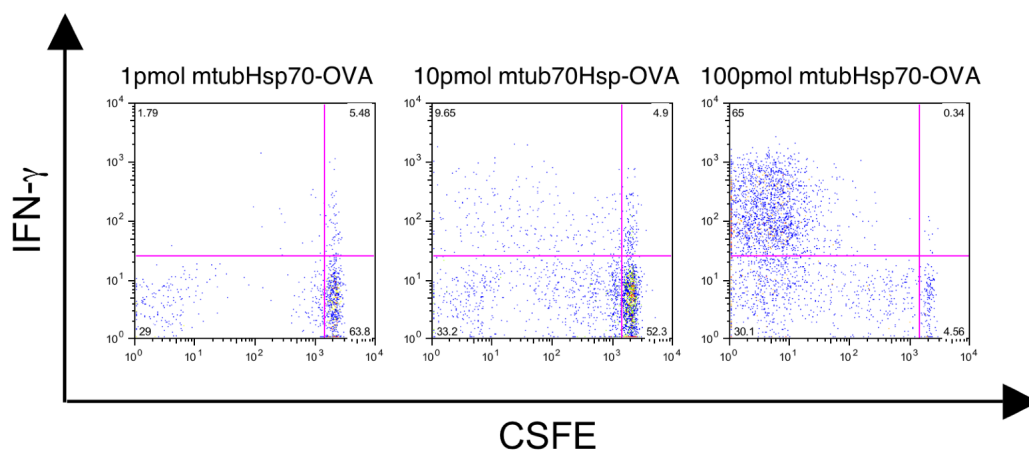


**Abbildung 4-11: Antigen-spezifische Aktivierung der OT-I T-Zellen durch Fusionsproteine**

$3 \times 10^6$  MACS-aufgereinigte und CFSE-gefärbte OT-I T-Zellen wurden in Empfängermause adoptiv transferiert. Einen Tag später wurden diese Mäuse mit 100 pmol Fusionsprotein bzw. 50  $\mu\text{g}$  LPS und 250  $\mu\text{g}$  S8L immunisiert. Sieben Tage später wurden die OT-I T-Zellen nach *in vitro* Restimulation mit S8L auf Proliferation und intrazelluläre IFN- $\gamma$ -Produktion im FACS analysiert. (A) gibt den Vergleich von mtubHsp70-OVA und mtubHsp70 wieder, während (B) den Vergleich von mHsp70-OVA und mHsp70 wiedergibt.

Ziel der nächsten Versuchsreihe war die Beantwortung der Frage, ob die Hsp70-OVA-Fusionsproteine spezifisch die Ovalbumin-spezifischen OT-I T-Zellen aktivieren oder ob dieses unspezifisch nur durch den Hsp70-Teil erfolgt. Hierzu wurde der Versuch wie oben beschrieben wiederholt. Es wurden exemplarisch mtubHsp70-OVA und mHsp70-OVA mit freien mtubHsp70 und mHsp70 Proteinen verglichen.

Abbildung 4-11 gibt die Ergebnisse dieses Versuches wieder. In beiden Fällen (mtubHsp70 und mHsp70) konnten die rekombinanten Hsp70-Proteine ohne Ovalbumin-Fragment nicht oder nur sehr schwach OT-I Zellen aktivieren. Nur in Kombination mit rOVA konnten sie die OT-I T-Zellen aktivieren. Jedoch war die Aktivierung durch die Kombination der beiden freien Hsp70-Anteile mit dem rekombinanten OVA-Fragment eindeutig schwächer als die der Hsp70-OVA-Fusionsproteine.



**Abbildung 4-12: Titration von mtubHsp70-OVA bei der Immunisierung**

$3 \times 10^6$  MACS-aufgecleanigte und CFSE-gefärbte OT-I T-Zellen wurden in Empfängermäuse adoptiv transferiert. Einen Tag später wurden diese Mäuse mit den angegebenen Mengen mtubHsp70-OVA immunisiert. Sieben Tage später wurden die OT-I T-Zellen nach *in vitro* Restimulation mit S8L auf Proliferation und intrazelluläre IFN- $\gamma$ -Produktion im FACS analysiert.

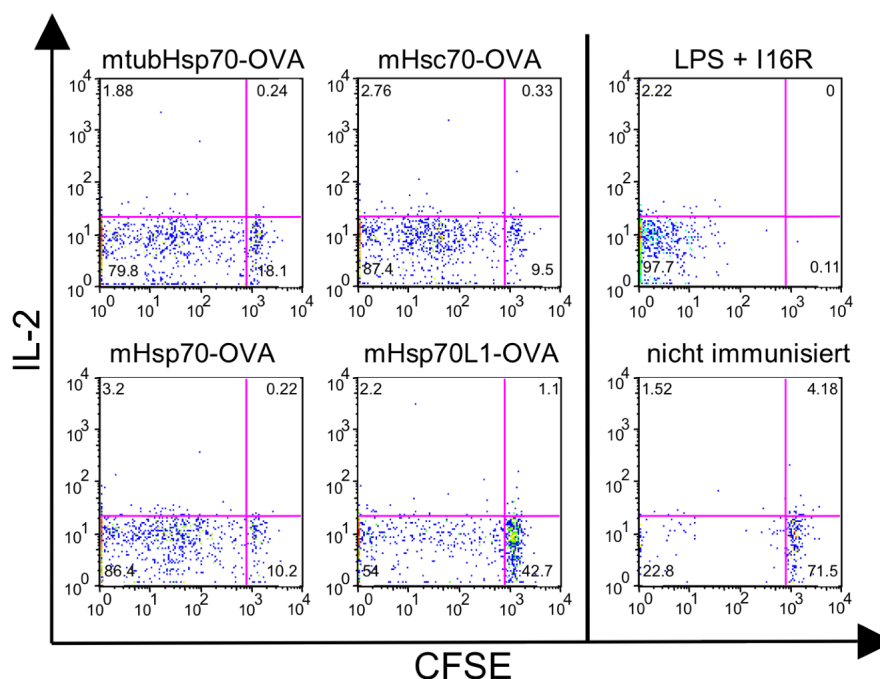
Des Weiteren wurde überprüft, welche Mengen an Hsp70-OVA-Fusionsprotein nötig sind, um die adoptiv transferierten OT-I Zellen zu aktivieren. Daher wurden verschiedene Mengen (1, 10 und 100 pmol) von mtubHsp70-OVA für die Immunisierung der Empfängermäuse verwendet. Es wurde mtubHsp70-OVA für diesen Versuch verwendet, da es im Vergleich aller Hsp70-OVA-Fusionsproteine die stärkste Aktivierung der OT-I T-Zellen induziert hatte. Die Analyse zeigt, dass 100 pmol mtubHsp70-OVA eine starke Aktivierung der OT-I T-Zellen induzierte, während 10 pmol nur eine schwache Antwort

induzierte. Im Fall der Immunisierung mit 1 pmol mtubHsp70-OVA konnte nur eine sehr schwache Aktivierung der OT-I T-Zellen beobachtet werden (Abbildung 4-12).

#### 4.2.1.2. Aktivierung von Ovalbumin-spezifischen OT-II CD4<sup>+</sup> T-Zellen

Die Hsp70-OVA-Fusionsproteine enthalten neben dem K<sup>b</sup>-restringierten Ovalbuminpeptid SIINFEKL (AS 257-264), auch das I-A<sup>b</sup>-restringierte T-Helfer Ovalbuminpeptid 323-339 ISQAVHAAHAEINEAGR (I16R). Daher wurde untersucht, ob die Fusionsproteine auch die Ovalbumin-spezifischen CD4<sup>+</sup> T-Helferzellen OT-II *in vivo* aktivieren können.

Ähnlich dem Versuchsaufbau für die Aktivierung der OT-I T-Zellen wurden MACS-aufgereinigte, CFSE-gefärbte OT-II Zellen adoptiv in Empfängermäuse transferiert. Die Empfängertiere wurden nun einen Tag später mit 100 pmol Fusionsprotein immunisiert (Positivkontrolle 50 µg LPS und 250 µg I16R-Peptid). Sieben Tage später wurden die Milzzellen der Empfängertiere mit dem I16R-Peptid *in vitro* restimuliert und dann die OT-II T-Zellen auf Proliferation und intrazelluläre IL-2-Produktion im FACS analysiert.

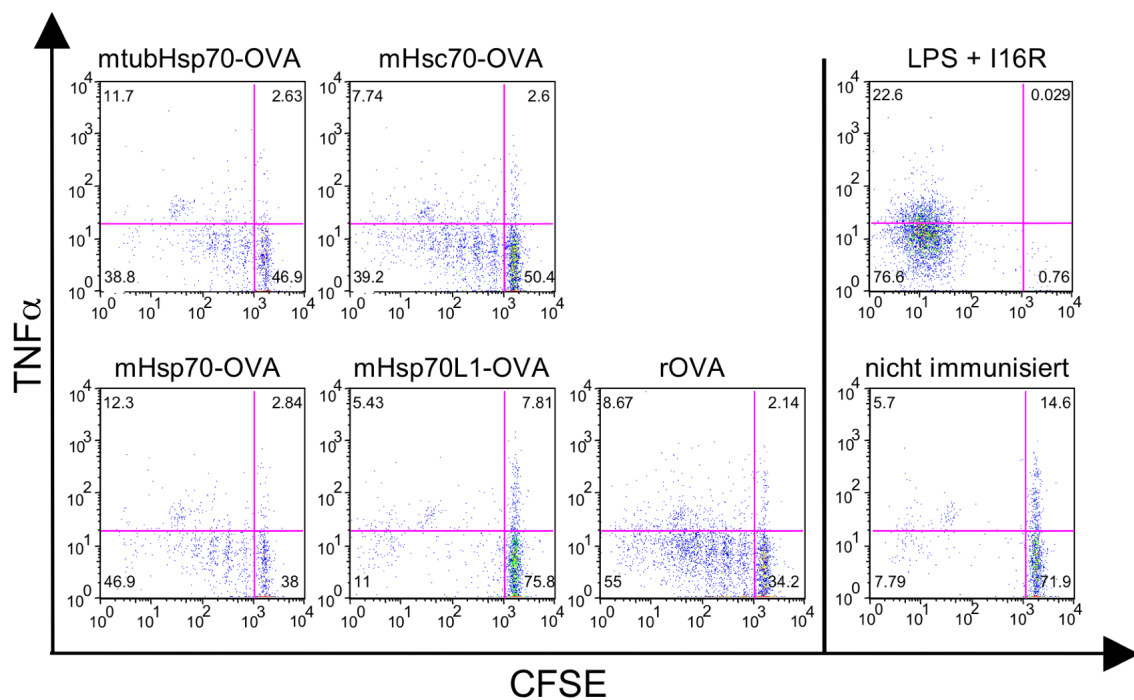


**Abbildung 4-13: Analyse der OT-II Proliferation und intrazellulären IL-2-Produktion**

$3 \times 10^6$  MACS-aufgereinigte und CFSE-gefärbte OT-II T-Zellen wurden in Empfängermäuse adoptiv transferiert. Einen Tag später wurden diese Mäuse mit 100 pmol Fusionsprotein bzw. 50 µg LPS und 250 µg I16R immunisiert. Sieben Tage später wurden die OT-II T-Zellen nach *in vitro* Restimulation mit I16R auf Proliferation und intrazelluläre IL-2-Produktion im FACS analysiert.



Es konnte keine IL-2-Produktion der OT-II T-Zellen beobachtet werden, da diese entweder nicht durch die Immunisierungen induziert worden war, oder der hier verwendete IL-2-Antikörper nicht für die FACS-Färbung ausgelegt war. Deshalb wurde die Aktivierung nur anhand der Proliferation bestimmt. Alle Hsp70-OVA-Fusionsproteine führten zu einer starken Proliferation der OT-II Zellen. Dies galt auch für die Positivkontrolle (LPS + I16R). In nicht immunisierten Empfängermäusen fand wie erwartet, keine Aktivierung der OT-II T-Zellen statt (Abbildung 4-13).



**Abbildung 4-14: Analyse der OT-II Proliferation und intrazellulären TNF $\alpha$ -Produktion**

$3 \times 10^6$  MACS-aufgereinigte und CFSE-gefärbte OT-II T-Zellen wurden in Empfängermäuse adoptiv transferiert. Einen Tag später wurden diese Mäuse mit 100 pmol Fusionsprotein bzw. 50  $\mu$ g LPS und 250  $\mu$ g I16R immunisiert. Sieben Tage später wurden die OT-II T-Zellen nach *in vitro* Restimulation mit I16R auf Proliferation und intrazelluläre TNF $\alpha$ -Produktion im FACS analysiert.

Dieser Versuch wurde wiederholt und diesmal die intrazelluläre TNF $\alpha$ -Produktion zur Analyse der Aktivierung verwendet (Abbildung 4-14). Alle Hsp70-OVA-Fusionsproteine und rOVA konnten auch hier wieder eine Proliferation der OT-II T-Zellen induzieren. Zudem konnte auch die Produktion von intrazellulären TNF $\alpha$  nachgewiesen werden. Es ergibt sich, wie bei der Aktivierung der OT-I T-Zellen, eine ähnliche Rangfolge in der Potenz der Hsp70-OVA-Fusionsproteine. Bemerkenswert ist, dass rOVA stärkere OT-II Antworten als OT-I Antworten induzieren konnte.

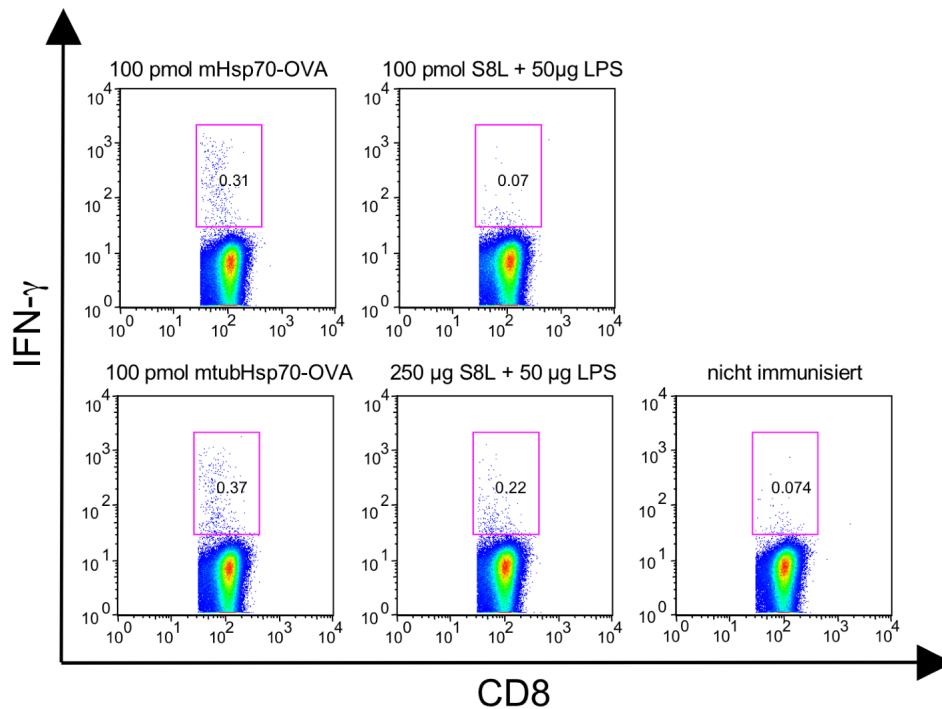
#### 4.2.2. Aktivierung von Ovalbumin-spezifischen zytotoxischen T-Zellen aus dem polyklonalen T-Zell-Gemisch durch Hsp70-OVA-Fusionsproteine

Nach der erfolgreichen Aktivierung von TCR transgenen CD8<sup>+</sup> T-Zellen wurde auch die Aktivierung von Ovalbumin-spezifischen T-Zellen aus dem polyklonalen T-Zell-Gemisch der Maus untersucht. Hierbei wurden zwei verschiedene Kriterien zur Analyse der Aktivierung herangezogen: IFN- $\gamma$ -Produktion und zytotoxische Aktivität der T-Zellen.

##### **4.2.2.1. IFN- $\gamma$ -Produktion von Ovalbumin-spezifischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen aus dem polyklonalen T-Zell-Gemisch**

Zur Untersuchung der Frage, ob Hsp70-OVA-Fusionsproteine auch CD8<sup>+</sup> T-Zellen aus dem polyklonalen T-Zell-Gemisch der Maus aktivieren können, wurden 3 mal im Abstand von einer Woche die beiden stärksten Hsp70-OVA Fusionsproteine (mtubHsp70-OVA und mHsp70-OVA) intravenös in naive Mäuse gespritzt. 7 Tage nach der letzten Immunisierung wurden die Milzzellen mit S8L *in vitro* restimuliert und im FACS die CD8<sup>+</sup> T-Zellen auf intrazelluläre IFN- $\gamma$ -Produktion analysiert. Das einmalige Immunisieren der Mäuse zeigte in einem Vorversuch keine messbare Aktivierung der CD8<sup>+</sup> T-Zellen (Daten nicht gezeigt).

Beide Fusionsproteine konnten eine große Population von IFN- $\gamma$ -produzierenden T-Zellen induzieren (> 0,3% aller CD8<sup>+</sup> T-Zellen). Diese Immunantwort war auch stärker als die durch die Positivkontrolle (50  $\mu$ g LPS + 250  $\mu$ g S8L) hervorgerufene (0,22% aller CD8<sup>+</sup> T-Zellen). Äquimolare Mengen an S8L (100 pmol) in Kombination mit dem starken Adjuvans LPS (50  $\mu$ g) konnten jedoch in diesen Experimenten keine vergleichbare Immunantwort hervorrufen. Diese war nicht stärker als diejenige der nicht immunisierten Mäuse und betrug 0,07% aller CD8<sup>+</sup> T-Zellen in beiden Fällen (Abbildung 4-15).



**Abbildung 4-15: Aktivierung von S8L-spezifischen polyklonalen T-Zellen**

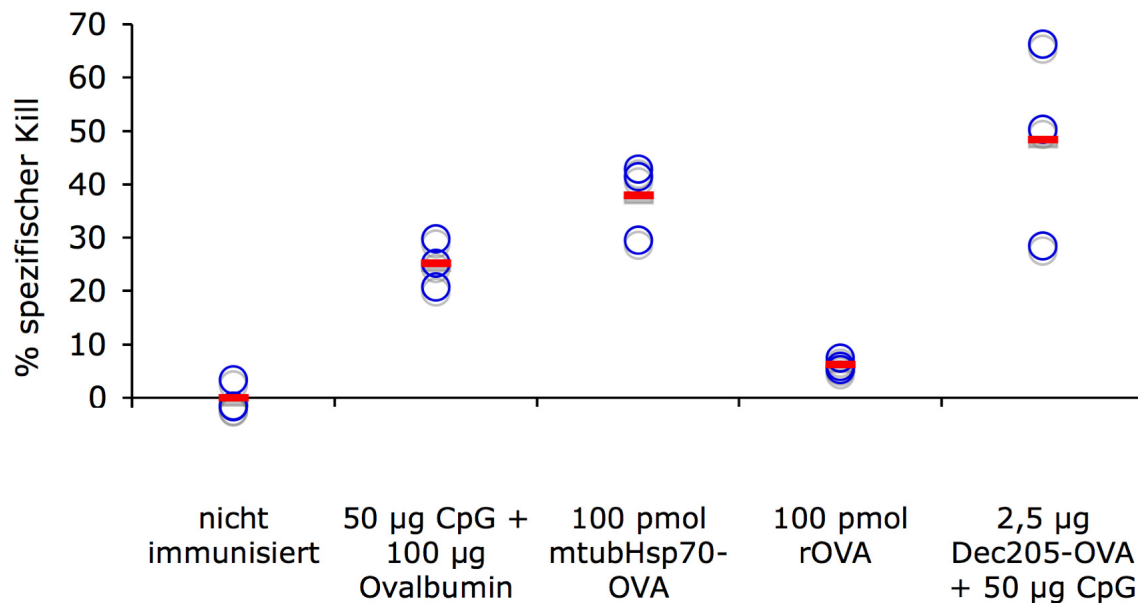
Naive Mäuse wurden im Abstand von einer Woche 3 mal immunisiert. Sieben Tage nach der letzten Immunisierung wurden die polyklonalen CD8<sup>+</sup> T-Zellen nach *in vitro* Restimulation mit S8L auf intrazelluläre IFN- $\gamma$ -Produktion im FACS analysiert.

#### 4.2.2.2. Aktivierung von Ovalbumin-spezifischen zytotoxischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen aus dem polyklonalen T-Zell-Gemisch

Noch wichtiger als die Anzahl IFN- $\gamma$ -produzierender T-Zellen nach einer Immunisierung ist die zytotoxische Aktivität dieser T-Zellen. Aus diesem Grund wurde ein *in vivo* Zytotoxizitäts-Assay etabliert. Naive Mäuse wurden 7 Tage vor dem Assay mit jeweils 100 pmol rekombinanten Protein subkutan in beide Armen immunisiert. Für den Assay selbst wurden S8L-beladene und nichtbeladene Zielzellen intravenös gespritzt. Nach 4 h wurde dann die spezifische Zellyse in den drainierenden Lymphknoten bestimmt.

Als Positivkontrolle wurde hierbei die Immunisierung mit 50  $\mu$ g CpG-ODN 1668 und 100  $\mu$ g Ovalbumin (kommerziell erhältliches Hühnereiweiß-Albumin) verwendet. Diese Kombination ist eine bewährte Positivkontrolle, da die resultierende zytotoxische Aktivität immer zwischen 20 und 30% liegen sollte. Zudem wurde auch mit dem Ovalbumin-konjugierten Antikörper DEC205 in Kombination mit CpG-ODN 1668 immunisiert. Diese Kombination wurde als Standard verwendet, da nach Erfahrungen aus dem Labor (Dr.

Natalio Garbi, DKFZ) kleine Mengen (2,5 µg) eine sehr starke zytotoxische Aktivität hervorrufen (ca. 50-60%).



**Abbildung 4-16: *In vivo* Zytotoxizität-Assay nach Immunisierung mit mtubHsp70-OVA**

Naive Mäuse wurden 7 Tage vor dem Assay mit jeweils 100 pmol rekombinanten Protein subkutan in beide Arme immunisiert. Für den Assay selbst wurden S8L-beladene und nichtbeladene Zielzellen mit unterschiedlichen Mengen an CFSE gefärbt und intravenös gespritzt. Nach 4h wurde dann der spezifische Kill in den drainierenden Lymphknoten bestimmt. Die Zielzellen konnten anhand ihrer unterschiedlichen CFSE-Färbung im FACS identifiziert werden und aus ihrem Verhältnis zueinander eine zytotoxische Aktivität errechnet werden (siehe Material und Methoden, Abschnitt 3.5.5.). mtubHsp70-OVA induzierte im Vergleich zu rOVA starke zytotoxische T-Zell-Antworten.

Abbildung 4-16 zeigt das Ergebnis dieses Versuches. Das Fusionsprotein mtubHsp70-OVA konnte starke, mit der Positivkontrolle vergleichbare, zytotoxische Immunantworten induzieren (ca. 30-40%). Die induzierte zytotoxische Aktivität durch DEC205-OVA plus CpG-ODN 1668 war etwas höher (50%) als die von mtubHsp70-OVA. Wie schon im TCR-transgenen System konnte mtubHsp70-OVA viel stärkere Immunantworten induzieren als rOVA.

**Zusammenfassend konnte hier die spezifische Aktivierung von TCR-transgenen Ovalbumin-spezifischen CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen (OT-I und OT-II) durch die HSP-OVA-Fusionsproteine gezeigt werden. Durch Immunisierung mit dem Fusionsprotein mtubHsp70-OVA konnten ferner auch Ovalbumin-spezifische CD8<sup>+</sup> T-Zellen aus dem polyklonalen T-Zell-Gemisch aktiviert werden, die zytotoxische Aktivität zeigten.**

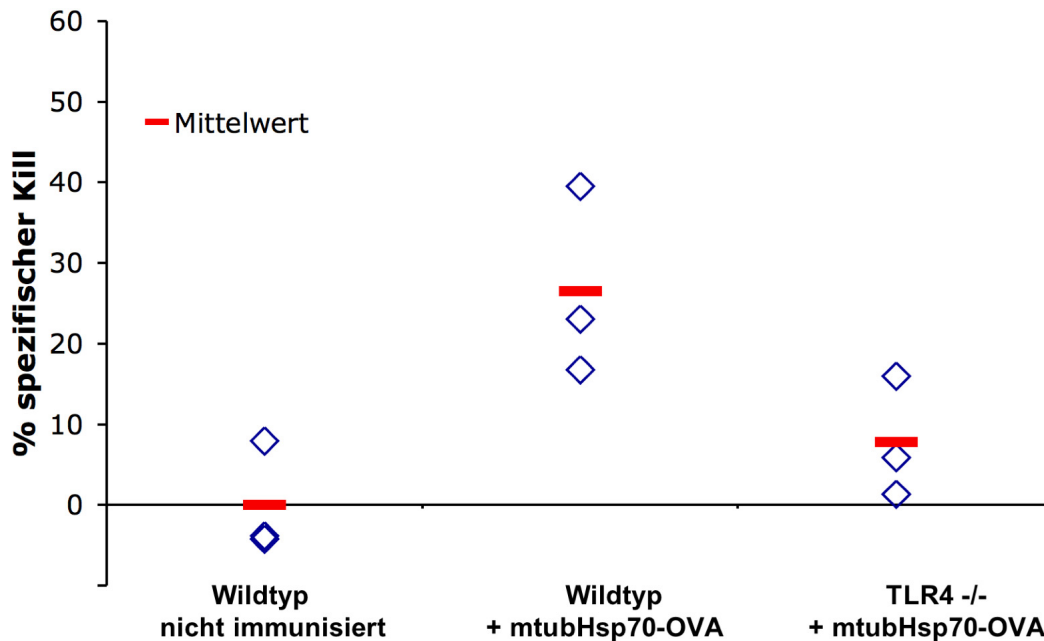
### **4.3. Auswirkungen der Endotoxin-Kontamination auf die immunstimulatorischen Fähigkeiten der Hsp70-OVA-Fusionsproteine**

In den letzten Jahren gab es in der Literatur einige Hinweise, dass Endotoxin-Kontaminationen (vor allem durch LPS) für die beobachteten immunstimulatorischen Fähigkeiten von rekombinant in *E.coli* hergestellten Proteinen verantwortlich sind (Dayan, 1995; Magalhaes et al., 2007). Da einige der potentiellen HSP-Rezeptoren wie CD14, TLR2 und TLR4 die gleichen sind wie die für Endotoxine (Tsan und Gao, 2004), stellt sich die Frage, ob Endotoxin-Kontamination auch für die immunstimulatorischen Wirkung von Hsp70 verantwortlich sind (Wallin et al., 2002; Warger et al., 2006).

#### 4.3.1. Analyse der immunstimulatorischen Wirkung der Hsp70-OVA-Fusionsproteine in TLR4-defizienten Mäusen

Um die Beteiligung von LPS an den beobachteten immunstimulatorischen Eigenschaften der Hsp70-OVA-Fusionsproteine zu bewerten, wurde der *in vivo* Zytotoxizität-Assay in TLR4-defizienten Mäusen wiederholt. In diesen Mäusen kann das Immunsystem nicht durch LPS oder andere TLR4-Liganden aktiviert werden. Der Versuch wurde analog wie oben beschrieben durchgeführt.

Abbildung 4-17 zeigt die Auswirkung der TLR4-Defizienz auf die Immunantwort. Es ist ein drastischer Abfall der spezifischen Zytotoxizität in den TLR4<sup>-/-</sup> Mäusen zu beobachten (von 25 auf 8%), der sich quasi im Bereich der Hintergrundzytotoxizität befindet. Eindeutig kann hierdurch eine Abhängigkeit der mtubHsp70-OVA induzierten Immunantwort von TLR4 abgelesen werden. Dass TLR4<sup>-/-</sup> Mäuse allgemein immundefizient sind, kann ausgeschlossen werden, da sie eine vergleichbar starke Immunantwort gegen rekombinantes Adenovirus, das das Ovalbumin-Gen im Genom trägt, generierten (Daten nicht gezeigt). Dieses Ergebnis ist ein Anzeichen für eine mögliche Endotoxin-Kontamination der Hsp70-OVA-Präparationen.



**Abbildung 4-17: *In vivo* Zytotoxizitäts-Assay in TLR4-defizienten Mäusen**

Vergleich der induzierten Immunantwort in den drainierenden Lymphknoten durch 100 pmol mtubHsp70-OVA, welches jeweils subkutan in beide Arme sieben Tage vor dem Assay gespritzt wurde. Dieses Resultat ist repräsentativ für 2 unabhängige Experimente.

#### 4.3.2. Endotoxin-Abreicherung der Fusionsproteine

Nach dem Ergebnis der TLR4-Abhängigkeit der durch mtubHsp70-OVA induzierten Immunantwort sollte eine mögliche Endotoxin-Kontamination der Präparate bestimmt werden. Daher wurde zuerst die Endotoxin-Kontamination der Präparate gemessen. Alle Präparate waren positiv für Endotoxin (zwischen 200 und 500 Endotoxin-Einheiten pro mg Protein), so z.B. mtubHsp70-OVA mit 262,4 Endotoxin Units (EU) pro mg Protein. Dies entspricht bei einer Immunisierung mit 100 pmol mtubHsp70-OVA ungefähr 95 pg LPS.

Es wurden nun mehrere Methoden der Endotoxin-Abreicherung getestet. Tabelle 4-3 zeigt eine Übersicht der Ergebnisse. Erfolgreich war als einzige Methode die Endotoxin-Abreicherung direkt während der Protein-Aufreinigung an der Ni-NTA Säule. Durch das Waschen mit einem großen Volumen eines Tween 20- und Triton X-114-haltigen Trispuffers konnten die Endotoxin-Kontaminationen auf 0,3 - 5,0 EU/mg gesenkt werden. Dies entspricht bei einer Immunisierung mit 100 pmol Fusionsprotein etwa 0,1 - 3 pg LPS, je nach Präparation. Im kommerziellen Bereich werden HSP-Präparationen unter 50

EU/mg als Endotoxin-arm und unter 5 EU/mg als Endotoxin-frei deklariert. Auch in der Literatur findet man oft den Schwellenwert von 5 EU/mg als Definition für Endotoxin-frei. Daher können auch die hier aufgereinigten Präparate als Endotoxin-frei angesehen werden.

**Tabelle 4-3: Übersicht der Methoden zur Endotoxin-Abreicherung der Fusionsprotein-Präparate**

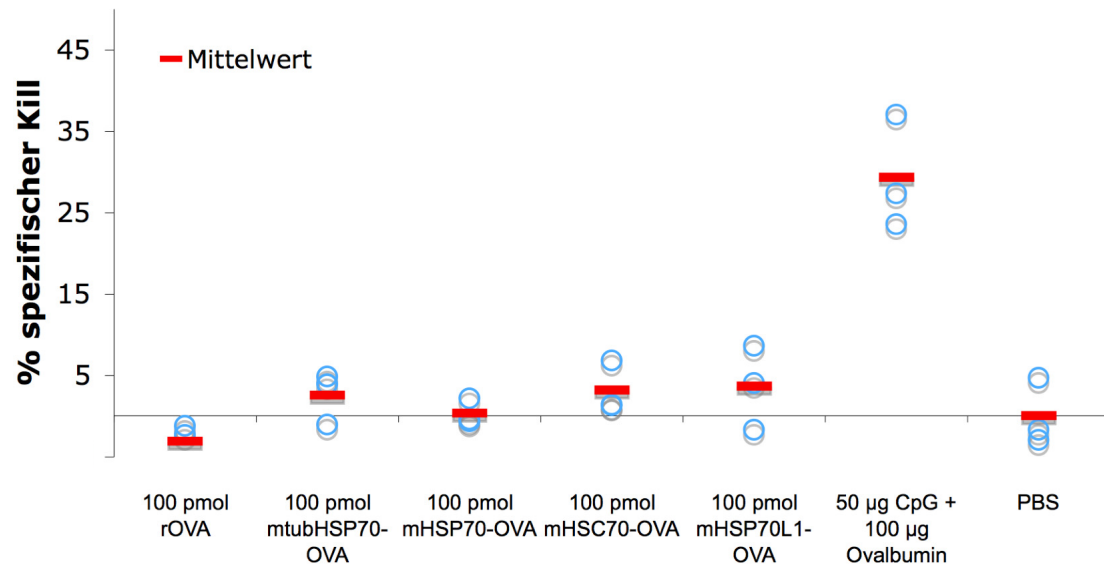
Methode	Referenz	Abreicherung des Endotoxins über	Resultat
Detoxi-Gel-Säulen, Pierce	(Gao und Tsan, 2003; Kluger et al., 1985; Morrison und Jacobs, 1976)	Bindung an Polymyxin B	Endotoxine konnten entfernt werden, aber auch kompletter Verlust der Fusionsproteine beobachtet → leeres Eluat
Phasentrennung über Triton X-114	(Aida und Pabst, 1990)	Bindung in der Detergenzphase	Endotoxine konnten entfernt werden, aber großer Proteinverlust. Zudem leichte Triton X-114 Kontamination der Präparate, die zu Zelllyse beim Beladen von APC <i>in vitro</i> führte
Tween 20/Triton X-114 Waschschrift während der Aufreinigung	(Reed et al., 2003; Warger et al., 2006)	Bindung an die Detergenzien	Endotoxine konnten entfernt werden, Proteinausbeuten vergleichbar wie bei Aufreinigungen ohne Detergenz-Waschschrift. Keine Detergenz-Kontamination durch ausgiebiges Waschen mit Endotoxin-freiem PBS.

#### 4.3.3. *In vivo* Zytotoxizitäts-Assay mit Endotoxin-depletierten Hsp70-OVA-Fusionsproteinen

Alle Endotoxin-depletierten Fusionsproteine wurden nun analog in dem oben beschriebenen *in vivo* Zytotoxizitäts-Assays untersucht, um die Frage zu klären, ob sie eigene immunstimulatorische Funktionen haben oder ob die oben beobachteten Ergebnisse aus der Endotoxin-Kontamination resultierten.

Keines der vier Hsp70-OVA-Fusionsproteine konnte nach Endotoxin-Abreicherung noch eine effiziente zytotoxische Immunantwort erzeugen (Abbildung 4-18). Auch die

Immunisierung mit Endotoxin-freiem rOVA bewirkte, wie bereits ohne die Endotoxin-Abreicherung, keine spezifische Zytotoxizität.



**Abbildung 4-18: Analyse der Endotoxin-freien Fusionsproteine im *in vivo* Zytotoxizitäts-Assay**

Analyse der induzierten Immunantwort in den drainierenden Lymphknoten durch 100 pmol Endotoxin-freies, rekombinantes Fusionsprotein, welches jeweils subkutan in beide Arme sieben Tage vor dem Assay gespritzt wurde. Dieses Resultat ist repräsentativ für 2 unabhängige Experimente.

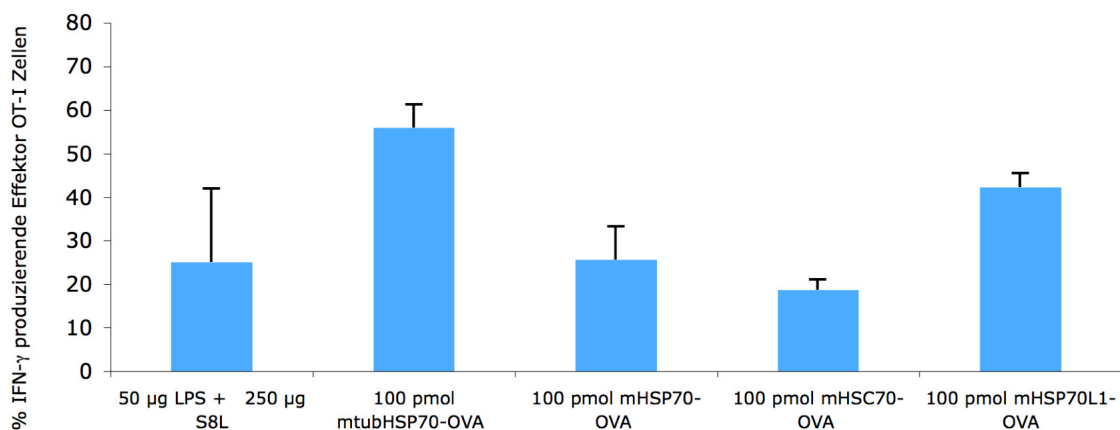
#### 4.3.4. Aktivierung von TCR-transgenen T-Zellen durch Endotoxin-freie Fusionsproteine

Um die Immunogenität durch die Endotoxin-depletierten Fusionsproteine weiter zu überprüfen, wurde auch die Aktivierung von OT-I Zellen untersucht. Hierzu wurden wieder MACS-aufgereinigte und CFSE-gefärbte OT-I Zellen in Empfängermäuse adoptiv transferiert. Die Empfängermäuse wurden nun einen Tag später mit 100 pmol Endotoxin-freiem Hsp70-OVA-Fusionsprotein intravenös immunisiert.

Sieben Tage später wurden die Milzzellen mit S8L *in vitro* restimuliert und die OT-I Zellen im FACS auf Proliferation und IFN- $\gamma$ -Produktion analysiert. Alle Endotoxin-freien Fusionsproteine konnten die OT-I Zellen zur Proliferation und zur IFN- $\gamma$ -Produktion anregen. Interessanterweise ist die Rangfolge der einzelnen HSP nicht mehr exakt die gleiche wie oben beobachtet (Abbildung 4-10C), obwohl auch hier mtubHsp70-OVA am



stärksten erscheint, gefolgt von mtubHsp70L1-OVA. Es muss bemerkt werden, dass die absolute Anzahl der durch die Endotoxin-freien Fusionsproteine induzierten Effektor OT-I Zellen viel kleiner war als in den Versuchen mit Proteinen ohne Endotoxin-Abreicherung oder in der Gruppe, die mit 50 µg LPS und 250 µg S8L immunisiert wurde (Daten nicht gezeigt). Auch in diesem System war also ein negativer Effekt der Endotoxin-Abreicherung auf die Fusionsproteine zu beobachten.



**Abbildung 4-19: Endotoxin-freie HSP-OVA-Fusionsproteine induzieren Effektor OT-I Zellen**

Es ist der Anteil der proliferierenden OT-I Zellen, die IFN- $\gamma$  produzieren (Effektor OT-I Zellen) im Graphen wiedergeben (vgl. Abbildung 4-10A und C). Pro Gruppe wurden 2 Mäuse immunisiert und analysiert.

**Zusammenfassend konnte eine deutliche Endotoxin-Kontamination der Fusionsproteine nachgewiesen werden. Bei der Endotoxin-Abreicherung erwies sich die Methode des Detergenzien-Waschschrilles (Tween 20 und Triton X-114) während der Ni-NTA-Affinitätschromatographie als erfolgreich. Keines der nun fast Endotoxin-freien Hsp70-OVA-Fusionsproteine induzierte eine signifikante zytotoxische Aktivität der Ovalbumin-spezifischen T-Zellen aus dem polyklonalen T-Zell-Gemisch. Jedoch konnten, wenn auch schwächer, die Endotoxin-abgereicherten Hsp70-OVA-Fusionsproteine noch TCR-transgene Ovalbumin-spezifische OT-I CD8<sup>+</sup> T-Zellen *in vivo* aktivieren.**

#### **4.4. Tumorstimmung mit Hsp70-OVA-Fusionsproteinen**

Ziel der Arbeit ist der Einsatz der Hsp70-OVA-Fusionsproteine als Tumor-Vakzine. Da die Endotoxin-Abreicherung der Fusionsproteine jedoch einen signifikanten Verlust der immunstimulatorischen Kapazitäten nach sich zog, musste zuerst ein erfolgreiches Vakzinierungsprotokoll etabliert werden, welches zu spezifischen Immunantworten führte. Dieses Protokoll wurde dann in den Tumorversuchen angewendet.

Bei dem hier verwendeten Tumormodell B16 handelt es sich um ein spontan entstandenes Mausmelanom, das vor Jahren aus einer C57BL/6 Maus isoliert wurde und seitdem in vielen Tumorversuchen eingesetzt wurde. Die Tumorzellen werden *in vitro* kultiviert und können nach subkutanem Transfer in eine syngene Empfängermaus (Haplotyp H-2b) erneut zu einem soliden Tumor auswachsen. Von immunologischer Bedeutung bei B16.F10 Zellen ist die geringe Expression antigenpräsentierender MHC-Klasse-I-Moleküle (H-2K<sup>b</sup> und H-2D<sup>b</sup>) und das Fehlen von MHC-Klasse-II und kostimulatorischen Molekülen (z.B. B7.1/2 oder ICAM-1). Durch die Behandlung mit IFN- $\gamma$  kann aber die Expression von MHC-Klasse-I gesteigert und von MHC-Klasse-II-Molekülen sogar neu induziert werden. Dieser Effekt von IFN- $\gamma$  ist für die immunologische Bekämpfung von B16.F10 Zellen bei *in vitro* und *in vivo* Experimenten von großer Relevanz (Bohm et al., 1998). Mäuse sind nicht in der Lage, nach der Injektion von bestrahlten Tumorzellen das Auswachsen eines B16-Tumors bei erneuter Applikation unbestrahlter Zellen zu verhindern. Daher gelten B16-Melanomzellen als nicht immunogen. Unter bestimmten Bedingungen kann aber das Immunsystem gegen die Tumorzellen aktiviert werden. Hierbei konnten NK-Zellen (Kodama et al., 1999) und zytotoxische T-Zellen (Prevost-Blondel et al., 1998) als Effektorzellen identifiziert werden.

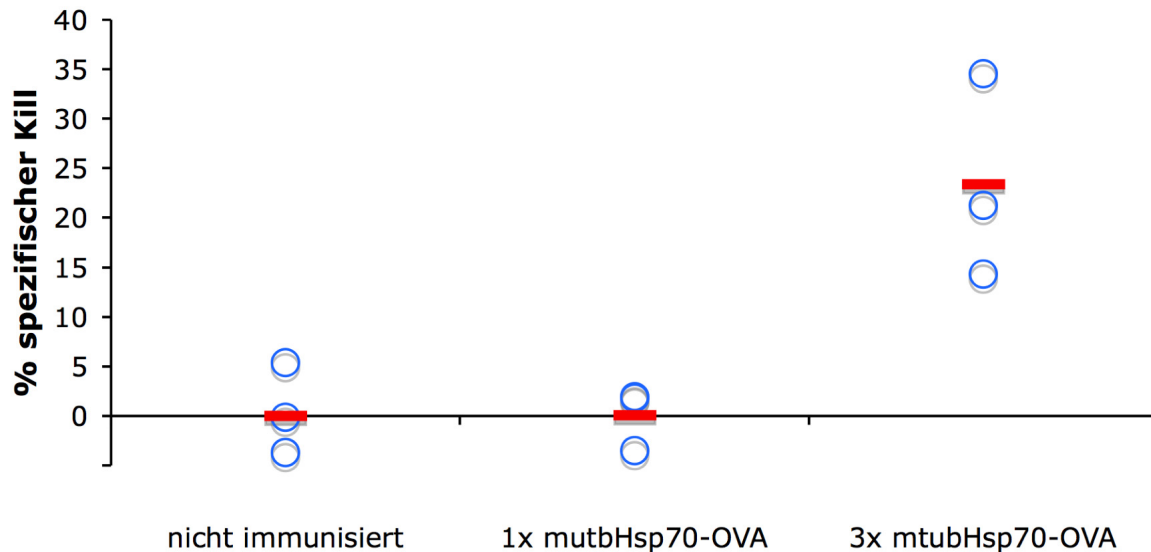
Für Tumorexperimente in dieser Arbeit wurde die B16-Transfektante MO4, die Ovalbumin exprimiert, verwendet (Falo et al., 1995; Moore et al., 1988).

#### 4.4.1. Mehrfache Immunisierung mit Endotoxin-freien Fusionsproteinen

Ziel dieser Versuchsreihe war die Etablierung eines erfolgreichen Immunisierungsprotokolls im *in vivo* Zytotoxizitäts-Assays für die Endotoxin-freien Fusionsproteine. Hierzu wurde exemplarisch das mtubHsp70-OVA Fusionsprotein verwendet, welches nach der Endotoxin-Abreicherung die stärkste OT-I Aktivierung zeigt. In Anlehnung an die Untersuchung zur Produktion von IFN- $\gamma$  durch S8L-spezifische T-Zellen aus dem polyklonalen Gemisch (Abbildung 4-15) wurde eine Dreifach-Immunisierung angewendet. Naiven Mäusen wurden 3-mal im Abstand von einer Woche in beide Arme subkutan 100 pmol Endotoxin-freies mtubHsp70-OVA gespritzt. Zum Vergleich wurde eine Gruppe nur einmal mit 100 pmol Endotoxin-freiem mtubHsp70-OVA immunisiert. Eine Woche nach der letzten Immunisierung wurde ein *in vivo* Zytotoxizitäts-Assay wie oben beschrieben durchgeführt.

Übereinstimmend mit dem oben genannten Ergebnissen konnte eine einfache Immunisierung mit Endotoxin-freiem mtubHsp70-OVA keine signifikante spezifische Immunantwort im polyklonalen T-Zell-Gemisch hervorrufen. Die dreifache Immunisierung induzierte jedoch eine starke *in vivo* Zytotoxizität (Abbildung 4-20).

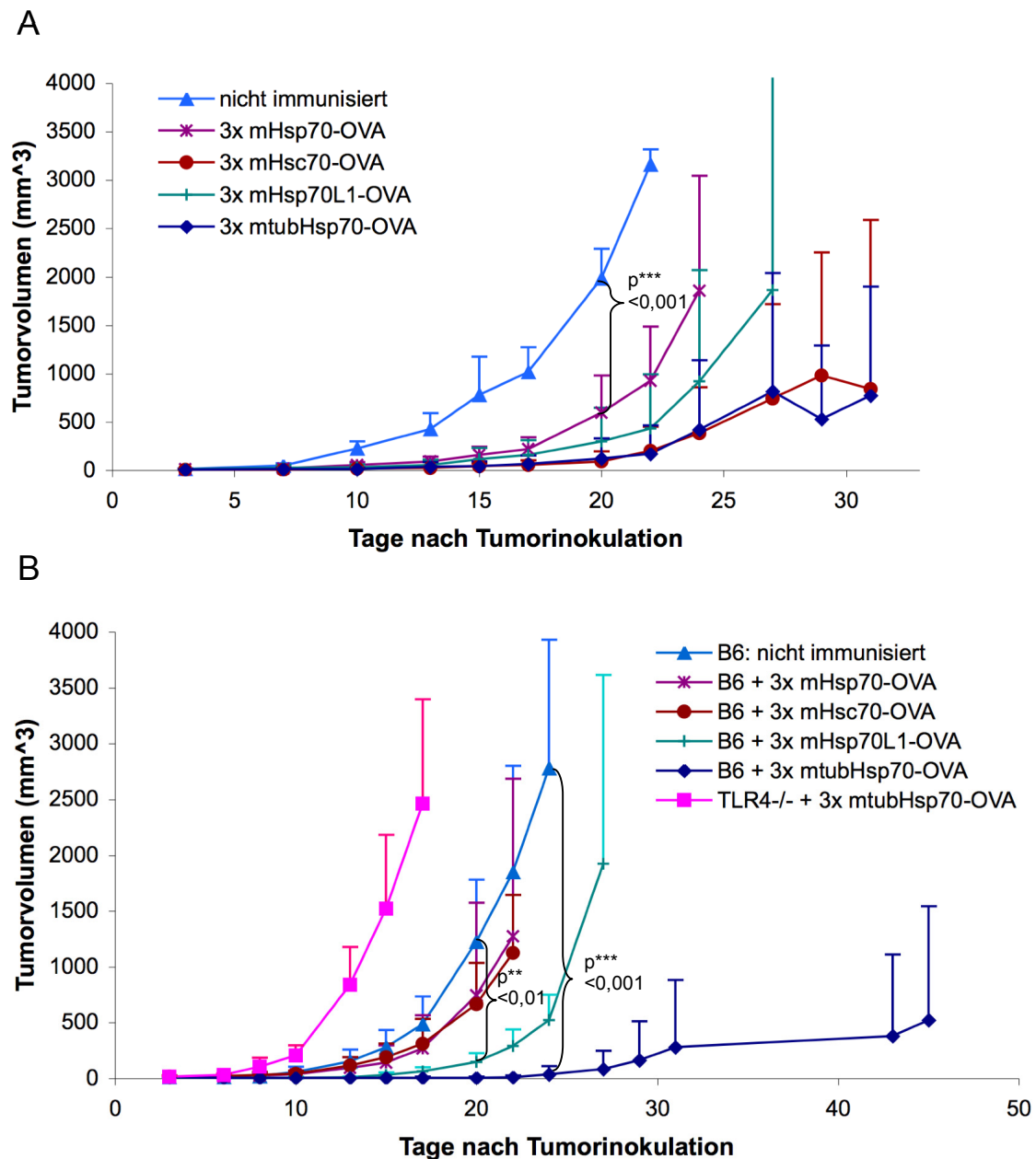
Diese Immunisierungsstrategie wurde nun auch in einem Tumorversuch angewendet. Zuerst wurde eine prophylaktische Immunisierung von Mäusen angestrebt, denen eine Woche nach der letzten Immunisierung eine Ovalbumin-exprimierende Melanom-Zelllinie gespritzt wurde. Hierzu wurden die Mäuse dreimal im Abstand von einer Woche mit den Fusionsproteinen subkutan an der Stelle der späteren Applikation der Tumorzellen immunisiert. Eine Woche nach der letzten Immunisierung wurde nun den Mäusen  $5 \times 10^5$  Zellen der B16-OVA-Transfektante MO4 in die rechte Flanke subkutan gespritzt und regelmäßig das Tumolvolumen bestimmt. Nicht vorimmunisierte Mäuse sterben in der Regel nach 3 Wochen (Tag 21) oder müssen getötet werden, da das Tumolvolumen zu groß wird (Abbildung 4-21 und andere Abb. mit Tumorversuchen).



**Abbildung 4-20: *In vivo* Zytotoxizität durch Dreifach-Immunisierung mit Endotoxin-freiem Fusionsprotein**

Analyse der S8L-spezifischen Zytotoxizität in den drainierenden Lymphknoten durch Endotoxin-freies mtubHsp70-OVA. Nur eine Dreifach-Immunisierung resultierte in einer signifikanten Lyse der S8L-beladenen Zielzellen.

In zwei unabhängigen Versuchen wurde das Tumorwachstum nach dreifacher Immunisierung aufgezeichnet. In beiden Experimenten führten einige Fusionsproteine zu signifikanter Verzögerung des Tumorwachstums (Abbildung 4-21). Die Endotoxin-freien Fusionsproteine mtubHsp70-OVA und mHsp70L1-OVA können in beiden Fällen das Auswachsen von MO4 mindestens 1-2 Wochen hinauszögern. In einem Versuch wurde beobachtet, dass mtubHsp70-OVA sogar das Wachstum um 30 Tage hinauszögerte (Abbildung 4-21B). Die Fusionsproteine mHsc70-OVA und mHsp70-OVA führten nur in einem der beiden Versuche zu einem signifikanten Hinauszögern des Wachstums (Abbildung 4-21A).



**Abbildung 4-21: Tumorwachstum nach prophylaktischer Immunisierung mit Fusionsproteinen**

Tumorwachstum nach dreifacher, prophylaktischer subkutaner Immunisierung mit Endotoxin-freien Hsp70-OVA-Fusionsproteinen. (A) und (B) zeigen 2 unabhängige Experimente. (A) 3 Wochen nach Tumorinokulation war schon ein signifikanter Unterschied im Tumorwachstum bei immunisierten Mäusen zu beobachten. (B) Immunisierung mit mtubHsp70-OVA führte zu einer signifikanten Herausögerung des Auswachsens von MO4 in Wildtyp-Mäusen, jedoch nicht in TLR4-defizienten Mäusen. In beiden Versuchen bestanden die Gruppen aus 5 Mäusen.

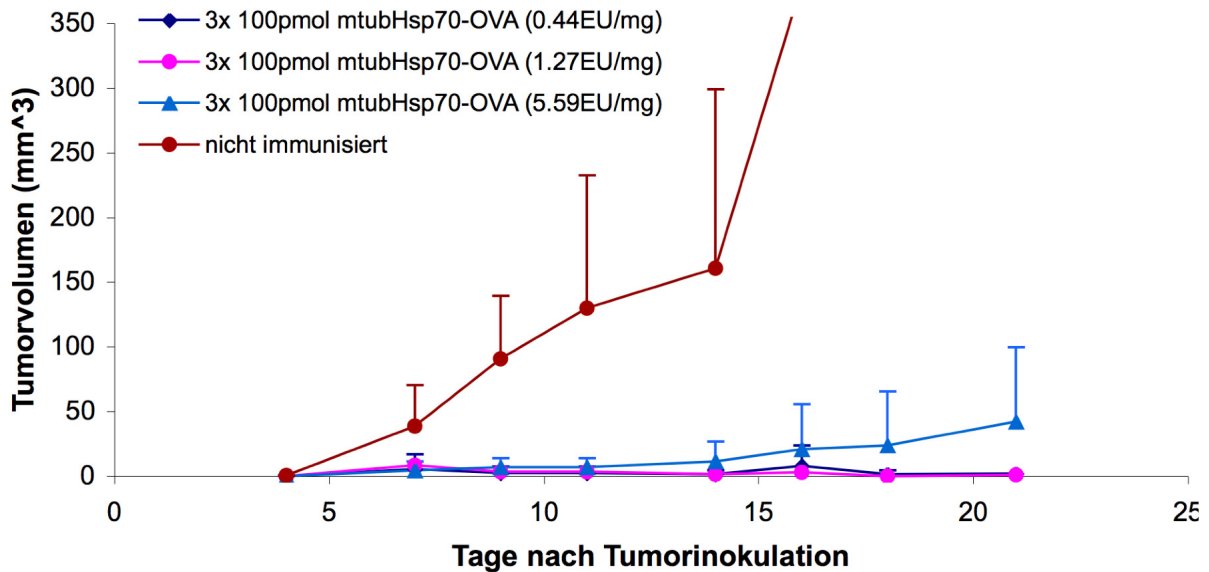
Die Immunisierung von TLR4-defizienten Mäusen mit Endotoxin-freiem mtubHsp70-OVA resultierte jedoch in keiner aktiven Tumormunität (Abbildung 4-21). Es muss erwähnt werden, dass nicht immunisierte TLR4-defiziente Mäuse ein vergleichbares Tumorwachstum von MO4 zeigten wie Wildtyp-Mäuse (Daten nicht gezeigt). Die fehlende Immunität der TLR4-/- Mäuse in Bezug auf Ovalbumin-exprimierende Melanom-Zellen läßt zwei Schlüsse zu. Entweder waren die noch messbaren, minimalen Endotoxin-

Kontaminationen der Fusionsprotein-Präparate verantwortlich für den induzierten Tumorschutz in Wildtyp-Mäusen oder die Hsp70-OVA-Fusionsproteine benötigen TLR4 selbst als Rezeptor, um das Immunsystem zu aktivieren.

Da die residualen, sehr geringen Endotoxin-Kontaminationen nicht weiter reduziert werden konnten, wurde ein Versuch durchgeführt, in dem mtubHsp70-OVA Fusionsproteine mit unterschiedlich großen Endotoxin-Kontaminationen verglichen wurden. Falls minimale Endotoxin-Kontaminationen für die oben beobachtete Verzögerung des Tumorwachstums verantwortlich waren, sollten unterschiedlich große Endotoxin-Kontaminationen in den Immunsierungspräparaten einen Unterschied im Tumorwachstum ausmachen. Hierfür wurden drei mtubHsp70-OVA-Präparate gewählt, die unterschiedliche Endotoxin-Kontaminationen hatten (0,44, 1,27 bzw. 5,59 EU/mg). Diese wurden, analog wie oben beschrieben, für die dreifache subkutane Immunisierung verwendet. Eine Woche nach der letzten Immunisierung wurde dann  $5 \times 10^5$  MO4-Zellen appliziert.

In allen 3 Gruppen konnte eine signifikante Herausverzögerung des Tumorwachstums beobachtet werden (Abbildung 4-22). Keine Korrelation konnte jedoch zwischen der Endotoxin-Kontamination der mtubHsp70-OVA-Präparate und der Auswirkung auf das Tumorwachstum festgestellt werden. Die Gruppe, die mit dem Präparat der höchsten Endotoxin-Kontamination immunisiert wurde, zeigte sogar als erstes ein Auswachsen des MO4-Tumors, wenn auch erst nach 20 Tagen.

**Zusammenfassend lässt sich also ein signifikanter Anti-Tumor-Effekt nach einer prophylaktischen Dreifach-Immunisierung bei mtubHsp70-OVA und mHsp70L1-OVA beobachten. Die Fusionsproteine mHsp70-OVA und mHsc70-OVA hatten in einem von zwei Versuchen auch eine signifikante Verlangsamung des Tumorwachstums hervorgerufen. Einfach-Immunisierungen mit mtubHsp70-OVA zeigten keine Auswirkung auf das Tumorwachstum (Daten nicht gezeigt). Niedrige Rest-Endotoxin-Kontaminationen waren wahrscheinlich nicht für den Tumorschutz verantwortlich (Abbildung 4-22), sodass eher von einer endotoxin-unabhängigen Wirkung auf TLR4 oder andere HSP-Rezeptoren auszugehen ist.**

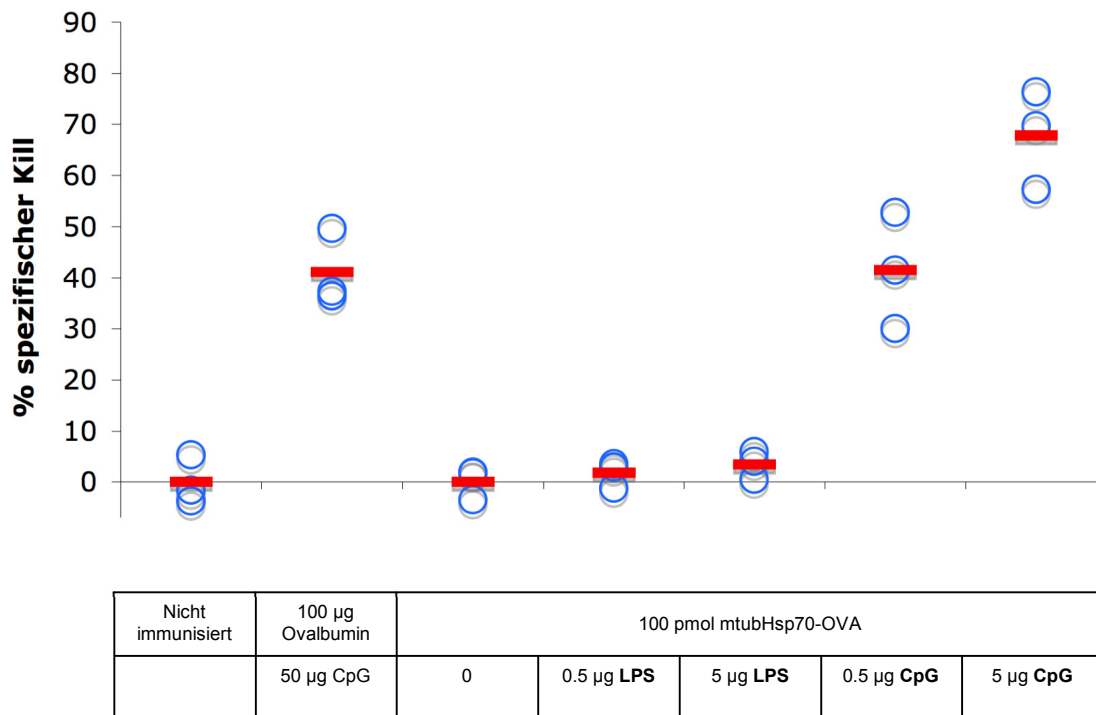


**Abbildung 4-22: Einfluß von Endotoxin-Kontaminationen auf die Immunisierung**

Drei unterschiedliche mtubHsp70-OVA-Präparate mit unterschiedlichen Endotoxin-Kontaminationen wurden für die prophylaktische Immunisierung verwendet. Nach subkutaner Tumoringjektion wurde das Tumorstadium analysiert. Es konnte kein Zusammenhang zwischen Tumorstimmunität und Endotoxin-Kontamination der Präparate gefunden werden. Die Gruppen bestanden aus jeweils 5 Mäusen.

#### 4.4.2. Kombination von Hsp70-OVA-Fusionsproteinen mit TLR-Liganden

Neben der Mehrfach-Immunisierung wurde auch die Kombination von Fusionsproteinen mit TLR-Liganden als Immunisierungsschema untersucht. In Anlehnung an eine kürzlich erschienene Studie (Warger et al., 2006), wurden die Endotoxin-freien Fusionsproteine mit TLR-Liganden vorinkubiert (1 h bei 37 °C) und dann zur Immunisierung verwendet. Neben dem TLR4-Liganden LPS wurde hierbei jedoch nicht der TLR2-Ligand Pam<sub>3</sub>Cys verwendet, sondern der TLR9-Ligand CpG-ODN 1668. Diese Kombinationen wurden zuerst in einem *in vivo* Zytotoxizität-Assay getestet. Hierzu wurden jeweils 100 pmol mtubHsp70-OVA mit entsprechenden Mengen TLR-Ligand inkubiert und nach einmaliger subkutaner Immunisierung in beide Arme von Mäusen der *in vivo* Zytotoxizität-Assay eine Woche später durchgeführt.



**Abbildung 4-23: Kombination von mtubHsp70-OVA und TLR-Liganden**

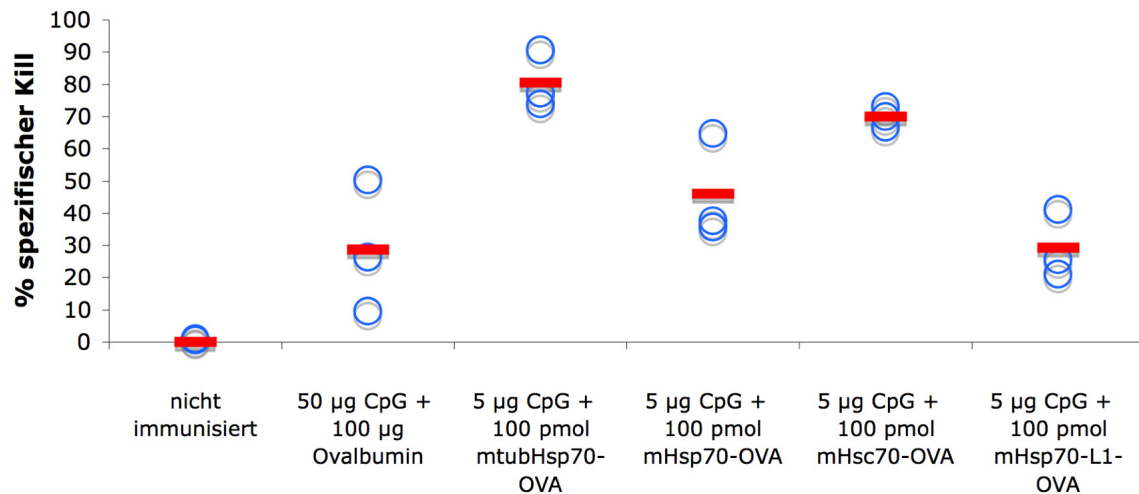
100 pmol mtubHsp70-OVA wurden mit verschiedenen Mengen des TLR4-Liganden LPS bzw. des TLR9-Liganden CpG-ODN 1668 vorinkubiert, zur Immunisierung verwendet und die hervorgerufene *in vivo* Zytotoxizität bestimmt. Nur in Kombination mit CpG ist eine spezifische Lyse von S8L-Zielzellen beobachtbar.

Weder die Vorinkubation des mtubHsp70-OVA Fusionsproteins mit kleinen (0,5 µg) oder mittleren (5 µg) Mengen LPS resultierte in einer spezifischen Lyse der S8L-beladenen Zielzellen (Abbildung 4-23). Die Vorinkubation von mtubHsp70-OVA und CpG-ODN 1668 zeigte jedoch eine starke Immunantwort. Bei kleinen Mengen CpG (0,5 µg) war die induzierte Zytotoxizität vergleichbar mit der Positivkontrolle (CpG + OVA), obwohl bei dieser die 100-fache Menge an CpG und die 23-fache Menge an Antigen (Ovalbumin MW=43 kDa) eingesetzt wurden. Durch höhere Mengen an CpG (5 µg) konnte diese Zytotoxizität sogar noch erhöht werden, und war vergleichbar mit dem „Gold Standard“ von 50 µg CpG und 2,5 µg DEC205-OVA (Abbildung 4-16). Bei vergleichbarer Menge an rekombinantem Protein (100 pmol mtubHsp70-OVA = 6 µg) war jedoch 10 mal weniger CpG (5 µg) nötig, um eine ähnlich starke Immunantwort zu erzeugen.

Die Kombination von 5 µg CpG-ODN 1668 und 100 pmol Fusionsprotein wurde nun zum Vergleich aller HSP-OVA-Fusionsproteine angewendet. Alle Endotoxin-freien Fusionsproteine konnten in Kombination mit CpG eine signifikante Zytotoxizität induzieren

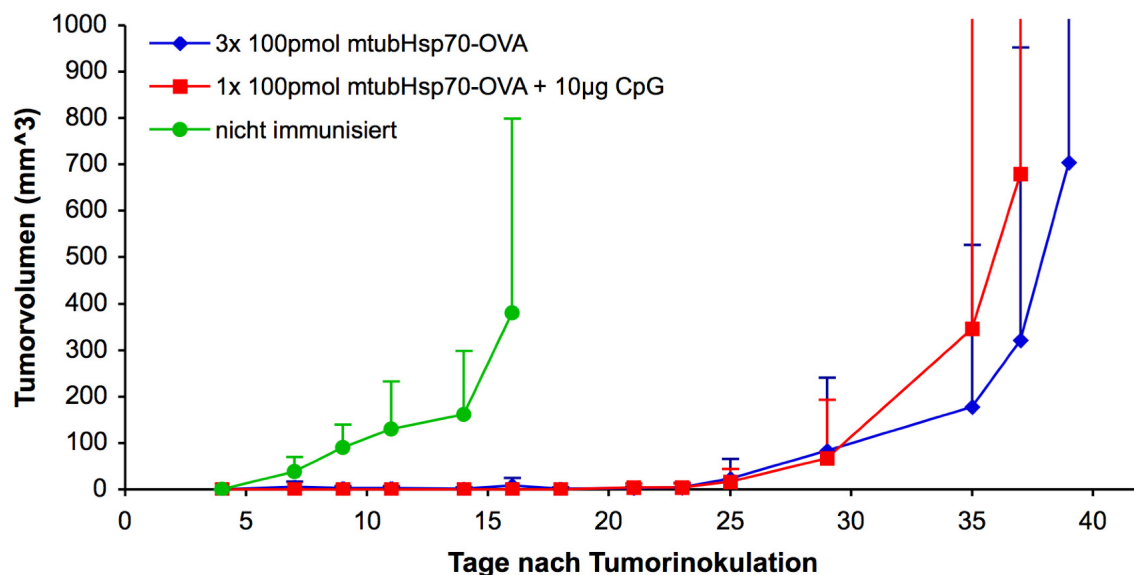


(Abbildung 4-24). Auch in Kombination mit CpG war mtubHsp70-OVA die potenteste Vakzine in der Rangfolge der Hsp70-OVA-Fusionsproteine.



**Abbildung 4-24: Vergleich aller Fusionsproteine in Kombination mit CpG**

In Kombination mit 5 µg CpG-ODN 1668 und 100 pmol Endotoxin-freiem HSP-OVA Fusionsprotein ließ sich wieder die vorherrschende Rolle von mtubHsp70-OVA beobachten. Es folgten mHsc70-OVA, mHsp70-OVA und dann mHsp70L1-OVA.



**Abbildung 4-25: Vergleich von Mehrfachimmunisierungen und der Kombination mit CpG**

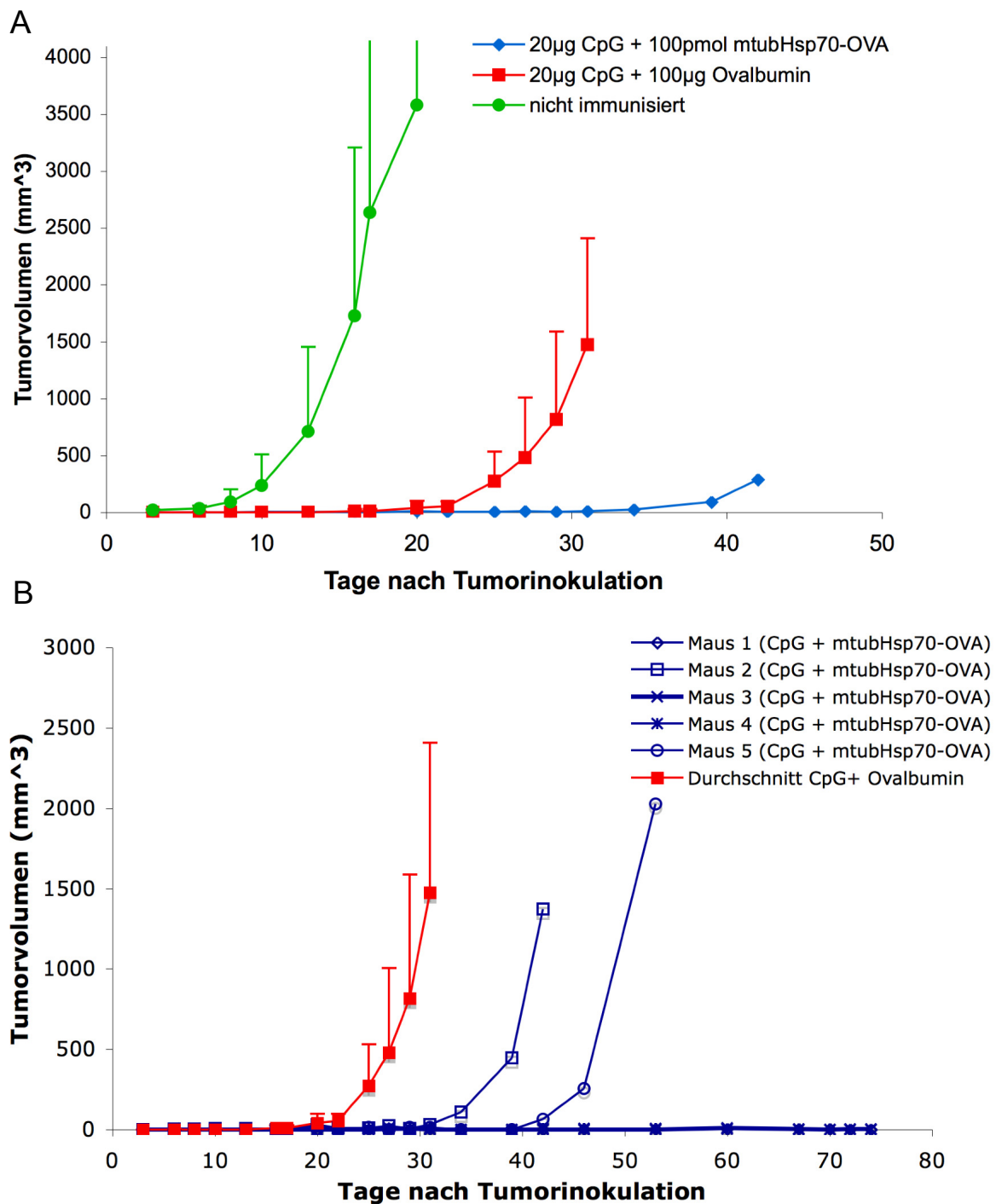
Mäuse wurden entweder prophylaktisch subkutan dreimal mit 100pmol Endotoxin-freiem mtubHsp70-OVA oder einmal mit der Kombination von 100 pmol mtubHsp70-OVA und 10 µg CpG-ODN 1668 immunisiert. Eine Woche nach der letzten Immunisierung wurden dann  $5 \times 10^5$  MO4-Zellen subkutan injiziert. Beide Immunisierungsstrategien resultierten in einer vergleichbar signifikanten Verzögerung des Tumorwachstums.

Das Endotoxin-freie Fusionsprotein mHsp70L1-OVA erschien hier aber schwächer immunogen, als zuvor in den prophylaktischen Tumorversuchen und den OT-I Aktivierungen beobachtet (vgl. Abbildung 4-21).

Der Einsatz der Kombination von CpG und HSP-OVA in Tumorimmunisierungen wurde im nächsten Versuch untersucht. In diesem Versuch wurde zudem diese Immunisierungsstrategie mit der Mehrfachimmunisierung mit Endotoxin-freiem mtubHsp70-OVA verglichen. Beide prophylaktischen Immunisierungsstrategien bewirkten eine signifikante Tumorimmunität und das Auswachsen des MO4-Tumors konnte um rund 20 Tage hinausgezögert werden (Abbildung 4-25). Zudem schienen beide Immunisierungsmethoden einen ähnlich starken Einfluß auf das Tumorstadium zu haben.

Die Immunisierung mit der Kombination von hohen Mengen an kommerziell erhältlichem, nativem Ovalbumin und CpG hat, wie auch im *in vivo* Zytotoxizitäts-Assay, einen signifikanten Einfluß auf das Tumorstadium von MO4-Tumorzellen (persönliche Kommunikation, Natalio Garbi, DKFZ, Heidelberg). Um diese Ergebnisse zu reproduzieren, wurde der Vergleich der einmaligen prophylaktischen Immunisierung mit nativem Ovalbumin bzw. mtubHsp70-OVA bei gleichen Mengen CpG untersucht. 100 µg Ovalbumin bzw. 100 pmol mtubHsp70-OVA wurden in Kombination mit 20 µg CpG-ODN 1668 subkutan injiziert. Nach subkutaner Applikation von  $5 \times 10^5$  MO4-Zellen wurde das Tumorstadium beobachtet. Beide Immunisierungen resultierten in einem langen Hinauszögern des Tumorstadiums (Abbildung 4-26A). Die Kombination von mtubHsp70-OVA und CpG führte jedoch zu einem wesentlich länger anhaltenden Tumorschutz, wobei die Antigenmenge im Vergleich zu Ovalbumin (100 µg Ovalbumin = 2300 pmol) 23x niedriger war.

3 von 5 Mäuse in der mit mtubHsp70-OVA immunisierten Gruppe zeigten sogar 70 Tage nach Immunisierung kein Tumorstadium (Abbildung 4-26B). Desweiteren wurde diesen 3 Mäusen am Tag 64 in der linken Flanke ein zusätzlicher MO4 Tumor gesetzt, um die induzierte Ovalbumin-spezifische T-Zell-Gedächtnis-Antwort zu untersuchen. In 2 von diesen 3 Mäusen zeigte sich auch 30 Tage nach der Injektion des zweiten Tumors kein Tumorstadium (Daten nicht gezeigt).



**Abbildung 4-26: Langanhaltende Tumorimmunität durch Kombination von CpG und mtubHsp70-OVA**

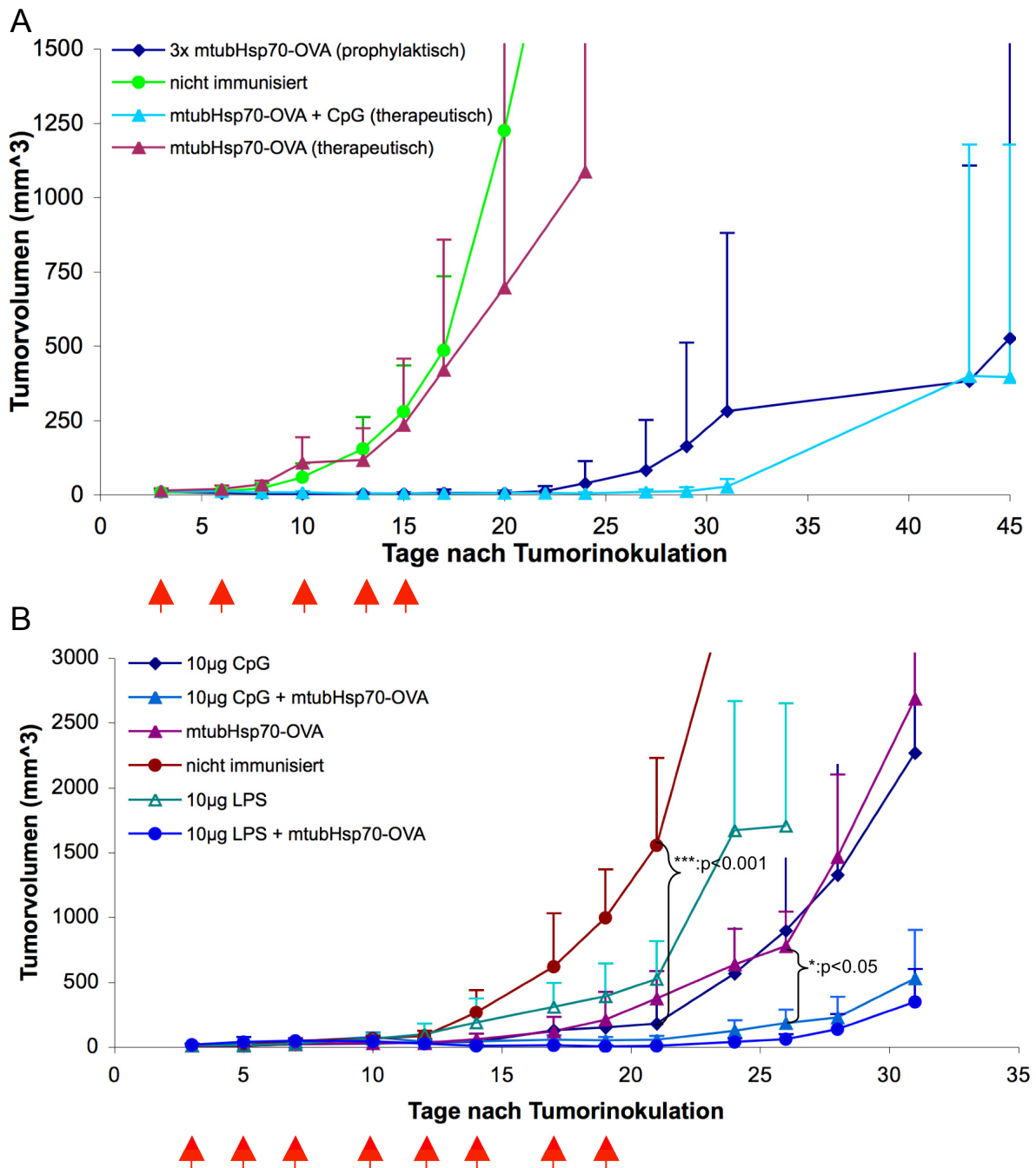
5 Mäuse pro Gruppe wurden entweder mit 20 µg CpG und 100 pmol mtubHsp70-OVA oder mit 20 µg CpG und 100 µg Ovalbumin einmal prophylaktisch subkutan immunisiert und nach Tumorapplikation das Tumorwachstum beobachtet. (A) Beide Gruppen zeigten eine signifikante Herausögerung des Tumorwachstums. (B) 3 von 5 Mäuse in der Gruppe, die mit mtubHsp70-OVA immunisiert wurde, zeigten auch 70 Tage nach Tumorapplikation kein Auswachsen von MO4, während bei der Gruppe, die mit Ovalbumin immunisiert wurde, die Tumoren zwischen Tag 20 und 30 auswuchsen.

#### 4.4.3. Therapeutische Tumortherapie mit mtubHsp70-OVA

Ziel dieser Arbeit war nicht nur die prophylaktische Tumorimmunisierung von Mäusen mit den HSP-OVA-Fusionsproteinen, sondern auch die therapeutische Tumortherapie mit den HSP-OVA-Fusionsproteinen. Für therapeutische Immunisierungen wurden den Versuchstieren zunächst  $5 \times 10^5$  MO4-Tumorzellen subkutan in die rechte Flanke injiziert. Drei Tage später erfolgte der Start der Therapie durch subkutane Immunisierung in der Nähe des Tumors. Zu diesem Zeitpunkt hatten die Tumore im Durchschnitt ein Volumen von  $20 \text{ mm}^3$ . Die Immunisierungszeitpunkte der Therapie sind mit roten Pfeilen gekennzeichnet (Abbildung 4-27).

In einem ersten Tumorversuch wurde die Kombination von mtubHsp70-OVA mit CpG mit der therapeutischen Immunisierung durch mtubHsp70-OVA allein verglichen (Abbildung 4-27A). Nach 5 therapeutischen Immunisierungen konnte nur im Falle der Kombination mit CpG eine Verzögerung des Wachstums beobachtet werden. Die Gruppe, die nur mit mtubHsp70-OVA therapeutisch behandelt wurde, zeigte in diesem Versuch kein verändertes Tumorwachstum und glich der nicht immunisierten Gruppe. Zum Vergleich wurde in diesen Versuch auch noch eine Gruppe mit einbezogen, die einmal prophylaktisch vor der Tumordinjektion mit CpG und mtubHsp70-OVA immunisiert wurde, aber danach keine therapeutische Behandlung bekam. Die therapeutische Behandlung der tumortragenden Mäuse war ähnlich erfolgreich wie die prophylaktische Immunisierung für die Herauszögerung des Wachstums von MO4-Tumoren.

Abbildung 4-27B zeigt einen zweiten Tumorversuch, in dem mtubHsp70-OVA in Kombination mit LPS oder CpG (nach Vorinkubation) therapeutisch gespritzt wurde. Zudem enthält der Versuch auch Gruppen, bei denen nur LPS, CpG bzw. mtubHsp70-OVA allein gespritzt wurde. In diesem Versuch wurde die therapeutische Behandlung auf 8 Immunisierungen ausgebaut. Jedoch ließ sich im Falle der Kombination von mtubHsp70-OVA und CpG keine stärkere Tumorimmunität durch längeres therapeutisches Behandeln beobachten (Abbildung 4-27A).



**Abbildung 4-27: Therapeutische Antitumor-Immunisierung mit mtubHsp70-OVA**

$5 \times 10^5$  MO4-Tumorzellen wurden in 2 unabhängigen Versuchen (A und B) in naive Mäuse subkutan am Tag 0 injiziert. Am Tag drei erfolgte der Start der therapeutischen Immunisierungen an den angegebenen Tagen (rote Pfeile). (A) zeigt einen Vergleich von mtubHsp70-OVA mit und ohne Kombination von CpG. Zudem enthält der Graph zum Vergleich eine Gruppe von Mäusen, die einmal prophylaktisch mit 100 pmol mtubHsp70-OVA und 10 µg CpG immunisiert wurden, aber dann keine therapeutischen Immunisierungen bekamen. (B) zeigt die Kombination von mtubHsp70-OVA mit CpG bzw. LPS oder, zur Kontrolle, diesen drei Komponenten jeweils alleine. Jede Teilgruppe bestand in beiden Versuchen aus jeweils 5 Mäusen.

Auch die Kombination von LPS und mtubHsp70-OVA hatte einen sehr ähnlichen Effekt auf das Tumorstadium wie auch die Kombination von CpG und mtubHsp70-OVA. In beiden Fällen konnte das Tumorstadium für längere Zeit hinausgezögert werden (ca. 25 Tage). Beide Kombinationen boten auch einen besseren Tumorschutz im therapeutischen Ansatz als die einzelnen Komponenten.

In diesem Versuch schien im Gegensatz zum ersten therapeutischen Tumorstadium die Behandlung mit mtubHsp70-OVA allein eine Verzögerung des Tumorstadiums hervorgerufen zu haben (Abbildung 4-27A). Der positive Effekt von LPS in Kombination mit mtubHsp70-OVA ist in diesem Experiment nicht in Übereinstimmung mit den Ergebnissen des *in vivo* Zytotoxizitäts-Assays (Abbildung 4-23). Erwähnenswert in diesen Zusammenhang ist jedoch die starke inflammatorische Reaktion der Haut um die Injektionsstellen im Tumorbereich nach Injektion von LPS, die sich in Kombination mit mtubHsp70-OVA oder bei LPS allein zeigte (Daten nicht gezeigt). Diese starke Hautirritation der Tumorumgebung könnte eine direkte proinflammatorische Wirkung des LPS darstellen, die das Tumorstadium reduziert hat.

**Es konnte also eine starke Tumorstadium durch die Endotoxin-freien HSP-OVA-Fusionsproteine entweder nach prophylaktischer Mehrfach-Immunsierung oder nach einmaliger Immunsierung in Kombination mit CpG induziert werden. Zudem konnte die Kombination von mtubHsp70-OVA und CpG (oder LPS) während einer therapeutischen Behandlung von tumortragenden Mäusen eine signifikante Verzögerung des Wachstums des Ovalbumin-exprimierenden MO4-Melanoms bewirken.**

## **4.5. Vergleich von Hsp70-OVA-Fusionsproteinen mit Ovalbumin**

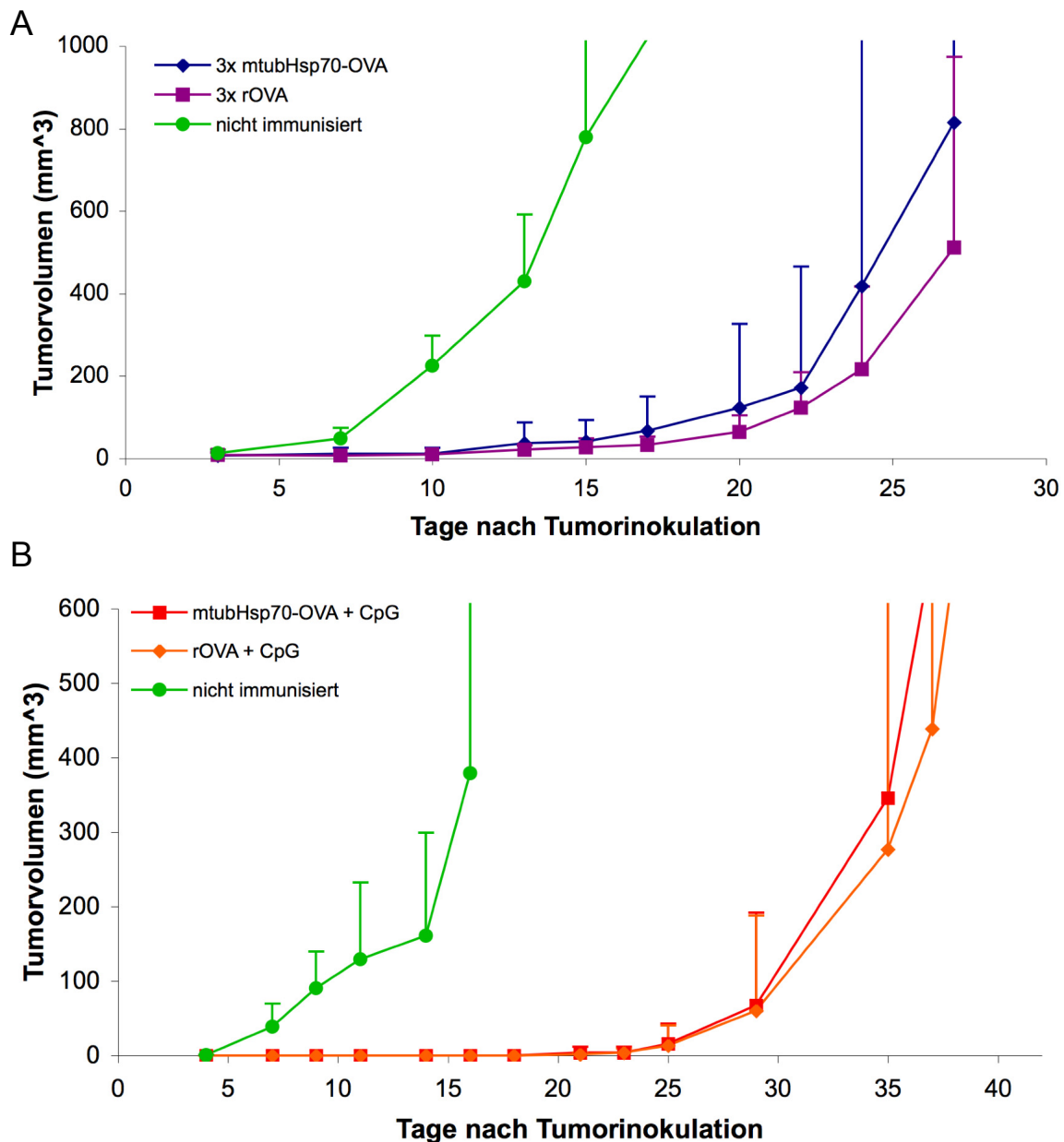
Ein anderes Ziel dieser Arbeit war es, einen Vorteil in der Verwendung von Hsp70-OVA-Fusionsproteinen gegenüber dem Antigen allein herauszuarbeiten. Daher wurde das bisher am stärksten immunogene HSP-OVA-Fusionsprotein (mtubHsp70-OVA) mit dem rekombinanten Ovalbumin (rOVA), dem kommerziell erhältlichen Ovalbumin und, im Falle des *in vivo* Zytotoxizitäts-Assay, mit dem MHC-Klasse-I-Peptid S8L verglichen.

### 4.5.1. Immunisierung mit Endotoxin-freiem rekombinanten OVA-Fragment

Um die tatsächliche Immunisierungseffizienz der Endotoxin-freien HSP-OVA-Fusionsproteine zu untersuchen, wurde mtubHsp70-OVA mit dem identisch aufgereinigten und Endotoxin-freien rOVA verglichen. Hier sollte nun analysiert werden, um wieviel stärker die induzierte Immunantwort gegen Ovalbumin bei Anwesenheit des HSP-Anteils des Fusionsproteins ist.

Zu diesem Zweck wurden Tumorversuche durchgeführt und die Auswirkungen des prophylaktischen Immunisierens mit oder ohne TLR9-Ligand CpG-ODN 1668 auf das Tumorstadium untersucht. Im Fall der Immunisierung in Kombination von CpG wurde einmal immunisiert, bei Abwesenheit von zusätzlichen Adjuvans wurde dreimal im Abstand von einer Woche immunisiert.

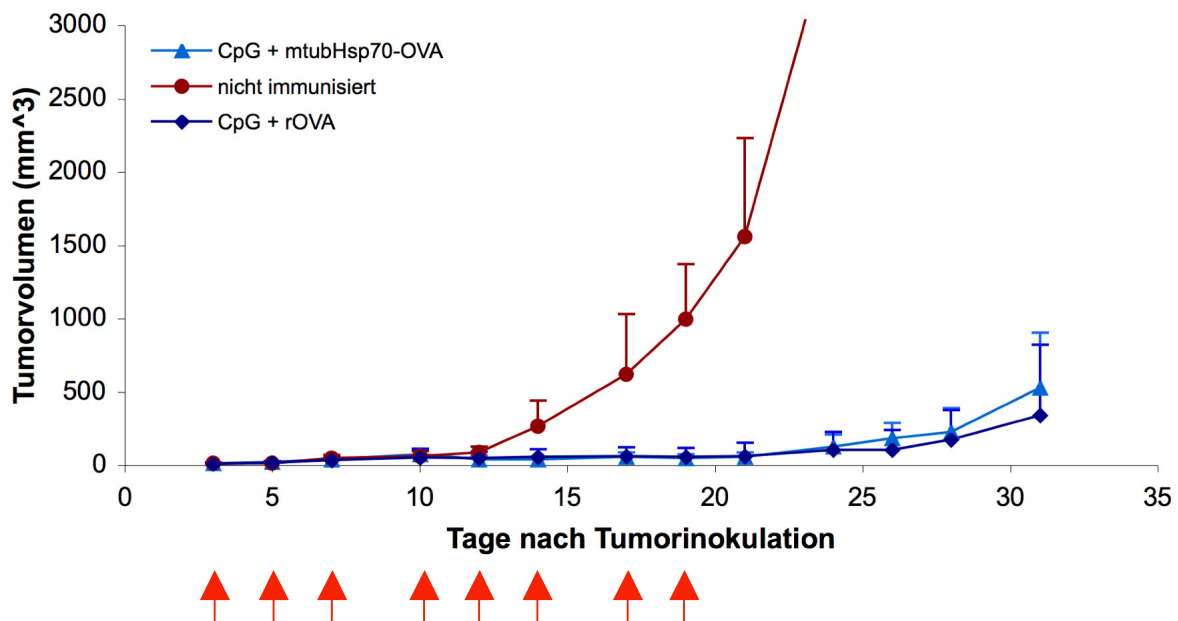
Bei keiner der beiden prophylaktischen Immunisierungsstrategien konnte jedoch ein signifikanter Unterschied zwischen mtubHsp70-OVA und rOVA festgestellt werden (Abbildung 4-28). Die Wachstumskurven des MO4-Tumors waren beinahe identisch im Falle der Mehrfachimmunisierung (Abbildung 4-28A) und bei der einmaligen Immunisierung in Kombination mit CpG (Abbildung 4-28B). Beide rekombinanten Proteine hatten also die gleiche Effizienz, das Tumorstadium etwa 20 Tage hinauszuzögern.



**Abbildung 4-28: Vergleich des Tumorwachstums nach prophylaktischer Immunisierung mit rOVA und mtubHsp70-OVA**

Naive Mäuse wurden prophylaktisch subkutan immunisiert und eine Woche nach der letzten Immunisierung mit  $5 \times 10^5$  MO4-Zellen subkutan injiziert. (A) zeigt die Dreifach-Immunisierung mit 100 pmol rOVA oder mtubHsp70-OVA. (B) zeigt die einfache Immunisierung mit 10  $\mu$ g CpG mit 100 pmol rOVA oder mtubHsp70-OVA. Es wurden 5 Mäuse pro Gruppe verwendet.





**Abbildung 4-29: Therapeutische Immunisierung zur Tumorbehandlung mittels rOVA**

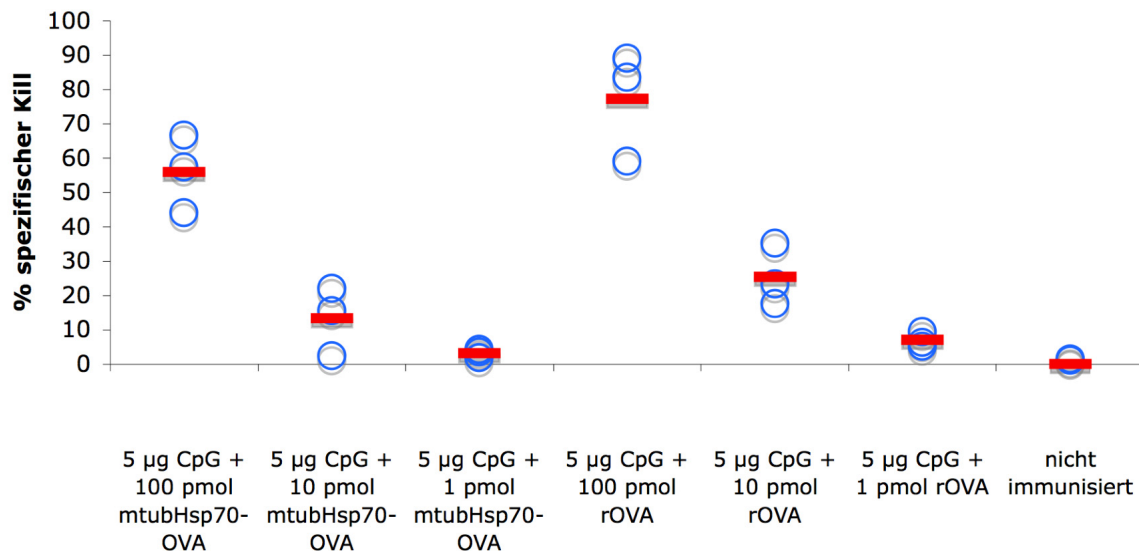
Naiven Mäusen wurde subkutan in die rechte Flanke  $5 \times 10^5$  MO4-Zellen gespritzt und 3 Tage später die therapeutische Behandlung mit 100 pmol rekombinanten Protein und 10  $\mu$ g CpG gestartet (subkutan in Tumornähe appliziert; rote Pfeile). Es war kein signifikanter Unterschied in der Behandlung mit rOVA und mtubHsp70-OVA zu beobachten. Es wurden 5 Mäuse pro Gruppe verwendet.

Da in diesen prophylaktischen Immunisierungen kein Unterschied im Tumorwachstum zu beobachten war, wurde beschlossen, eine therapeutische Tumorbehandlung zum Vergleich der beiden rekombinanten Proteine durchzuführen. Analog wie oben beschrieben wurden naiven Mäusen  $5 \times 10^5$  MO4-Zellen gespritzt und an den angegebenen Tagen (rote Pfeile) mit 100 pmol rekombinantem Protein und 10  $\mu$ g CpG subkutan behandelt.

Auch die therapeutische Behandlung eines wachsenden MO4-Tumors zeigte keinen Unterschied zwischen mtubHsp70-OVA und dem rekombinanten OVA (rOVA). Beide Fusionsproteine konnten in Kombination mit CpG das Tumorwachstum fast 25 Tage hinauszögern.

Es stellte sich also die Frage, ob das hier verwendete rOVA vielleicht, wie die Hsp70-OVA-Fusionsproteine, über die Kapazität verfügt, Kreuzpräsentation zu induzieren. Daher wurde ein *in vivo* Zytotoxizitäts-Assay durchgeführt, bei dem die rekombinanten Proteine in unterschiedlichen Mengen (1-10-100 pmol) mit gleicher Menge CpG (5  $\mu$ g) zur

Immunisierung verwendet wurden. Bei gleichen Mengen an rekombinantem Protein konnte kein signifikanter Vorteil des mtubHsp70-Anteils im Fusionsprotein festgestellt werden (Abbildung 4-30). Es konnte bei der Kombination von 10 pmol Fusionsprotein und CpG noch Zytotoxizität, jedoch nicht mehr bei 1 pmol Fusionsprotein festgestellt werden. Die rekombinanten Proteine mtubHsp70-OVA und rOVA schienen also gleich stark die Kreuzpräsentation induzieren zu können.



**Abbildung 4-30: Titration von mtubHsp70-OVA und rOVA im *in vivo* Zytotoxizitäts-Assay**

Naive Mäuse wurden mit den angegebenen Mengen an CpG und Fusionsprotein subkutan in beide Arme immunisiert. Eine Woche später wurde die spezifische Lyse von S8L-beladenen Zielzellen in den drainierenden Lymphknoten gemessen. Die Titration zeigte keine effizientere Immunantwort durch mtubHsp70-OVA im Vergleich zu rOVA.

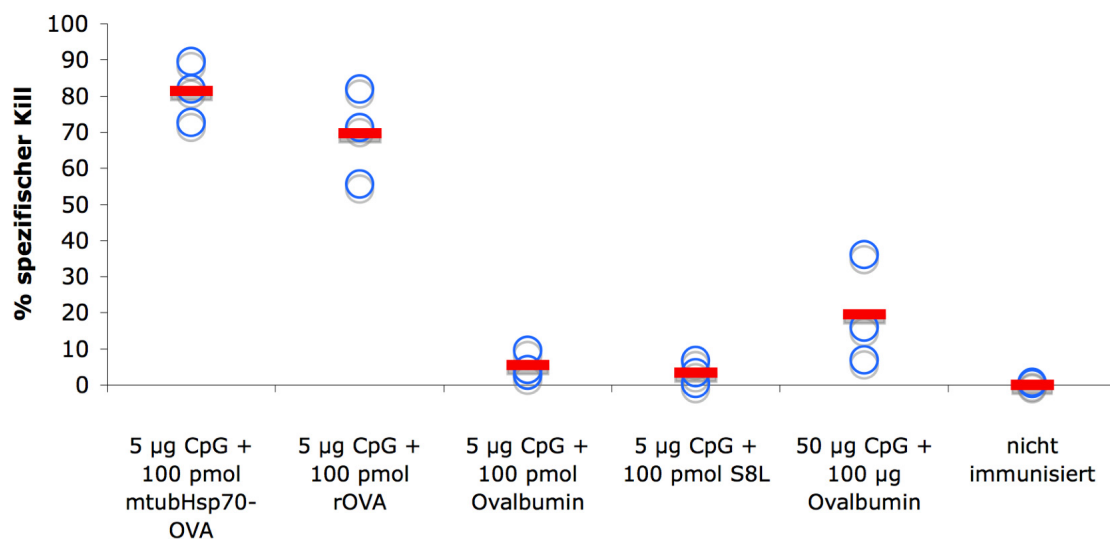
**Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass sowohl im *in vivo* Zytotoxizitäts-Assay als auch in Tumorversuchen kein signifikanter Unterschied zwischen dem Endotoxin-freien mtubHsp70-OVA und dem Endotoxin-freien rOVA-Fragment zu beobachten waren.**

#### 4.5.2. Vergleich der Fusionsproteine mit nativem Ovalbumin

Die oben beschriebenen Resultate, die eine gleich starke immunstimulatorische Funktion von mtubHsp70-OVA und rOVA ergaben, waren unerwartet, da Ovalbumin nicht als besonders immunstimulatorische Antigen angesehen wird (Suzue et al., 1997). Auch in Abbildung 4-23 und Abbildung 4-26 konnte bei einer 23-fach niedrigeren Antigenmenge

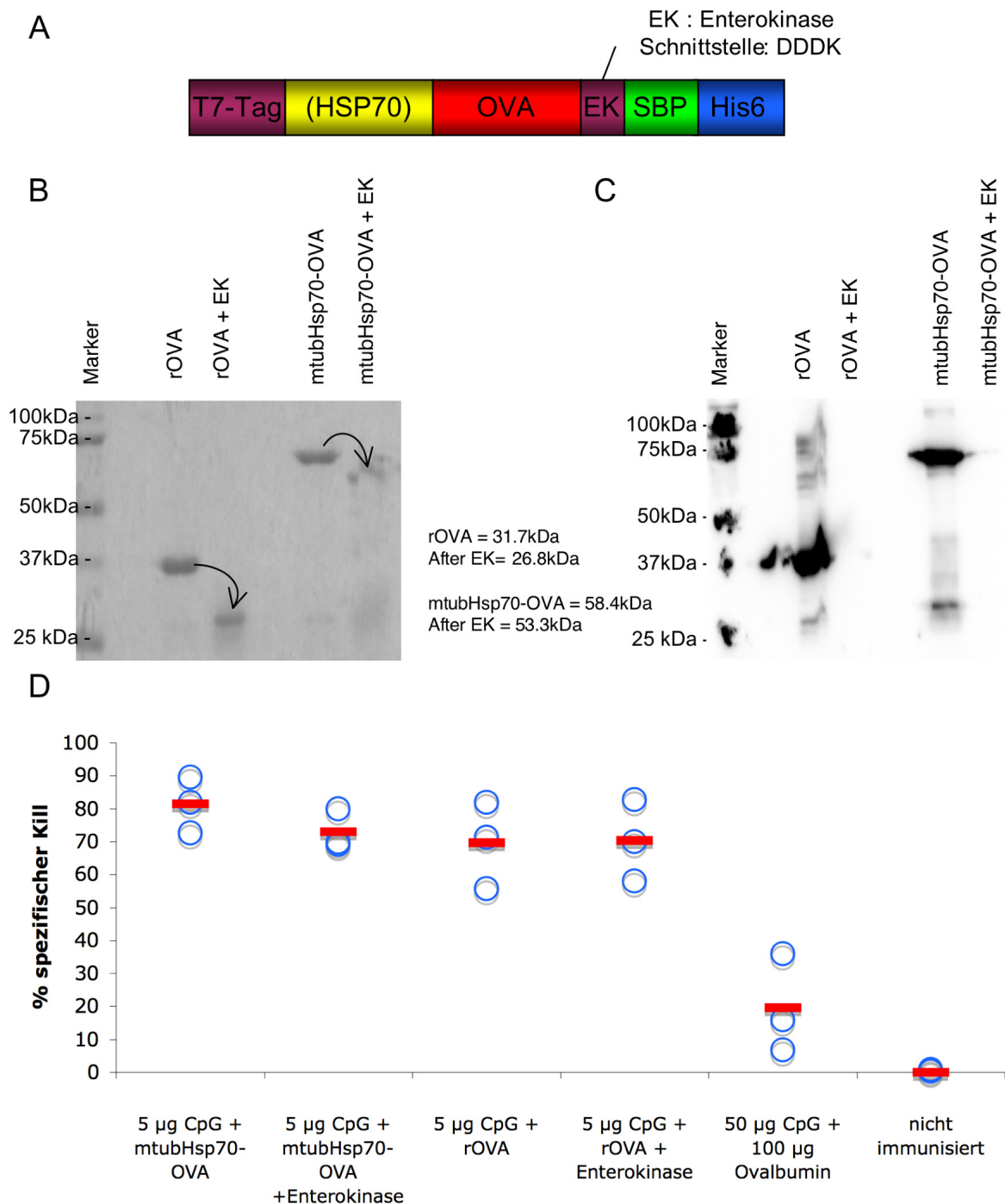
von mtubHsp70-OVA im Vergleich zu kommerziell erhältlichem Ovalbumin (und teilweise kleineren Mengen CpG) eine stärkere Immunantwort gemessen werden. Daher stellte sich die Frage, ob bei äquimolaren Mengen an Antigen sich das aus Hühnereiweiß gereinigte, native Ovalbumin ähnlich wie rOVA und mtubHsp70-OVA verhält. Diese Frage wurde in einem *in vivo* Zytotoxizitäts-Assay untersucht. Zudem wurde die proteininduzierte Antwort mit der durch das S8L-Peptid ausgelösten Antwort verglichen. Alle Immunisierungen erfolgten in Gegenwart von 5 µg CpG.

Bei äquimolarer Menge an Antigen konnten nur die beiden rekombinanten Proteine eine (sehr starke) Zytotoxizität hervorrufen, während natives Ovalbumin und das OVA-Peptid S8L keine oder nur eine schwache Zytotoxizität induzierten. Dieses Ergebnis lässt den Schluss zu, dass selbst nach Endotoxin-Abreicherung ein gravierender Unterschied zwischen rOVA und dem nativen Ovalbumin bestand. Naheliegend war zunächst die Vermutung, dass dieser Unterschied mit den zur Aufreinigung verwendeten, zusätzlichen Sequenzen in den rekombinanten Fusionsproteinen zusammenhing. Diese könnten theoretisch antigene Eigenschaften bzw. immunstimulatorische Fähigkeiten haben oder die Kreuzpräsentation induzieren.



**Abbildung 4-31: Vergleich von nativem und rekombinantem Ovalbumin**

Naive Mäuse wurden subkutan in beide Arme immunisiert und eine Woche später die spezifische Lyse von S8L-beladenen Zielzellen in den drainierenden Lymphknoten gemessen. Die rekombinanten Proteine mtubHsp70-OVA und rOVA induzierten eine sehr starke Zytotoxizität, während das kommerziell erhältliche Ovalbumin und das OVA-Peptid S8L in äquimolarer Menge keine signifikante Zytotoxizität hervorriefen.



**Abbildung 4-32: Entfernung der C-terminalen tags und Auswirkung auf die Immunantwort**

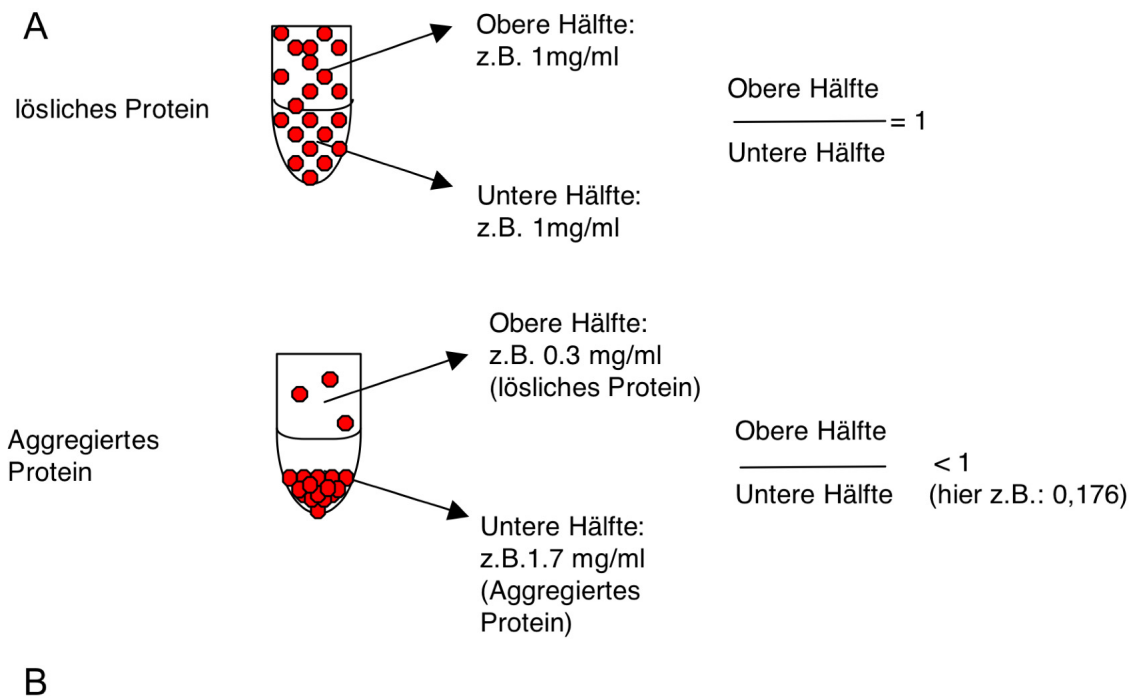
(A) Übersicht des Aufbaus der Fusionsproteine und Lage der Enterokinase-Schnittstelle. (B) Coomassie-Färbung vor und nach dem Verdau von rOVA und mtubHsp70-OVA mit Enterokinase. (C) Western Blot gegen den His6-tag vor und nach dem Verdau von rOVA und mtubHsp70-OVA mit Enterokinase. Im Falle des Verdau war kein Signal für den His6-tag mehr zu entdecken. (D) *In vivo* Zytotoxizitäts-Assay von rOVA und mtubHsp70-OVA mit und ohne den C-terminalen tag. 100 pmol Fusionsprotein wurden in Kombination mit 5 µg CpG zur Immunisierung eingesetzt.

Um die Möglichkeit zu eruieren, dass die für die hier beobachteten Immunantworten die flankierenden Sequenzen der rekombinanten Proteine verantwortlich waren, wurde der C-terminale SBP- und His6-tag per Enterokinaseschnitt entfernt (Abbildung 4-32A-C).

Die vollständige Entfernung der C-terminalen tags wurde mittels Coomassie-Färbung (Abbildung 4-32B) und Western Blot mit His6-tag-Antikörper bestätigt (Abbildung 4-32C). Diese gekürzten rOVA und mtubHsp70-OVA Versionen wurden nun in einem *in vivo* Zytotoxizitäts-Assay mit den vollständigen Fusionsproteinen verglichen (Abbildung 4-32D). Es konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den Enterokinase-verdauten und nicht verdauten Fusionsproteinen festgestellt werden. Daher kann ein Einfluß der C-terminalen tags ausgeschlossen werden. Der N-terminale T7-tag konnte enzymatisch nicht abgetrennt werden.

Daher wurde eine andere Möglichkeit zur Erklärung des Unterschiedes zwischen rOVA und kommerziell erhältlichem Ovalbumin in Erwägung gezogen: Der Aggregationszustand. Es ist bekannt, dass Hitze-aggregiertes Antigen bis zu 30 mal effizienter im Hervorrufen von Immunantworten als natives Protein sein kann (Johansen et al., 2005; Speidel et al., 1997). Um dies zu untersuchen, wurden zwei verschiedene Methoden angewandt: Zentrifugation und die native Gelelektrophorese der Proteine.

Abbildung 4-33A zeigt die Theorie des Einflusses der Proteinaggregation auf die Proteinansammlung nach einer Zentrifugation (1 h bei 13200 Upm, entspricht 16110 g). Bei löslichem Protein verändert sich nach der Zentrifugation die Lage der Proteine nicht, und die Proteinkonzentrationen sind in der oberen und unteren Hälfte des Röhrchens gleich. Bei aggregierten Proteinen sammeln sich die Proteine nach Zentrifugation in der unteren Hälfte an, und der Quotient von Proteinkonzentrationen der oberen Hälfte durch die untere Hälfte ist kleiner eins. Kommerziell erhältliches Ovalbumin zeigte nach Abzentrifugieren ein Verhältnis von oben zu unten gleich 1, während nach der Aggregation durch Erhitzen dieses Verhältnis sich auf 0,47 veränderte. Im Gegensatz dazu war bei rOVA vor und nach der Aggregation durch Erhitzen ein Verhältnis  $< 1$  zu beobachten. Dies lässt den Schluss nahe, dass die rekombinanten Fusionsproteine stark aggregiert und daher sedimentierbar sind.

**B**

Protein	Ovalbumin	Ovalbumin erhitzt	rOVA	rOVA erhitzt
Quotient obere/untere Hälfte	0.98	0.47	0.48	0.40

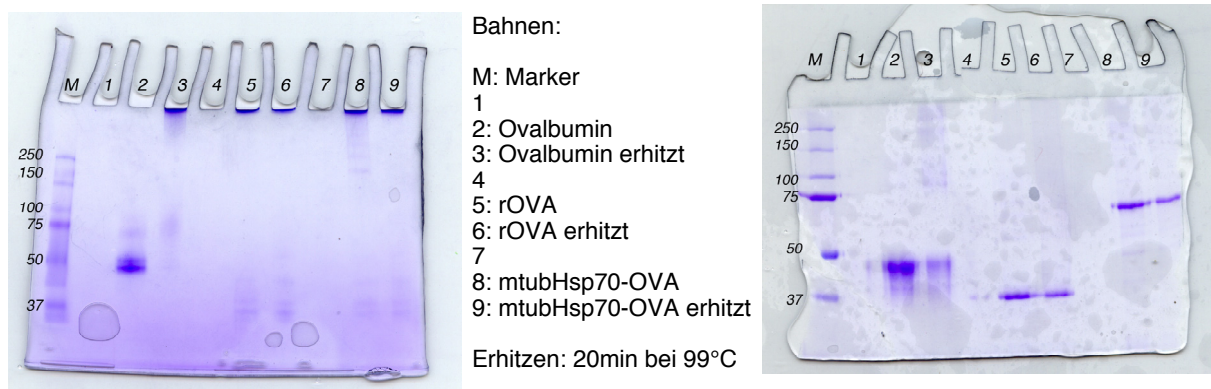
**Abbildung 4-33: Zentrifugation von löslichen und aggregiertem Protein**

(A) Theorie der Methode. Nach Zentrifugation (1h, 13200 Upm), verteilen sich lösliche Proteine gleichmäßig (Quotient oben/unten = 1), während aggregierte Proteine sich eher in der unteren Hälfte des Reaktionsgefäßes ansammeln (Quotient unten/oben < 1). (B) Ergebnisse der Proteinbestimmung als Verhältnis von oben/unten, Kommerziell erhältliches Ovalbumin und rekombinantes OVA (rOVA) wurden, direkt oder erst für 20 min bei 99 °C erhitzt, abzentrifugiert.

Dies wurde nun mittels nativer Gelelektrophorese überprüft. Bei der nativen PAGE werden die Proteine nach ihrer tatsächlichen Größe und Ladung aufgetrennt. Aggregierte Proteine können ihrer Größe wegen nur soweit wandern, wie es das gesamte Molekulargewicht des Aggregates zulässt. In der SDS-PAGE werden die Proteine währenddessen durch die SDS-Denaturierung als Einzelmoleküle aufgetrennt.

Alle Hitze-aggregierten Proteine (Ovalbumin, rOVA und mtubHsp70-OVA) zeigten im nativen PAGE (Abbildung 4-34A) ihre Aggregatsgröße. Diese war sogar so groß, dass diese aggregierten Proteine kaum in das native Gel einliefen und sich kurz unterhalb der Tasche sammelten. Das gleiche gilt auch für nicht Hitze-aggregiertes rOVA und mtubHsp70-OVA, die also einen hohen Aggregationsgrad aufwiesen. Ausschliesslich kommerziell erhältliches, natives Ovalbumin lag als Monomer vor und zeigte eine Bande,

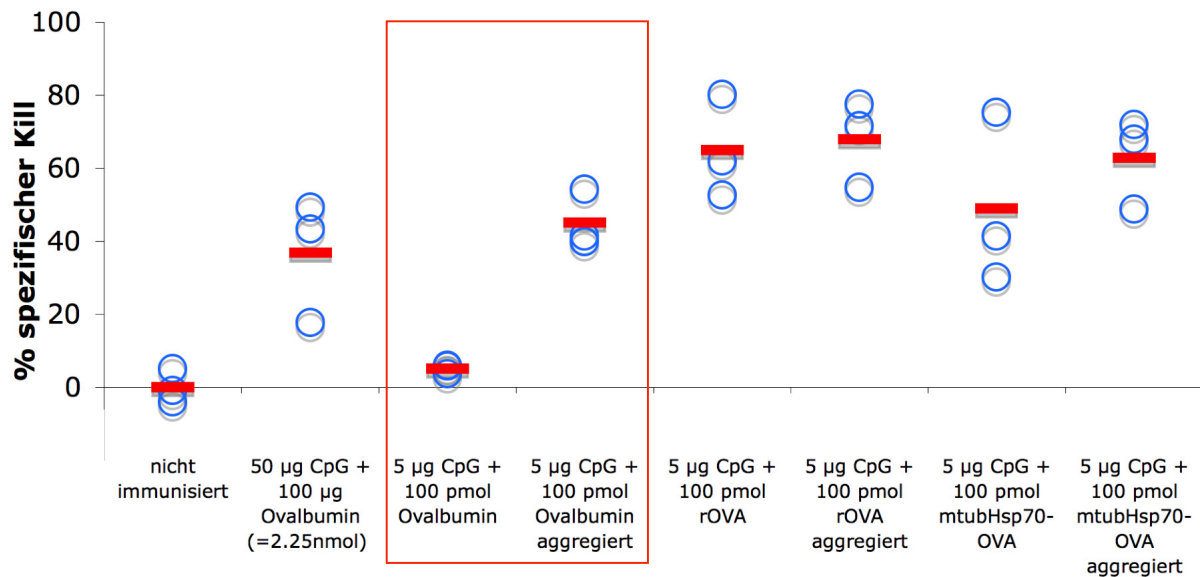
die mit dem erwarteten Molekulargewicht übereinstimmt. Abbildung 4-34B zeigt die Analyse der gleichen Präparate im SDS-PAGE. Jedes Protein zeigt hier eine Bande, die mit dem erwarteten Molekulargewicht des jeweiligen Proteins übereinstimmt. Das Laufverhalten war im SDS-PAGE durch seine starken denaturierenden Eigenschaften also unabhängig vom ursprünglichen Aggregationszustand.



**Abbildung 4-34: Native PAGE zur Untersuchung des Aggregationszustandes der Fusionsproteine**

Kommerziell erhältliches Ovalbumin aus Hühnereiweiß und die rekombinanten Proteine rOVA und mtubHsp70-OVA wurden direkt oder erhitzt (20min bei 99 °C) im nativen PAGE (A) oder SDS-PAGE (B) mittels Coomassie-Färbung untersucht. (A) nur lösliches Ovalbumin ist nach nativer PAGE im Gel sichtbar. Alle anderen Präparationen konnten durch ihre Aggregation nicht in das Gel einlaufen. (B) Analyse der gleichen Proteine im SDS-PAGE. Alle Proteine zeigen eine Bande, die mit dem Molekulargewicht korrespondiert.

Dieser klare Hinweis auf eine starke Aggregation der Fusionsproteine legt die Vermutung nahe, dass eine erzwungene Aggregation (z.B. durch Hitze), wie schon in der Literatur beschrieben (Speidel et al., 1997), eine starke Immunantwort auslösen kann. Aus diesem Grund wurde Ovalbumin erhitzt und nicht erhitzt im *in vivo* Zytotoxizitäts-Assay untersucht. Zudem wurde überprüft, ob die ohnehin schon starke Immunantwort von rOVA und mtubHsp70-OVA durch weitere Hitze-Aggregation noch erhöht werden konnte. Alle diese Immunisierungen erfolgten in Gegenwart von 5 µg CpG.



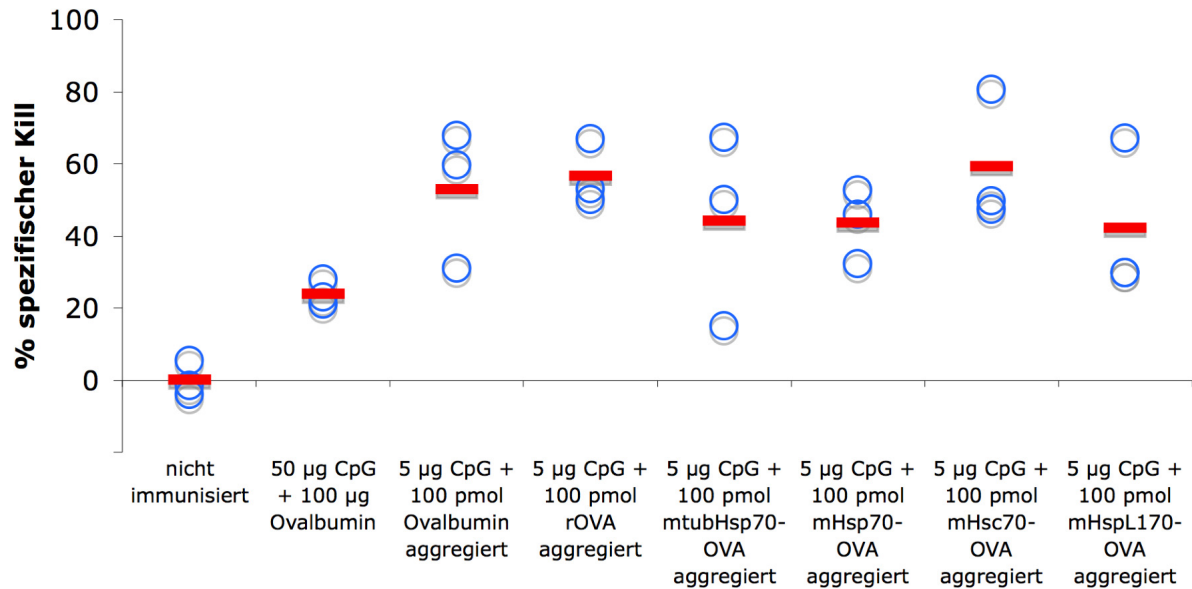
**Abbildung 4-35: Vergleich der aus Hitze-Aggregation resultierenden Zytotoxizität**

100 pmol Ovalbumin, rOVA und mtubHsp70-OVA wurden entweder direkt in Kombination mit 5 µg CpG oder nach Hitze-Aggregation (20 min bei 99°C) auch mit 5 µg CpG subkutan in beide Arme von nativen Mäusen gespritzt. Eine Woche später wurde die spezifische Lyse von S8L-beladenen Zielzellen in den drainierenden Lymphknoten bestimmt. Während die Hitze-Aggregation der beiden rekombinanten Proteine kaum Einfluß auf die Zytotoxizität hatte, konnte die Hitze-Aggregation von Ovalbumin die Zytotoxizität ausgehend von fast 0% auf das Niveau der rekombinanten Proteine bringen (roter Kasten).

Die Hitze-Aggregation der beiden rekombinanten Proteine rOVA und mtubHsp70-OVA resultierte in keiner signifikanten Zunahme der Zytotoxizität (Abbildung 4-35). Im Gegensatz dazu konnte die Hitzebehandlung von 100 pmol Ovalbumin die Zytotoxizität von fast 0% auf ein ähnliches Niveau wie die rekombinanten Proteine bringen (50-60%, roter Kasten, Abbildung 4-35). Diese Ergebnisse bestätigten die Vermutung, dass die rekombinanten Proteine stark aggregiert sind und können daher den oben beschriebenen Unterschied von rOVA und löslichen Ovalbumin gut erklären.

Auch die anderen aus *E.coli* gereinigten Fusionsproteine (mHsp70-OVA, mHsc70-OVA und mHsp70L1-OVA) waren stark aggregiert (Daten nicht gezeigt). Um einen besseren Vergleich der Hsp70-OVA-Fusionsproteine zu haben, musste erst ein unterschiedlicher Aggregationsgrad ausgeschlossen werden. Daher wurden für den folgenden Versuch die zu untersuchenden Proteine zunächst durch Hitze aggregiert (20 min bei 99 °C) und in Kombination mit 5 µg CpG injiziert.





**Abbildung 4-36: Vergleich von Hitze-aggregierten Fusionsproteinen**

Vor der Immunisierung wurden alle Proteine Hitze-aggregiert (20 min bei 99 °C) und 100 pmol in Kombination mit 5 µg CpG subkutan in beide Arme von naiven Mäusen immunisiert. Hiervon ausgenommen blieb die Positivkontrolle 50 µg CpG und 100 µg Ovalbumin. Eine Woche später wurde die spezifische Lyse von S8L-beladenene Zielzellen in den drainierenden Lymphknoten bestimmt. Alle aggregierten Proteine zeigten eine sehr ähnliche Zytotoxizität.

Auch in diesem Versuch zeigte die Hitze-Aggregation von Ovalbumin eine vergleichbare, sehr starke *in vivo* Zytotoxizität wie die aggregierten Fusionsproteine (Abbildung 4-36). Alle Fusionsproteine zeigten zudem eine sehr ähnliche Zytotoxizität und konnten durch die nunmehr geringen Unterschiede nicht in eine Rangfolge geordnet werden wie es ohne zusätzliche Aggregation möglich war (Abbildung 4-24). Auch war die Zunahme der Zytotoxizität durch Hitze-Aggregation der Fusionsproteine nicht so dramatisch wie bei nativem Ovalbumin (Abbildung 4-24, Abbildung 4-35 und Abbildung 4-36). Daher kann bei allen fünf rekombinanten Proteinen (rOVA, mtubHsp70-OVA, mHsp70-OVA, mHsc70-OVA und mHsp70L1-OVA) von einer recht starken Aggregation ausgegangen werden, die vermutlich den Immunisierungserfolg beeinflussten.

**Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass Endotoxin-freies rekombinantes OVA genauso immunogen wie mtubHsp70-OVA war. Jedoch war dies nicht der Fall für natives Ovalbumin aus Hühnereiweiß. Die starke Immunogenität der rekombinanten Fusionsproteine korrelierte mit einer starken Proteinaggregation.**

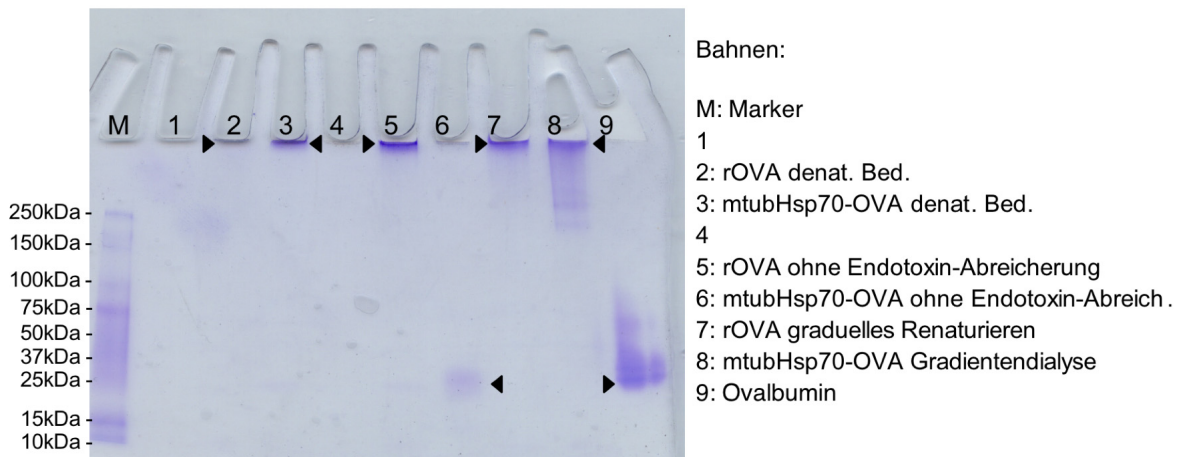
#### **4.6. Herstellung und Analyse von nativen Fusionsproteinen**

Aus dem hohen Aggregationsgrad der Fusionsproteine resultierten möglicherweise starke Immunantworten, die die immunogenen Eigenschaften der rekombinanten Proteine in vereinzelter Form nur bedingt widerspiegeln. Durch die Aggregation verhielt sich rOVA anscheinend genauso immunogen wie die Fusionsproteine mit dem Hsp70-Anteil. Zudem wirkte rOVA wesentlich immunogener als lösliches Ovalbumin. Um Auswirkungen der Aggregation zu studieren, wurden mehrere Methoden evaluiert, um nicht aggregiertes Fusionsprotein zu produzieren.

Zuerst wurde überprüft, ob die Endotoxin-Abreicherung einen Einfluß auf die Aggregation der Fusionsproteine hatte. Hierzu wurden die Proteine unter denaturierenden Bedingungen aufgereinigt, nur der Detergenzien-Waschschritt wurde ausgelassen. Abbildung 4-37 zeigt, dass nur mtubHsp70-OVA-Moleküle, aber nicht rOVA-Moleküle, nach einer Aufreinigung ohne Endotoxin-Abreicherung löslich waren. Zwar wurden keine Banden entsprechend dem Molekulargewicht des Fusionsproteins mtubHsp70-OVA gefunden, dies ist aber durch die Tatsache erklärbar, dass neben der Auftrennung nach dem Molekulargewicht auch die Proteinladung im Nativ-PAGE ausschlaggebend ist. Die Aufreinigung ohne Endotoxin-Abreicherung deutet auf eine Aggregation für rOVA hin, da rOVA nur knapp unterhalb der Tasche zu detektieren war. Die Endotoxin-Abreicherung war aber unablässlich für die Untersuchungen der durch den Hsp70-Anteil der Fusionsproteine induzierten Stimulation des Immunsystems. Daher wurde versucht, die Löslichkeit der Fusionsproteine auf anderem Wege zu verbessern.

Zuerst wurde die Auswirkung einer Renaturierung der an die Ni-NTA-Agarose gebundenen, denaturierten Fusionsproteine durch Waschen mit PBS (Udono et al., 2004) untersucht. Es wurde versucht, durch sinkende Harnstoffkonzentrationen das Fusionsprotein (hier rOVA) langsam auf der Säule in PBS zu renaturieren. Diese langsame Renaturierung blieb erfolglos (Abbildung 4-37). Alternativ wurde mtubHsp70-OVA unter denaturierenden Bedingungen in 8 M Harnstoff eluiert und dann schrittweise gegen immer niedrigere Harnstoffkonzentrationen dialysiert. Obwohl teilweise niedermolekulare Banden

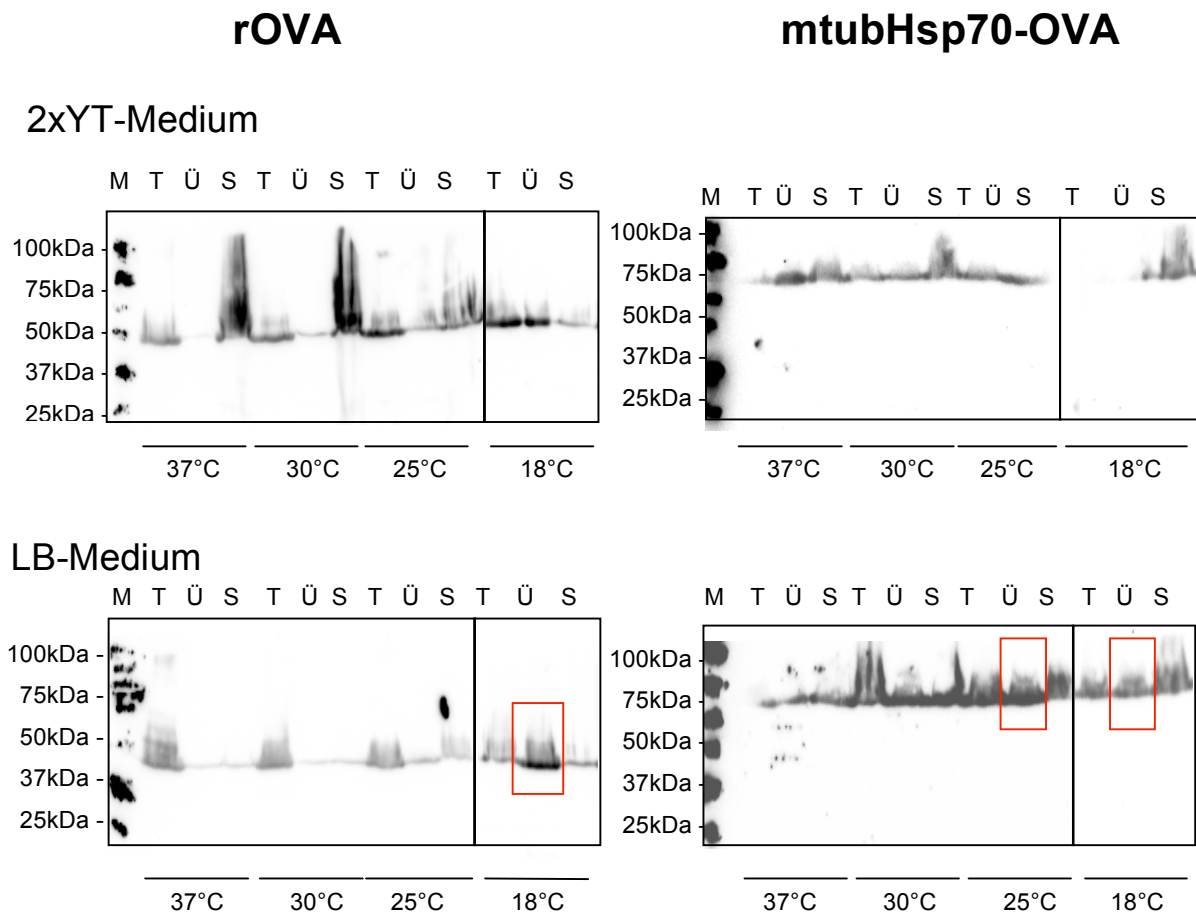
beobachtet wurden, konnte keine Bande beobachtet werden, die ähnlich weit wie nicht Endotoxin-abgereichertes mtubHsp70-OVA (Abbildung 4-37) ins Gel lief.



**Abbildung 4-37: Verschiedene Bedingungen zur Aufreinigung von löslichen Protein**

Nativ-PAGE der aggregierten Proteine rOVA und mtubHsp70-OVA, die unter denaturierenden Bedingungen aufgereinigt wurden. Zudem werden die Eluate verschiedener Aufreinigungsmethoden gezeigt. Nur mtubHsp70-OVA ohne Endotoxin-Abreicherung erscheint löslich. Detektierbare Proteinbanden sind mit einem Pfeil gekennzeichnet.

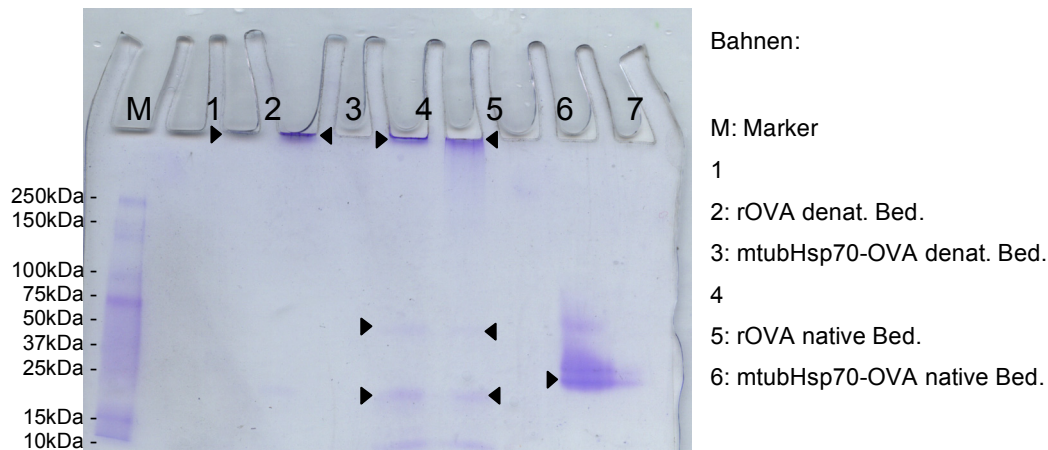
Daher wurde eine Aufreinigung unter nativen Bedingungen in Erwägung gezogen. Zunächst galt es, diejenigen Expressionsbedingungen zu bestimmen, bei denen die größten Mengen an löslichem Fusionsprotein entstehen. Dazu wurde die Expression von rOVA und mtubHsp70-OVA bei verschiedenen Temperaturen und in zwei verschiedenen Medien (LB und 2xYT) untersucht. Die größte Menge an löslichen Proteinen konnte bei rOVA und mtubHsp70-OVA bei einer Expression über Nacht bei 18 °C unter Verwendung von LB-Medium gefunden werden (Abbildung 4-38). Daher wurde die Expression unter diesen Bedingungen durchgeführt und die beiden Proteine anschliessend unter nativen Bedingungen aufgereinigt. Abbildung 4-39 zeigt die eluierten und dialysierten Proteine, die unter diesen Bedingungen hergestellt wurden. Die mit dieser Methode aufgereinigten Proteine konnten in das Gel diffundieren und zeigten Banden auf vergleichbarer Höhe wie lösliches mtubHsp70-OVA ohne Endotoxin-Abreicherung (Abbildung 4-37) bzw. natives Ovalbumin (Abbildung 4-37). Zwar erschien eine kleine Fraktion der Proteinlösung aggregiert, jedoch konnte die Mehrheit der Proteinlösung in das Gel diffundieren. Auch die Endotoxin-Kontaminationen der Präparate waren in einem akzeptablen Bereich. Für mtubHsp70-OVA entsprach sie 7.07 EU/mg und für rOVA 29.98 EU/mg.



**Abbildung 4-38: Testexpression für die Aufreinigung unter nativen Bedingungen**

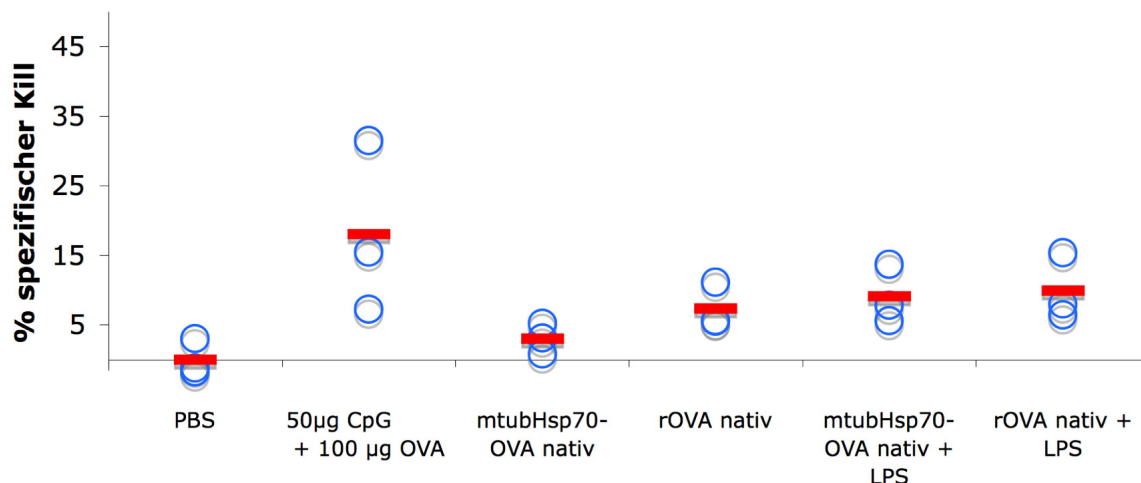
Die Expression von löslichem Protein wurde für die beiden Proteine rOVA und mtubHsp70-OVA bei verschiedenen Temperaturen und verwendeten Medien untersucht. Dafür wurden die Kulturen 4 h (37 und 30 °C) bzw. 12 h (25 und 18 °C) nach Expressionsinduktion mit IPTG geerntet und unter nativen Bedingungen lysiert. Nach Zentrifugation (20 min, 13200 UPM, Tischzentrifugation) wurde ein Western Blot des Überstandes, Sediment und Lysat der einzelnen Testkulturen angefertigt. Zur Detektion der Fusionsproteine wurde Streptavidin-Peroxidase verwendet. Die roten Kästen zeigen das Auftreten des Fusionsprotein im Überstand. M = Marker, T = Total, Ü = Überstand, S= Sediment.

Daher wurde entschieden, diese unter nativen Bedingungen hergestellten Fusionsproteine für einen *in vivo* Zytotoxizitäts-Assay zu verwenden. 100 pmol dieser unter nativen Bedingungen aufgereinigten Fusionsproteine wurden allein oder in Kombination mit 0,5 µg LPS subkutan in beide Arme von nativen Mäusen gespritzt. Keine der Immunisierungen resultierte in starker Zytotoxizität (Abbildung 4-40). Auch die Kombination mit LPS führt zu keiner starken Zytotoxizität. Eine solche Zunahme wurde früher mit gp96 beobachtet (Warger et al., 2006). Zwar ließ sich eine kleine Zunahme durch die Kombination mit LPS beobachten, diese war aber nur für mtubHsp70-OVA signifikant (T-Test:  $p < 0,05$ ).



**Abbildung 4-39: Aufreinigung von rOVA und mtubHsp70-OVA unter nativen Bedingungen**

Natives PAGE der unter denaturierenden Bedingungen und nativen Bedingungen aufgereinigten Proteine rOVA und mtubHsp70-OVA. Detektierbare Proteinbanden sind mit einem Pfeil gekennzeichnet.



**Abbildung 4-40: *In vivo* Zytotoxizitäts-Assay von nativ aufgereinigten Fusionsproteine**

Mäuse wurden mit Endotoxin-abgereicherten, unter nativen Bedingungen aufgereinigten Proteinen subkutan immunisiert. Zudem wurden Mäuse zweier Gruppen mit diesen Proteinen in Kombination mit 0,5 µg LPS immunisiert. Eine Woche später wurde die spezifische Lyse von S8L-beladene Zielzellen in den drainierenden Lymphknoten bestimmt. Die so aufgereinigten rekombinanten Proteine induzierten keine starke Zytotoxizität.

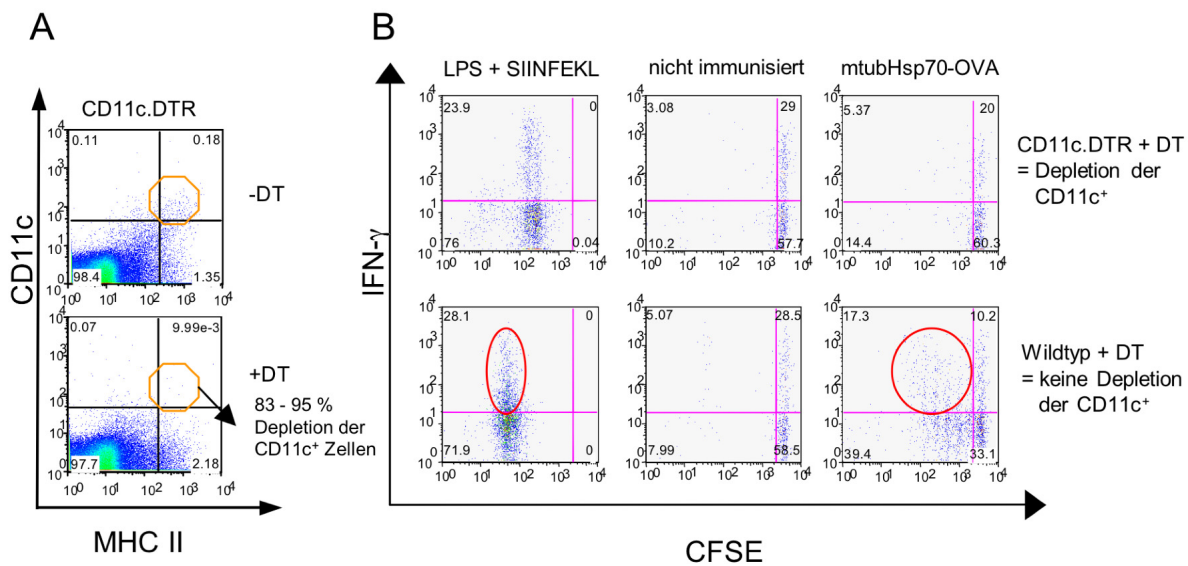
**Zusammenfassend konnte durch modifizierte Expressionsbedingungen sowie eine Lyse und Aufreinigung unter nativen Bedingungen Monomer-Fusionsproteine hergestellt werden. Diese Endotoxin-abgereicherten, nativen Fusionsproteine induzierten nur geringe zytotoxische Aktivität der CD8<sup>+</sup> T-Zellen. Auch eine Präinkubation des weniger aggregierten mtubHsp70-OVA Fusionsproteins mit LPS führte zu keiner Rekonstitution der Immunogenität.**

#### **4.7. Abhängigkeit der durch Hsp70-OVA induzierten Kreuzpräsentation von DC und deren Aktivierung durch Hsp70-OVA-Fusionsproteine**

Ein weiteres Ziel der vorliegenden Arbeit war die Analyse der HSP-induzierten Stimulation von dendritischen Zellen sowie deren Auswirkung auf die Kreuzpräsentation.

##### 4.7.1 Die Hsp70-OVA-induzierte Kreuzpräsentation wird primär durch dendritische Zellen *in vivo* ausgeführt.

In der Literatur sind verschiedene Zelltypen bekannt, die durch HSP aktiviert werden können und die dadurch zur Kreuzpräsentation eines an HSP gebundenen Antigens beitragen könnten. Dazu gehören neben DC auch Makrophagen und B-Zellen (Srivastava, 2002a; Tobian et al., 2005). Um die Rolle der dendritischen Zellen zu untersuchen, wurde eine CD11c.DTR Mauslinie verwendet, in der spezifisch die CD11c<sup>+</sup> DC durch Injektion von Diphtherie-Toxin (DT) depletiert werden können, ohne die anderen Zellpopulationen signifikant zu beeinflussen (Jung et al., 2002). Für diesen Versuch wurden zuerst die DC depletiert und einen Tag später MACS-aufgereinigte und CFSE-gefärbte OT-I T-Zellen adoptiv transferiert. Wenige Stunden später wurden die Mäuse dann immunisiert und die resultierende Aktivierung der OT-I T-Zellen 3 Tage später nach einer *in vitro* Restimulation der Milzzellen mit S8L im FACS analysiert. Um die Depletion der DC sicher zu stellen, wurden die Mäuse einen Tag nach dem adoptiven Transfer nochmals mit DT behandelt. Abbildung 4-41A zeigt die Depletion der CD11c<sup>+</sup> DC am Tag der Analyse, welche zwischen 83-95 % lag. Da bei wiederholter Gabe von Diphtherie-Toxin die CD11c.DTR Mäuse sterben, musste die Analyse der OT-I Zellen schon am Tag 3 nach der Immunisierung erfolgen. Parallel hierzu wurde der Versuch auch in Wildtyp-Mäusen durchgeführt, die ebenfalls mit DT behandelt wurden. Da diesen Wildtyp-Mäusen der Diphtherie-Toxin-Rezeptor fehlt, hatte die Behandlung mit Diphtherie-Toxin keine nennenswerte toxische Auswirkung.



**Abbildung 4-41: CD11c<sup>+</sup> DC sind *in vivo* für die Kreuzpräsentation von HSP-gebundenen Antigenen verantwortlich**

Die Aktivierung von adoptiv transferierten, CFSE-makierten OT-I T-Zellen wurde in CD11c<sup>+</sup> depletierten (CD11c.DTR) und nicht depletierten Mäusen (Wildtyp) untersucht. (A) Depletion der CD11c<sup>+</sup> DC am Tag der Analyse. (B) Während die Stimulation von spezifischen Peptid SIINFEKL und LPS in beiden Fällen OT-I T-Zellen aktivieren konnten, war dies bei mtubHsp70-OVA nur in Gegenwart von DC möglich. DT = Diphtherie-Toxin. Die Daten sind repräsentativ für 2 Mäuse pro Gruppe.

Die Stimulation mit 250  $\mu$ g SIINFEKL-Peptid plus 50  $\mu$ g LPS konnte in den nicht depletierten Wildtyp-Mäusen und in den DC-depletierten CD11c.DTR-Mäusen die OT-I T-Zellen aktivieren und zur Proliferation und IFN- $\gamma$ -Produktion anregen (Abbildung 4-41B). Diese Aktivierung war stärker in den Wildtyp-Mäusen, da die durch CFSE-Verdünnung erkennbare Proliferation stärker vorangeschritten erscheint. Diese Beobachtung lässt den Schluß zu, dass DC bei der Peptid/LPS-Aktivierung von OT-I T-Zellen eine wichtige Funktion haben, aber nicht unbedingt nötig sind. Andere APC, wie z.B. B-Zellen, könnten das Peptid binden und die OT-I Zellen ausreichend aktivieren. Eine andere Erklärung für diese Beobachtung ist die Möglichkeit, dass die wenigen, nicht depletierten CD11c<sup>+</sup> DC (5-17%) ausreichen, um die OT-I Zellen zu aktivieren. Nicht immunisierte Mäuse zeigten in beiden Fällen keine Aktivierung der OT-I Zellen. OT-I T-Zellen konnten nur in Gegenwart von DC durch 100 pmol mtubHsp70-OVA aktiviert werden. Dieses Experiment wurde einmal mit Endotoxin-kontaminiertem und einmal mit Endotoxin-freiem mtubHsp70-OVA und mHsp70-OVA durchgeführt. Die Aktivierung der OT-I T-Zellen war für alle Präparate gleichmässig abhängig von der Anwesenheit der DC, unabhängig von der Endotoxin-Kontamination oder vom Aggregationsgrad (Daten nicht gezeigt).

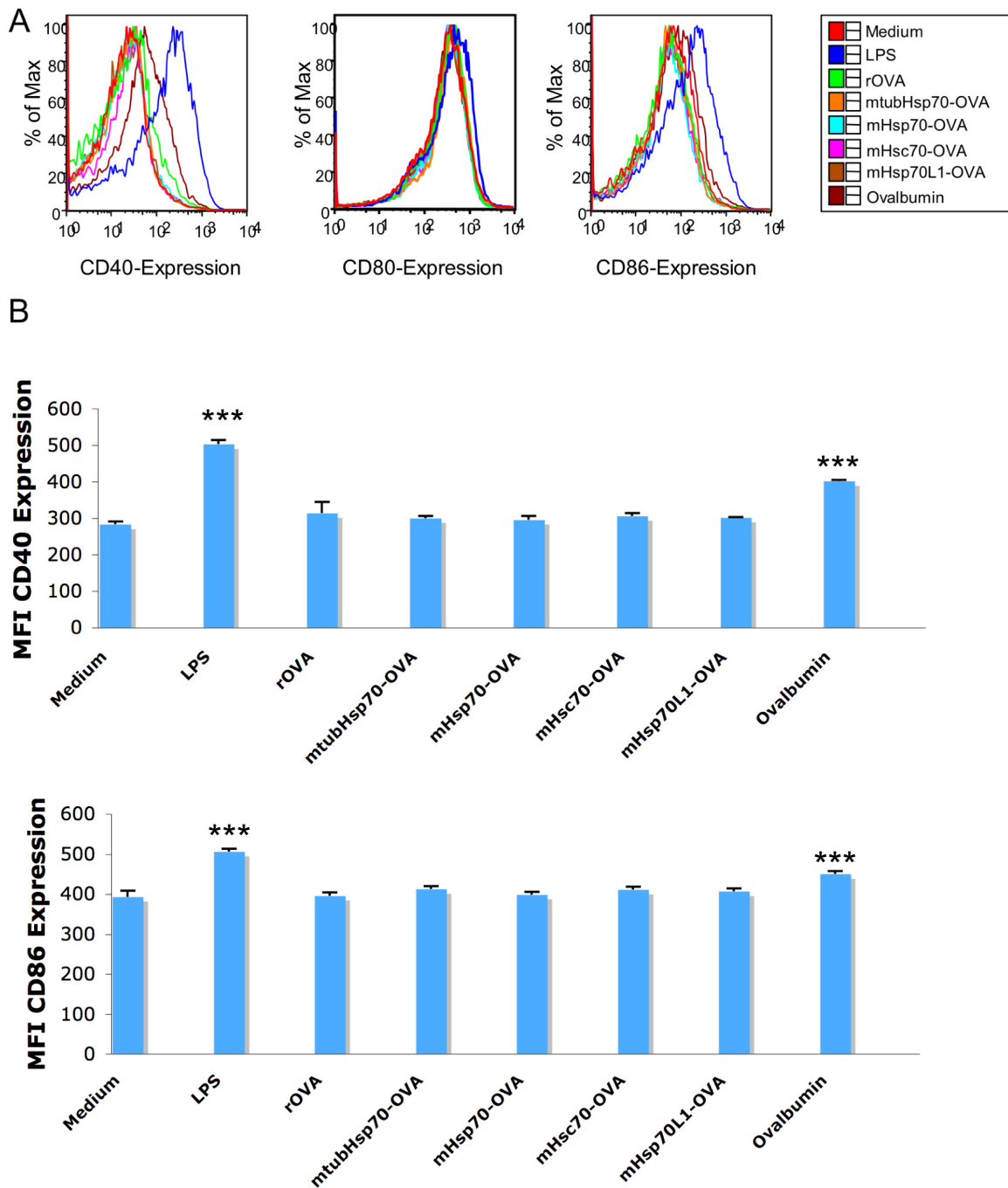
#### 4.7.2. Aktivierung von BMDC durch Hsp70-OVA-Fusionsproteine

Neben der induzierten Kreuzpräsentation durch DC nach Aufnahme von Hsp70-OVA-Fusionsproteinen war auch die DC-Aktivierung von Interesse. Daher wurden Knochenmarks(BM)-DC mit 500 pmol/ml Fusionsprotein 24 h lang inkubiert und dann im FACS auf die Hochregulation von kostimulatorischen Oberflächenmarkern wie CD40, CD80 und CD86 untersucht.

LPS zeigte eine signifikante Erhöhung der CD40- und CD86-Expression gegenüber der nicht stimulierten Gruppe, die im Histogramm und im Vergleich der Mean Fluorescence Intensity (MFI) für die jeweiligen Marker erkennbar sind (Abbildung 4-42A und B). Dies konnte jedoch nicht für CD80 beobachtet werden. Auch Ovalbumin aus Hühnereiweiß induzierte eine ähnliche Aktivierung durch Hochregulation von CD40 und CD86, aber nicht von CD80. Dies kann durch die hohe Endotoxin-Kontamination (100-1000 EU/mg) in den kommerziell erhältlichen Präparaten erklärt werden. Keines der Endotoxin-freien (aggregierten) Fusionsproteine konnte eine signifikante Erhöhung der Expression von CD40, CD80 oder CD86 induzieren.

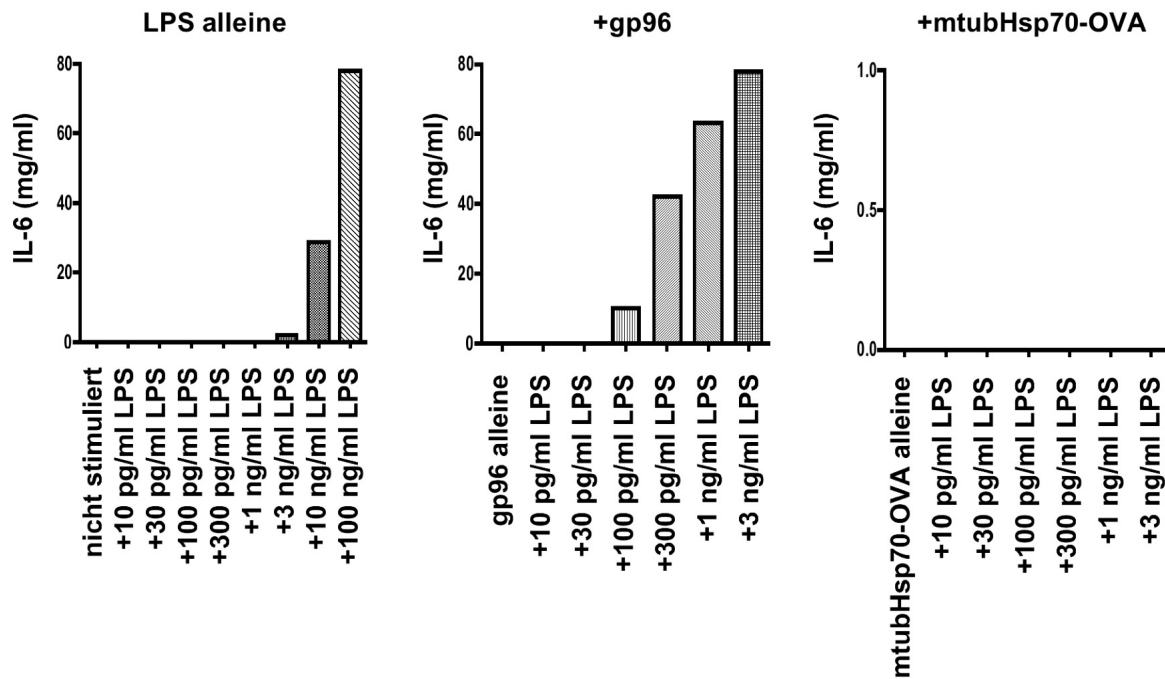
Um methodische Fehler unsererseits auszuschließen, wurde das bisher am vielversprechendste Fusionsprotein mtubHsp70-OVA in einem ähnlichen Versuchsaufbau von unseren Kooperationspartnern am Institut für Immunologie der Universität Mainz (Cathy Srokowski / Prof. H.J. Schild) untersucht. Zudem untersuchte Cathy Srokowski, ob das Wiederbeladen von mtubHsp70-OVA mit LPS in ihrem experimentellen Aufbau möglich war. Hierzu wurden 50 µg/ml Endotoxin-freies (aggregiertes) mtubHsp70-OVA eingesetzt, was ungefähr 850 pmol/ml entspricht. Diese Menge wurde zwei Tage lang mit den BMDC inkubiert. Zum Vergleich wurden die Experimente auch mit dem aus Zellen aufgereinigtem Hitze-Schock-Protein gp96 durchgeführt (Wallin et al., 2002; Warger et al., 2006).





**Abbildung 4-42: Aktivierung von DC durch HSP-OVA-Fusionsproteinen**

BMDC wurden mit 500 pmol/ml Fusionsprotein, 500 pmol/ml Ovalbumin aus Hühnereiweiß (Sigma) oder 1 µg/ml LPS 24 h lang inkubiert und dann auf Expression von CD40, CD80 und CD86 im FACS untersucht. (A) Histogramme der verschiedenen Gruppen und Marker. (B) Darstellung der Expression von CD40 und CD86 durch die Mean Fluorescence Intensity (MFI) für n=3. \*\*\*= p<0.001, durch T-Test im Vergleich zur nicht stimulierten Gruppe bestimmt.



**Abbildung 4-43: Aktivierung von BMDC durch gp96, aber nicht durch mtubHsp70-OVA**

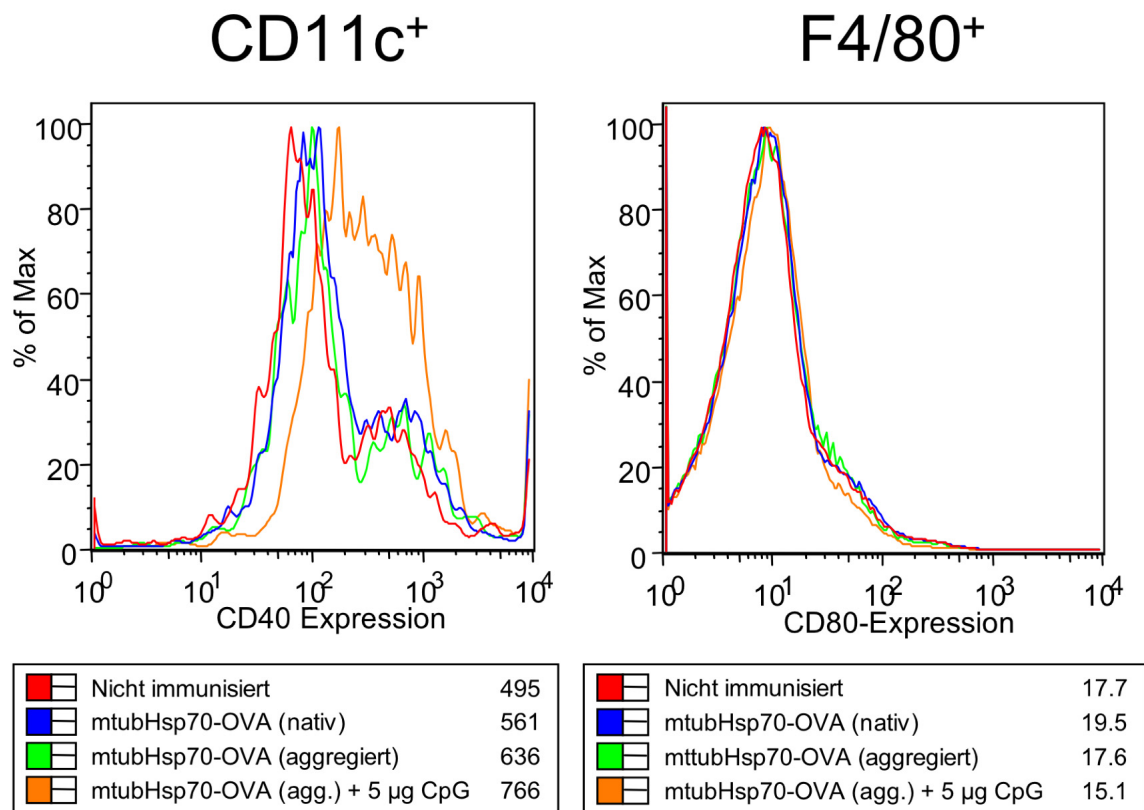
BMDC wurden mit verschiedenen Mengen LPS inkubiert in Gegenwart von 50 µg/ml gp96, 50 µg/ml Endotoxin-freiem (aggregiertem) mtubHsp70-OVA oder Medium und die IL-6-Produktion nach 2 Tagen im Medium per ELISA quantifiziert. Während Endotoxin-freies gp96 mit LPS beladen werden konnte, war dies bei mtubHsp70-OVA nicht möglich.

Endotoxin-freies gp96 oder mtubHsp70-OVA alleine induzierten keine IL-6-Produktion der BMDC (Abbildung 4-43). Jedoch konnte gp96, wie schon von der Schild-Gruppe beschrieben (Warger et al., 2006), mit LPS beladen werden und bei niedrigen LPS-Mengen (100 pmol/ml) eine IL-6-Sekretion induzieren. LPS allein konnte vergleichbare IL-6-Mengen nur bei höheren Konzentrationen (3-10 ng/ml) induzieren. Die Kombination von mtubHsp70-OVA und niedrigen Mengen LPS führte nicht zu detektierbarer IL-6-Produktion.

#### 4.7.3. Aktivierung von DC durch Hsp70-OVA *in vivo*

Da *in vivo* die wichtige Funktion der DC bei der Präsentation von Hsp70-OVA-Proteinen gezeigt werden konnte, aber ihre Stimulierung *in vitro* durch die Fusionsproteine nicht nachgewiesen konnte, wurden Mäuse immunisiert und ihre DC *ex vivo* einen Tag später im FACS analysiert. Hierzu wurden die Mäuse subkutan mit 100 pmol mtubHsp70-OVA

immunisiert und die CD11c<sup>+</sup> DC in den drainierenden Lymphknoten auf CD40-Expression untersucht. Zudem wurden noch F4/80<sup>+</sup> Makrophagen aus den drainierenden Lymphknoten auf die Expression des Aktivierungsmarker CD80 untersucht (Singh et al., 2005), da es in der Literatur hinweise gibt, dass aggregierte Proteine mehrheitlich über Makrophagen aufgenommen werden (Schirmbeck et al., 1995).



**Abbildung 4-44: *In vivo* Aktivierung von CD11c<sup>+</sup> DC und F4/80<sup>+</sup> Makrophagen durch mtubHsp70-OVA**

Mäuse wurden subkutan mit nativem oder aggregiertem mtubHsp70-OVA immunisiert und einen Tag später die CD11c<sup>+</sup> DC und F4/80<sup>+</sup> Makrophagen in den drainierenden Lymphknoten analysiert. Die Zahlen in den Kästen unterhalb des Histogrammes geben die MFI der Färbung für das jeweilige Oberflächenantigen wieder.

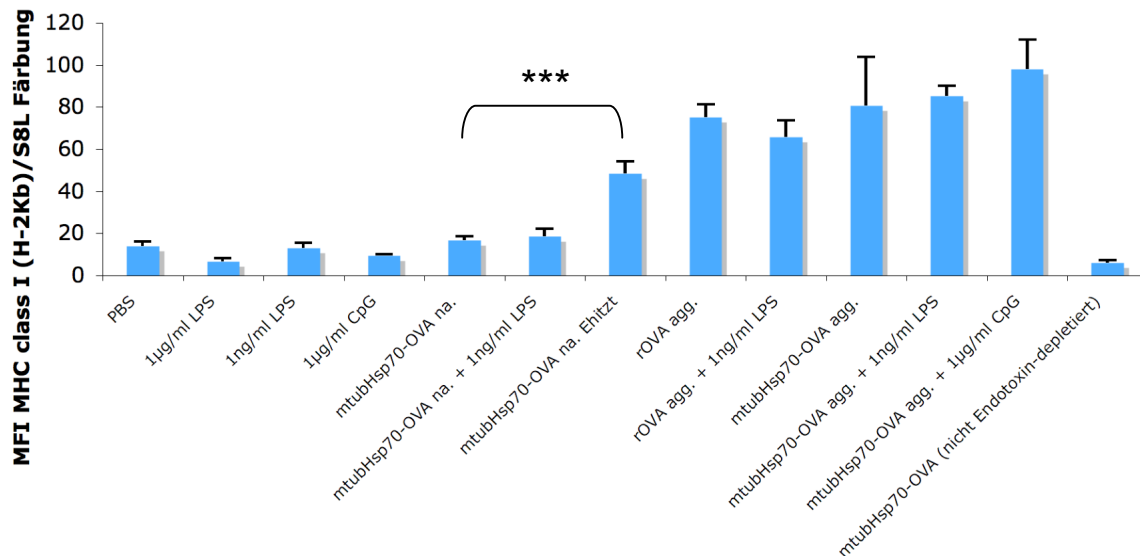
Keine der Immunisierungen führte zu einer Hochregulierung von CD80 auf F4/80<sup>+</sup> Makrophagen (Abbildung 4-44). Die Immunisierung mit mtubHsp70-OVA allein (nativ und aggregiert) führte zu einer leichten Hochregulation von CD40 auf CD11c<sup>+</sup> DC, während die Kombination von CpG und mtubHsp70-OVA (aggregiert) zu einer starken Hochregulation führte. Um die Auswirkung der Immunisierung auf die Fähigkeit der APC zur Kreuzpräsentation zu untersuchen, wurden die Zellen auch mit dem Antikörper 25.D1-16 gefärbt, der SIINFEKL-H2-K<sup>b</sup>-Komplexe erkennt. Weder bei CD11c<sup>+</sup> DC noch bei F4/80<sup>+</sup> Makrophagen konnte diese Komplexe detektiert werden (Daten nicht gezeigt). Auch nach

Immunisierung mit der Kombination von CpG und mtubHsp70-OVA (aggregiert) konnten keine SIINFEKL-H2-K<sup>b</sup>-Komplex positiven Zellen detektiert werden, obwohl diese Immunisierung zu starken, Peptid-spezifischen Immunantworten führt (Abbildung 4-35). Es ist jedoch nicht auszuschließen, dass die Kreuzpräsentation von mtubHsp70-OVA *in vivo* ein seltenes Ereignis ist, und nur in einem Bruchteil der CD11c<sup>+</sup> DC-Population erfolgt. Eine Möglichkeit ist, dass die in der Haut aktivierten CD11c<sup>+</sup> DC länger als einen Tag brauchen, um in die drainierenden Lymphknoten zu wandern. Dies könnte erklären, warum am Tag der Analyse (einen Tag nach Immunisierung) noch keine ausreichenden Mengen an CD11c<sup>+</sup> DC in den drainierenden Lymphknoten gefunden wurden, die das OVA-Peptid auf Ihrem MHC-Klasse-I präsentieren.

#### 4.7.4. Hsp70-OVA induzierte Kreuzpräsentation in BMDC

Um die vermutete Kreuzpräsentation des OVA-Epitopes SIINFEKL durch DC prinzipiell zu belegen, wurden BMDC nach *in vitro* Inkubation mit Fusionsproteinen mit dem Antikörper 25.D1-16 gefärbt. Dieser *in vitro* Ansatz ermöglicht, dass BMDC in genügender Anzahl für eine FACS-Analyse nach Inkubation mit Fusionsproteinen zur Verfügung stehen. Hierzu wurden BMDC mit 500 pmol rekombinanten Protein 24 h lang inkubiert, diesmal aber nur rOVA und mtubHsp70-OVA.

Die Fusionsproteine wurden aggregiert und nativ, allein und in Kombination mit 1 ng/ml LPS zu den BMDC gegeben. Auf diese Weise konnte der Einfluß der Aggregation und der Endotoxin-Kontamination auf die Aufnahme, Stimulation und Kreuzpräsentation der CD11c<sup>+</sup> DC untersucht werden. Aggregiertes rOVA und mtubHsp70-OVA zeigten im Vergleich zu nativem mtubHsp70-OVA eine starke Kreuzpräsentation, die durch Koinkubation im Falle von mtubHsp70-OVA mit LPS oder CpG leicht erhöht werden konnte (Abbildung 4-45).

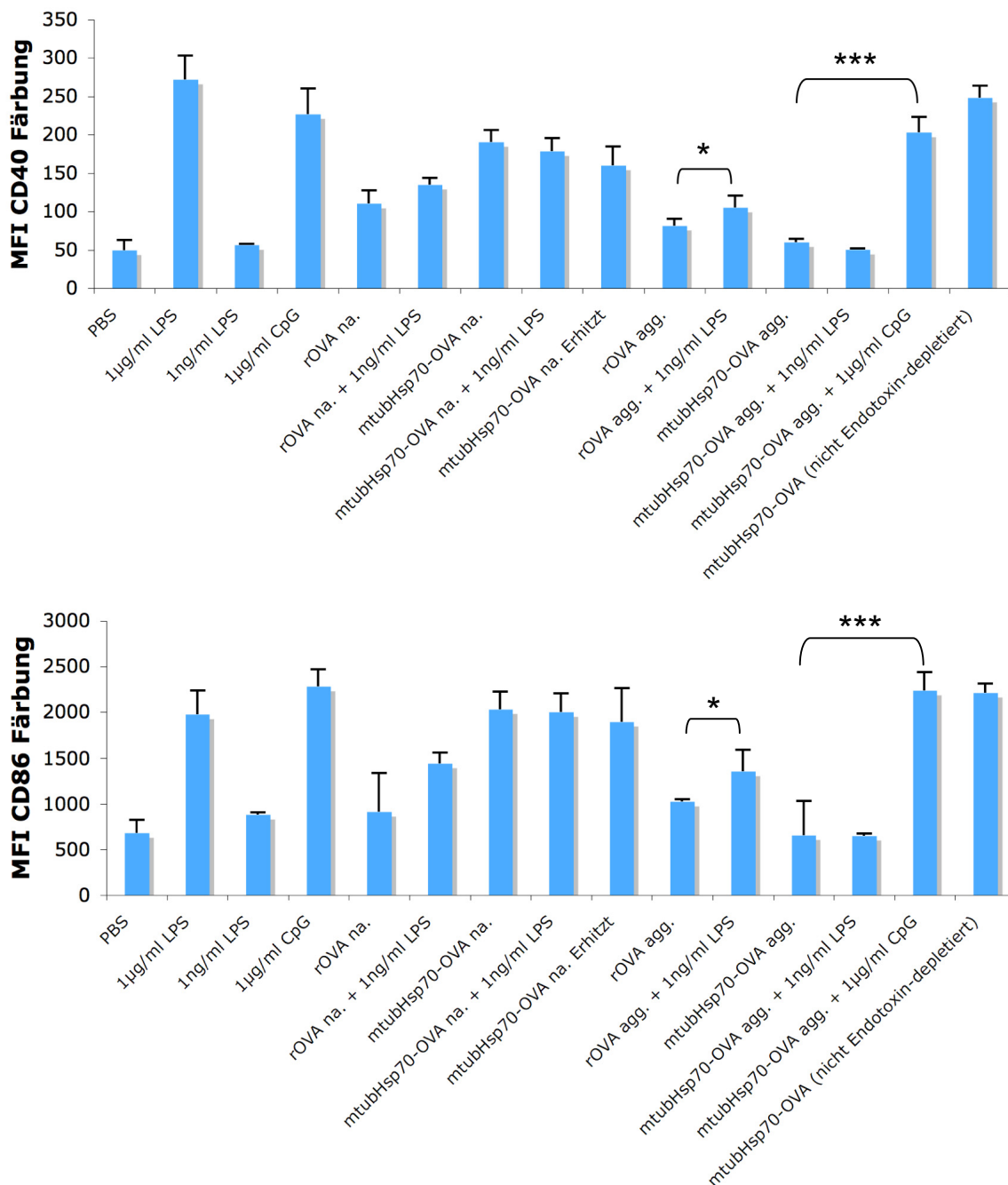


**Abbildung 4-45: Aggregiertes, nicht aber natives Fusionsprotein induziert eine starke Kreuzpräsentation.**

BMDC wurden 24 h lang mit 500 pmol/ml mtubHsp70-OVA oder rOVA inkubiert und mit 25.D1-16 Antikörper gefärbt. Natives Fusionsprotein ist mit "na", aggregiertes Fusionsprotein mit "agg" gekennzeichnet.

Die Hitze-Aggregation von nativem mtubHsp70-OVA führte zu einer signifikant stärkeren Kreuzpräsentation. Nicht Endotoxin-abgereichertes mtubHsp70-OVA zeigte kaum Kreuzpräsentation, vergleichbar mit dem Effekt von Adjuvans (LPS und CpG) allein. Die Analyse der am Schalenboden adhärenen und F4/80<sup>+</sup> Zellen (u.a. Makrophagen) der BMDC Kultur auf SIINFEKL-H2-K<sup>b</sup>-Komplexbildung, zeigten kaum Kreuzpräsentation der Fusionsproteine durch diese Zellen (Daten nicht gezeigt).

Die Analyse der Oberflächenmoleküle CD40 und CD86 in den CD11c<sup>+</sup> DC zeigte eine starke Hochregulierung von beiden Markern nach Inkubation mit nativ hergestelltem mtubHsp70-OVA und mit nicht-Endotoxin-depletiertem mtubHsp70-OVA (Abbildung 4-46). Die Koinkubation mit LPS veränderte die Expression nicht weiter (keine signifikante Zunahme). Endotoxin-freies, aggregiertes mtubHsp70-OVA führte allein oder in Kombination mit LPS zu keiner Hochregulation von CD40 oder CD86. Die CD40- und CD86-Expression entsprach der Expression der nicht stimulierten BMDC. Nur in Kombination mit CpG erfolgte eine, mit dem Endotoxin-kontaminierten mtubHsp70-OVA vergleichbare, Aktivierung der BMDC. Aggregiertes und natives rOVA konnte eine leichte Hochregulation von CD40 und CD86 gegenüber der nicht stimulierten Gruppe induzieren.



**Abbildung 4-46: Aktivierung von BMDC durch mtubHsp70-OVA und rOVA**

BMDC wurden 24 h lang mit 500 pmol/ml Fusionsprotein inkubiert und dann auf CD40- und CD86-Expression untersucht. Natives Fusionsprotein ist mit "na", aggregiertes Fusionsprotein mit "agg" gekennzeichnet

Im Gegensatz zum Befund mit mtubHsp70-OVA erhöhte die Koinkubation von rOVA mit LPS die Expression der kostimulatorischen Marker noch etwas. Die Hitze-Aggregation von nativen mtubHsp70-OVA hatte keine zusätzliche steigernde Wirkung auf die CD40- und CD86-Expression der BMDC.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass eine Wiederherstellung des HSP-Adjuvans-Effektes durch Präinkubation mit LPS auch in diesen *in vitro* Versuchen nicht zu beobachten war. Die Präinkubation des aggregierten, Endotoxin-depletierten mtubHsp70-OVA mit LPS führte zu keiner zusätzlichen Erhöhung der Expression der kostimulatorischen Moleküle (CD40 und CD86). Jedoch konnte gezeigt werden, dass die Hsp70-OVA-induzierte Kreuzpräsentation hauptsächlich durch dendritische Zellen *in vivo* erfolgt. Bei *in vitro* Versuchen mit BMDC zeigte sich eine verstärkte SIINFEKL/H2-K<sup>b</sup>-Komplexbildung, d.h. eine verstärkte Kreuzpräsentation von aggregierten im Vergleich zu nicht aggregierten mtubHsp70-OVA. Diese könnte die starke Immunogenität der aggregierten Fusionsproteine *in vivo* erklären.

## 5. Diskussion

Vor über zwanzig Jahren wurden die immunologischen Eigenschaften der Hitze-Schock-Proteine entdeckt. Diese bestehen neben der Induzierung von Kreuzpräsentation durch APC auch aus einem kostimulatorischen Adjuvans-Effekt, der die APC aktiviert (Srivastava, 2002a). Die protektiven Eigenschaften der HSP in Tumorversuchen wurden sofort für die Anwendung als Tumor-Vakzine erkannt. Mehrere Firmen haben bereits HSP-basierte Vakzine entwickelt. So untersucht die amerikanische Firma Antigenics mit dem Oncophage<sup>®</sup> genannten Medikament die Wirksamkeit in der präklinischen Phase III bei Nierenkrebs und metastasierenden Melanomen. Oncophage<sup>®</sup> ist ein patientenspezifisches Medikament, das auf gp96-Präparaten basiert, welche mitsamt gebundenen Peptiden aus Krebszellen der Patienten isoliert werden (Parmiani et al., 2006).

Die Firma Nventa Biopharmaceuticals Corporation konnte mit ihrem HSP-Antigen-Fusionsprotein aus dem mykobakteriellen Hsp65 (aus dem *Mycobacterium Bacille Calmette-Guerin*) und dem humanen Papillomavirus-Typ-16 (HPV16) Antigen E7 schon erste Erfolge in einem präklinischen Phase-II-Test mit diversen HPV-verbundenen Krankheiten (unter anderem cervicale Dysplasie) verbuchen (Liu et al., 2007). Neuesten Ergebnissen nach konnte die Wirksamkeit des HspE7-Fusionsproteins durch Zugabe von Adjuvans (TLR3-Ligand Poly-ICLC und dem TLR9-Ligand CpG-ODN 1668) weiter verbessert werden (<http://www.nventacorp.com/pipeline/hspe7.htm>).

Um die Vorgaben im Detail abzuklären, dass verschiedene HSP-Antigen-Fusionsproteine ohne Zugabe von Adjuvans eine starke Anti-Tumorimmunität induzieren, wurden in dieser Doktorarbeit mehrere HSP der HSP70-Familie miteinander verglichen. Hierzu wurden vier Hsp70 (Maus-Hsp70, Maus-Hsc70, Maus-Hsp70L1 und das *Mycobacterium tuberculosis* Hsp70) mit einem Ovalbumin-Proteinfragment fusioniert, das neben dem CD8<sup>+</sup> K<sup>b</sup>-Epitop (Ovalbumin AS 257-264) auch das CD4<sup>+</sup> A<sup>b</sup>-Helferepitop (Ovalbumin AS 323-339) enthält. Die Verwendung eines T-Helferepitop sollte die CD8<sup>+</sup> T-Zell-Antwort verstärken.

Die genannten Fusionsproteine wurden in dieser Arbeit rekombinant in *E.coli* hergestellt und unter denaturierenden Bedingungen aufgereinigt. Die Aufreinigung unter denaturierenden Bedingungen war nötig, da die Fusionsproteine vor allem in Form von



Einschlusskörperchen exprimiert wurden. Zur Aufreinigung der Fusionsproteine mittels Ni-NTA-Affinitätschromatographie wurde ein Protokoll verwendet, welches speziell die Renaturierung von HSP-Antigen-Fusionsproteinen berücksichtigt (Udono et al., 2004). Auf einen ATPase-Aktivitätstest wie bei Udono et al. wurde zu diesem Zeitpunkt verzichtet, vor allem da die HSP-OVA-Fusionsproteine die OVA-spezifischen OT-I CD8<sup>+</sup> T-Zellen in ersten Experimenten stärker aktivieren konnten als rekombinantes OVA-Fragment. Dies ließ auf die Funktionalität der HSP-Anteile schließen. Darüber hinaus schien eine intakte ATPase-Aktivität der HSP-OVA-Fusionsproteine von untergeordneter Bedeutung zu sein, da hier zur Etablierung eines HSP-Antigen-Komplexes kein Antigenpeptid ATP-abhängig gebunden werden musste.

Während der Aufreinigung führten zusätzliche Banden in den Fusionsprotein-Präparationen anfänglich zu Unklarheiten, da diese nicht auf eine systematische, unspezifische Bindung bakterieller Proteine zurückgeführt werden konnten. Die Analyse des Eluats durch SDS-PAGE und Western Blot zeigte, dass es sich bei den definierten Banden von kleinerem Molekulargewicht wahrscheinlich um Translationsabbruchprodukte handelte. Die Translationsabbrucher konnten auf bestimmte eukaryontische Codons innerhalb der für die Fusionsproteine kodierenden cDNAs zurückgeführt werden, für die in *E.coli* nur geringe Mengen an tRNAs zur Verfügung stehen. Häufiges Auftreten von seltenen Codons führt zu einem Abbruch der Translation am Ribosom. Durch eine modifizierte Aufreinigungsstrategie konnte das Problem der Aufreinigung von Translationsabbruchern umgangen werden. Hierzu wurde der N-terminale His6-tag an das C-terminale Ende verschoben. Somit wurden nur vollständig translatierte Proteine über die Ni-NTA Säule aufgereinigt und Translationsabbrucher blieben wegen des fehlenden His6-tag in der Durchflussfraktion. Auf diese Art und Weise konnte die Reinheit der Fusionsproteine erheblich erhöht werden (Abbildung 4-8).

Die in dieser Doktorarbeit beschriebenen HSP-OVA-Fusionsproteine waren in der Lage, wie oben schon erwähnt, die OVA-spezifischen OT-I CD8<sup>+</sup> T-Zellen effizient zu aktivieren. Die Aktivierung der OT-I Zellen wurde hierbei über ihre Proliferation und ihre Fähigkeit zur IFN- $\gamma$ -Produktion (nach Restimulation mit dem spezifischen Peptid S8L) gemessen. 100 pmol mtubHsp70-OVA-Fusionsprotein reichte für eine starke Aktivierung der OT-I Zellen aus. Dies steht in Einklang mit einer anderen Publikation (Harmala et al., 2002), in der ähnliche Mengen HSP-OVA-Fusionsprotein benötigt wurde. Zwar führte die Immunisierung

mit LPS und Peptid in dieser Doktorarbeit zu einer stärkeren Proliferation und damit zu einer größeren Anzahl von OT-I Zellen in der Milz, doch war der Anteil an OT-I Zellen, die IFN- $\gamma$  produzierten, bei der Immunisierung mit HSP-OVA grösser (Abbildung 4-9 und Abbildung 4-10). Die stärkere Proliferation der OT-I Zellen durch die Immunisierung mit 50  $\mu\text{g}$  LPS und 250  $\mu\text{g}$  S8L (entspricht 259 nmol) kann durch die fast 2600 mal höhere Menge an Antigen im Vergleich zur Immunisierung mit 100 pmol Fusionsprotein erklärt werden. Die Immunisierung mit äquimolaren Mengen (100 pmol) S8L-Peptid mit 50  $\mu\text{g}$  LPS zeigte eine ähnlich schwache Aktivierung der OT-I Zellen wie die Immunisierung mit rekombinanten OVA (rOVA) (Daten nicht gezeigt).

Ausserdem führte die Immunisierung nur mit dem HSP-Anteil allein (hier: mtubHsp70 und mHsp70) zu keiner Aktivierung der OT-I T-Zellen (Abbildung 4-11). Dies steht ebenso in Einklang mit einer früheren Arbeit (Harmala et al., 2002). Der Grund hierfür liegt an der Tatsache, dass OT-I Zellen am besten durch S8L/MHC-Klasse-I-Komplexe aktiviert werden. Der Adjuvans-Effekt der Hsp70 allein reicht dagegen nicht aus, die CD8<sup>+</sup> T-Zellen unabhängig vom Antigen unspezifisch zu aktivieren. Das rekombinante OVA-Fragment war allein nicht immunogen genug, um OT-I T-Zellen ausreichend zu aktivieren (Abbildung 4-9 und Abbildung 4-10). Daher kann von einer effizienteren Induktion der APC-Kreuzpräsentation und Aktivierung der T-Zellen durch die HSP-OVA-Fusionsproteine ausgegangen werden. Es wurde weiterhin festgestellt, dass *in vivo* die stärksten OT-I Antworten bei der Immunisierung mit mtubHsp70-OVA, gefolgt von mHsp70-OVA und mHsc70-OVA, erzielt wurden. Die Immunisierung mit mHsp70L1-OVA erzielte nur sehr schwache OT-I Antworten.

Interessant in diesem Zusammenhang ist auch die Frage, auf welchen APC-Typ die Kreuzpräsentation eines an HSP gebundenen Antigens und somit die CD8<sup>+</sup> T-Zell-Aktivierung zurückzuführen ist. Zu den APC-Typen, die HSP gebundenes Antigen kreuzpräsentieren können, gehören neben DC auch Makrophagen und B-Zellen (Srivastava, 2002a; Tobian et al., 2005). Andere Berichte zeigten *in vitro*, dass DC und Makrophagen zudem von HSP aktiviert werden können (Srivastava, 2002b). Bei der Aktivierung von T-Zellen wird den DC jedoch die wichtigste Rolle eingeräumt (Kapsenberg, 2003). Um diese Frage *in vivo* zu lösen, wurden CD11c.DTR Mäuse verwendet, in denen spezifisch die CD11c<sup>+</sup> DC durch Injektion von Diphtherie-Toxin (DT) depletiert werden können, ohne die anderen Zellpopulationen signifikant zu beeinflussen (Jung et al., 2002).

Es konnte von mir durch die spezifische Depletion von CD11c<sup>+</sup> DC *in vivo* gezeigt werden, dass für die von HSP-OVA (mHsp70-OVA und mtubHsp70-OVA) induzierten OT-I Antworten DC notwendig sind (Abbildung 4-41 und nicht gezeigte Daten). Dies ist meines Wissens nach das erste Mal, dass diese Notwendigkeit *in vivo* nachgewiesen werden konnte. Die wichtige Rolle von CD11c<sup>+</sup> DC bei HSP-Immunisierungen ist bekannt, da nach gp96-Immunisierung eine hohe Anzahl von reifen CD11c<sup>+</sup> DC in den drainierenden Lymphknoten gefunden werden (Binder et al., 2000).

Zudem wurde in dieser Arbeit gezeigt, dass die OVA-spezifischen OT-II CD4<sup>+</sup> TCR-transgenen T-Zellen durch HSP-OVA-Fusionsproteine aktiviert werden können. Hierbei waren die Unterschiede zwischen den einzelnen HSP-OVA-Fusionsproteinen und rOVA nicht so drastisch wie im OT-I System. Dies kann durch die schwächere Fähigkeit von DC zur Kreuzpräsentation im Vergleich zur Repräsentation von exogenen Antigenen auf MHC-Klasse-II erklärt werden. Es wurde für Virus-Partikel beobachtet, dass die Kreuzpräsentation von exogenen Antigenen auf MHC-Klasse-I bis zu 10 mal schwächer ist als für die klassische Präsentation auf MHC-Klasse-II (Storni und Bachmann, 2004). Bei der effizienteren Prozessierung endozytierter Antigene in endosomalen Kompartimenten könnte eine HSP-vermittelte Komponente weniger deutlich sichtbar sein, die die Antigen-Kreuzpräsentation im MHC-Klasse-I-System fördert.

Es wurde in dieser Doktorarbeit gezeigt, dass nicht nur TCR-transgene T-Zellen mit dem HSP-OVA-Fusionsprotein aktiviert werden können, sondern auch OVA-spezifische T-Zellen einer Wildtyp-Maus. Die Immunisierung einer naiven Maus mit 100 pmol mtubHsp70-OVA führte zur Aktivierung von OVA-spezifischen T-Zellen, die zytotoxische Effektor-Funktionen *in vivo* zeigten (Abbildung 4-16). Die Immunisierung mit dem rekombinanten OVA allein führte zu keiner Zytotoxizität *in vivo*. Diese Befunde stehen in Einklang mit einer Publikation (Suzue et al., 1997), in der ähnliche Mengen (120 pmol) eines *M. tuberculosis* Hsp70-OVA-Fusionsprotein auch zytotoxische Effektor-Funktionen der T-Zellen induzierten. Die Immunisierung mit äquimolaren Mengen von rekombinantem OVA erbrachte bei Suzue et al. ebenfalls keine signifikante, spezifische Lyse von S8L-beladenen Zielzellen.

Um zu untersuchen, ob die starken immunstimulatorischen Fähigkeiten des HSP-Anteils (Adjuvans-Effekt) durch Endotoxin-Kontamination zustande kamen, wurden die Versuche

in LPS-Rezeptor (TLR4)-defizienten Mäusen wiederholt. In diesen Knockout-Mäusen sollte eine mögliche Endotoxin-Kontamination durch die rekombinante Herstellung der HSP-OVA-Fusionsproteine in *E.coli*, keine oder nur eine schwache Auswirkung auf die induzierte Immunantwort haben. Nach Immunisierung von TLR4-defizienten Mäusen wurde eine starke Reduktion der spezifischen Lyse von Zielzellen *in vivo* beobachtet (Abbildung 4-17). Dieses Ergebnis lässt zwei Schlüsse zu: Entweder ist TLR4 ein notwendiger Rezeptor für die Mitglieder der HSP70-Familie (Asea et al., 2002), oder die HSP-OVA Präparate waren durch ihre rekombinante Herstellung in *E.coli* mit Endotoxinen kontaminiert. Die quantitative Messung der Endotoxin-Menge in den Protein-Präparaten ergab einen Wert von ca. 300 EU/mg, welches auf eine starke Kontamination hinwies. Aus diesem Grunde wurden mehrere Methoden zur Endotoxin-Abreicherung angewendet. Die erfolgreichste Methode, die zu einer niedrigen Endotoxin-Kontamination (<5 EU/mg) und gleichzeitig einem vernachlässigbaren Verlust an Fusionsprotein führte, basiert auf einem Triton X-114 und Tween-20 Waschschrift während der Aufreinigung. Durch anschließendes, ausgiebiges Waschen des an die Ni-NTA-Agarose gebundenen Fusionsproteins konnten auch Reste an störenden Detergenzien im Eluat beseitigt werden.

Alle vier HSP-OVA-Fusionsproteine induzierten nach der Endotoxin-Abreicherung keine zytotoxische Aktivität *in vivo* mehr (Abbildung 4-18). Dies ist meines Wissens nach das erste Mal, dass die Aktivierung von zytotoxischen T-Zellen *in vivo* durch geringe Mengen (100 pmol) Hsp70-Antigen-Fusionsproteine auf Endotoxin-Kontamination zurückzuführen ist. Ob Endotoxin-freie, Hsp70-Antigen-Fusionsproteine in höheren Mengen zu einer effizienteren Induktion von zytotoxischen T-Zell-Antworten führen kann, wurde hier nicht untersucht. Eine Aktivierung von OT-I T-Zellen erfolgte aber auch noch nach der Endotoxin-Abreicherung, auch wenn diese viel schwächer war als vor der Endotoxin-Abreicherung (Abbildung 4-19).

Vor Beginn dieser Arbeit gab es einzelne Hinweise, dass HSP mit Endotoxinen kontaminiert sein können, und diese eine Auswirkung auf die immunstimulatorischen Eigenschaften der HSP haben. Für HSP wurden die gleichen Rezeptoren (TLR2 und TLR4) wie für Endotoxine beschrieben. Es wurde beobachtet, dass die Aktivierung mit HSP bzw. Endotoxin zu einer ähnlichen Stimulation des angeborenen Immunsystems sowie zur Aktivierung der APC führt (Wallin et al., 2002; Warger et al., 2006). In einer anderen Publikation konnte Endotoxin-abgereichertes (auf 4 EU/mg), rekombinantes

humanes HSP60 und Hsp70 keine Zytokin-Sekretion in Makrophagen induzieren (Gao und Tsan, 2004). Eine andere Gruppe konnte zeigen, dass hochgradig Endotoxin-abgereichertes, rekombinantes humanes Hsp70 (<10 EU/mg) im Gegensatz leicht kontaminierten Hsp70 (60 EU/mg) zu keiner Maturierung von DC führte und auch keine Zytokin-Sezernierung in DC und Monozyten induzieren konnte (Bausinger et al., 2002). Im Verlauf dieser Doktorarbeit konnte in einer weiteren Studie (Warger et al., 2006) gezeigt werden, dass nicht nur in Bakterien rekombinant hergestelltes gp96, sondern auch aus Bauspeicheldrüsen isoliertes gp96 Endotoxin-kontaminiert ist. In dieser Studie führte Endotoxin-freies gp96 zu keiner Aktivierung und Zytokin-Sekretion von DC. Nach Inkubation von Endotoxin-freiem (<0,5 EU/mg) gp96 mit niedrigen Mengen von TLR2- und TLR4-Liganden, die allein keine DC Aktivierung induzieren konnten, erfolgte eine ähnliche starke DC Aktivierung wie die 10 bis 200-fache Menge TLR2- und TLR4-Ligand allein. Dies wurde auch bei der Induktion von T-Zell-Antworten durch die gp96-aktivierten DC *in vitro* beobachtet (Warger et al., 2006).

Es stellte sich in während der Doktorarbeit die Frage, ob der Adjuvans-Effekt der HSP-OVA-Fusionsprotein durch Zugabe von niedrigen Mengen TLR-Liganden rekonstituiert werden konnte. Hierzu wurden verschiedene TLR-Liganden (TLR4 und TLR9) mit dem Endotoxin-abgereicherten mtubHsp70-OVA-Fusionsprotein vorinkubiert und dann in Wildtyp-Mäuse gespritzt. Nur die Vorinkubation mit dem TLR9-Liganden CpG-ODN 1668, aber nicht mit dem TLR4-Liganden LPS, führte zu einer spezifischen Lyse von S8L-beladenen Zielzellen *in vivo* (Abbildung 4-23). Im Fall der Rekonstitution mit TLR-Liganden für die Messung der BMDC-Aktivierung *in vitro*, führte die Vorinkubation von mtubHsp70-OVA mit LPS zu keiner IL-6 Sekretion durch BMDC (Abbildung 4-43). Diese Ergebnisse stehen im Gegensatz zu der Publikation von Warger et al., in der die Rekonstitution von gp96 mit LPS die Sekretion von IL-6 durch BMDC induzierte (siehe auch Abbildung 4-43). Zudem konnte in dieser Publikation durch Rekonstitution von gp96 wieder eine messbare zytotoxische T-Zell-Antwort *in vitro* beobachtet werden.

Woher kommen diese Unterschiede für mtubHsp70 und gp96? Die erfolgreiche Rekonstitution von gp96 mit dem TLR4-Liganden LPS wurde mit der aktiven Bindung dieses Liganden durch gp96 erklärt (Warger et al., 2006). Zusätzlich konnte für Hsp70 und Hsp90 gezeigt werden, dass diese aktiv LPS binden können und dass membranständige

Hsp70- und Hsp90-Moleküle CD14-gebundenes LPS binden können (Triantafilou et al., 2001). Warum scheiterte dann die Rekonstitution von mtubHsp70-OVA in dieser Doktorarbeit? Eine Möglichkeit ist, dass hier kein eukaryontisches Hsp70 verwendet wurde, sondern das C-terminale Fragment von *M.tub* Hsp70. Dieses Fragment (AS 359-610) wurde als das immunstimulatorische Fragment identifiziert und Immunisierungen hiermit führten zu starken zytotoxischen T-Zell-Antworten (MacAry et al., 2004). Es kann hierbei jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass die LPS-Bindestelle im N-terminalen Teil von *M.tub*. Hsp70 liegt und deshalb keine Rekonstitution beobachtet werden konnte. Eine andere Erklärung, die aus unseren Daten abgeleitet werden kann, ist, dass möglicherweise ein anderes Endotoxin oder eine andere immunogene, bakterielle Komponente als LPS von *M.tub*. Hsp70 gebunden wird. Daraus würde folgen, dass *M.tub* Hsp70 gar nicht LPS binden könnte. So konnte vor kurzem für *M.tub*. Hsp70 gezeigt werden, dass die trotz Endotoxin-Abreicherung beobachteten immunstimulatorischen Eigenschaften auf Flagellin-Kontamination zurückzuführen ist. In Flagellin-defizienten *E.coli* hergestelltes *M.tub*. Hsp70 konnte keine T-Zell-Antworten mehr induzieren (Ye und Gan, 2007). Daher wäre eine Vorinkubation von mtubHsp70-OVA mit Flagellin zur Rekonstitution des Adjuvans-Effektes eine interessante Alternative, um die Aktivierung von zytotoxischen T-Zellen *in vivo* zu untersuchen.

Eine andere mögliche Erklärung, warum die Rekonstitution der Endotoxin-abgereicherten HSP-OVA-Fusionsproteine nicht erfolgreich war, wäre die verwendete Abreinigungsmethode. Diese führte, wie weiter oben beschrieben, zu einer starken Aggregation der Fusionsproteine. Durch diese Aggregation könnte auch die Konformation der HSP-OVA-Fusionsproteine beeinflusst worden sein. Eine Folge einer möglichen Konformationsänderung könnte sein, dass die LPS-Bindestelle des HSP-Anteils nicht mehr für das zugegebene LPS zugänglich war, oder diese Bindestelle durch die Konformationsänderung ihre Funktion verloren hatte, und so kein LPS mehr binden konnte. Eine andere Folge der Aggregation des Fusionsproteins könnte aber auch sein, dass das Fusionsprotein zwar LPS band, dieser Komplex aber nicht mehr mit den HSP/LPS-Rezeptor TLR4 interagieren konnte. Zuletzt wäre es möglich, dass die HSP-OVA-Fusionsproteine auch ohne Endotoxin-Kontamination einen Adjuvans-Effekt besitzen, aber durch die Aggregation nicht mehr an die entsprechenden Rezeptoren auf den APC binden

können. Dies würde jedoch im Widerspruch zu der Arbeit von Warger et. al. liegen, bei der die Rekonstitution mit LPS erfolgreich war.

Allerdings schien Endotoxin-abgereichertes, unter nativen Bedingungen aufgereinigtes, mtubHsp70-OVA nur schwach aggregiert zu sein. Dieses so hergestellte und schwach aggregierte Fusionsprotein konnte aber trotzdem nicht mit LPS rekonstituiert werden (Abbildung 4-16). Daher kann gegenwärtig keine der beiden Erklärungen ausgeschlossen werden. Somit erscheint die gescheiterte Rekonstitution der Hsp70-OVA-Fusionsproteine mit LPS entweder an der Aggregation der Fusionsproteine oder an der Tatsache zu liegen, dass der Adjuvans-Effekt durch die Kontamination eines anderen, bakteriellen Bestandteils zustande kam.

Um einen möglichen, wenn auch schwachen, immunstimulatorischen Effekt von Endotoxin-abgereicherten mtubHsp70-OVA zu messen, wurden Mäuse mehrfach mit mtubHsp70-OVA immunisiert. Die Mehrfach-Immunsierung (hier dreifach) mit 100 pmol Endotoxin-abgereichertem mtubHsp70-OVA führte zu einer signifikanten zytotoxischen Aktivität (Abbildung 4-20). Zudem konnte nach diesen Immunisierungen eine Verlangsamung des Wachstums des OVA-exprimierenden B16-Melanoms MO4 beobachtet werden. Auch konnte eine signifikante Verbesserung des Überlebens von dreifach-immunisierten Mäusen beobachtet werden. Nicht-immunisierte Mäuse starben ca. 3 Wochen nach Injektion der MO4-Zellen, während dreifach mit 100 pmol mtubHsp70-OVA immunisierte Mäuse ca. 2 Wochen länger überlebten (Abbildung 4-21). Der Vergleich der einzelnen, Endotoxin-freien Hsp70-OVA Fusionsproteine zeigte wiederum auch die starke Wirksamkeit von mtubHsp70-OVA. Dieser folgt in der Wirksamkeit diejenige von mHsc70-OVA und mHsp70-OVA und dann mHsp70L1-OVA.

Die Kombination von mtubHsp70-OVA mit dem TLR9-Liganden CpG-ODN führte schon nach einmaliger Immunisierung zu signifikanter zytotoxischer Aktivität (Abbildung 4-23). 100 pmol mtubHsp70-OVA in Kombination mit 0,5 µg CpG zeigte eine ähnlich starke Zytotoxizität wie die Kontrollgruppe mit 100 µg Ovalbumin und 50 µg CpG. Diese Antigenmenge in der Kontrollgruppe war auf molarer Basis jedoch 23mal höher, und es wurde 100-mal mehr CpG benötigt. Die Immunisierungseffizienz von 100 pmol mtubHsp70-OVA in Kombination mit 5 µg CpG kann also gut mit der Kombination des

Ovalbumin-konjugierten Antikörper DEC205 in Kombination mit 50 µg CpG verglichen werden (Abbildung 4-16).

Einmalige prophylaktische Immunisierungen mit der Kombination von CpG und mtubHsp70-OVA zeigten eine ähnlich starke protektive Anti-Tumorimmunität, wie die dreifache Immunisierung ohne CpG (Abbildung 4-25). Im Vergleich zur Immunisierung mit der Kombination von CpG plus kommerziell erhältlichem Ovalbumin unterdrückte die Immunisierung mit CpG und rekombinantem mtubHsp70-OVA das Tumorwachstum signifikant länger. In 3 von 5 Mäusen konnte sogar eine totale Unterdrückung des Tumorwachstums beobachtet werden, und 2 dieser 3 Mäuse zeigten über 70 Tage nach der Immunisierung noch eine starke protektive Anti-Tumorimmunität, da hier kein Tumorwachstum nach Reinjektion von MO4-Zellen beobachtet werden konnte (Abbildung 4-26). Dies lässt in diesen 2 Mäusen auf eine effiziente Bildung von OVA-spezifischen Gedächtnis-T-Zellen schließen.

Die therapeutische Behandlung von tumortragenden Tieren mit der Kombination von CpG und mtubHsp70-OVA führte ebenfalls zu einer Verlangsamung des Tumorwachstums. Diese war in Kombination stärker als für CpG bzw. mtubHsp70-OVA allein. Es ist bekannt, dass CpG-ODN Anti-Tumorantworten induzieren kann. So konnte die therapeutische Wirksamkeit von CpG-ODN in mehreren subkutanen Tumormodellen ohne Zugabe von spezifischen Antigenen unter Beweis gestellt werden (Kawarada et al., 2001). Neben der Aktivierung von NK-Zellen und CD8<sup>+</sup> T-Zellen induziert CpG auch die Migration von Haut-DC zu den drainierenden Lymphknoten.

Unerwartet wurden ähnlich starke immunogene Eigenschaften für das rekombinant hergestellte OVA beobachtet. Nicht nur im *in vivo* Zytotoxizitäts-Assay (Abbildung 4-30), sondern auch in prophylaktischen und therapeutischen Versuchen (Abbildung 4-28 und Abbildung 4-29) konnte kein Unterschied in der Immunogenität von mtubHsp70-OVA und rOVA festgestellt werden. Interessanterweise führten Immunisierungen mit äquimolaren Mengen von kommerziell erhältlichem Ovalbumin zu keiner zytotoxischen Aktivität (Abbildung 4-31). Die schwache Immunogenität von nativem Ovalbumin wurde auch schon früher beobachtet (Suzue et al., 1997). Als Ursache der induzierten, starken Immunantworten konnten wir die Aggregation der rekombinant hergestellten Proteine



identifizieren (Abbildung 4-33 bis Abbildung 4-35), nachdem der Einfluss der C-terminalen Tag-Sequenzen ausgeschlossen wurde (Abbildung 4-32).

Hitze-aggregiertes, kommerziell erhältliches Ovalbumin, rOVA und mtubHsp70-OVA lösten in Kombination mit CpG-ODN eine etwa gleich starke Zytotoxizität *in vivo* aus (Abbildung 4-30 und Abbildung 4-35), sodass hieraus abgeleitet werden kann, dass CpG unabhängig vom HSP-Anteil des mtubHsp70-OVA-Proteins wirkt. Dies bedeutet wiederum, dass es sich bei der beobachteten starken Immunogenität der Kombination von HSP und CpG-ODN nicht um eine Rekonstitution des Adjuvans-Effektes handelt. Aus diesem Grunde konnte wahrscheinlich, trotz verschiedener Hsp70-Anteile, kein Unterschied in der Immunogenität zwischen den einzelnen Fusionsproteinen in Kombination mit CpG beobachtet werden (Abbildung 4-36).

Worauf beruht nun die starke Immunogenität aggregierter Antigene? Durch *in vivo* Versuche mit 5 verschiedenen Hitze-aggregierten Antigenen konnte in einer Studie gezeigt werden, dass diese alle eine starke zytotoxische T-Zell-Antwort nach *in vitro* Restimulation auslösen konnten, die bis zu 30-mal effizienter war als die durch natives Antigen ausgelöste (Speidel et al., 1997). In dieser Publikation wurde zudem gezeigt, dass die Immunisierung mit aufgekochten Zellen zu einer Immunantwort führte, die jedoch nur nach *in vitro* Restimulation signifikant war. Die Kombination von aggregierten Proteinen mit Aluminiumhydroxid führte aber zu einer Aufhebung der zytotoxischen T-Zell-Antworten und induzierte eine Antikörper-Antwort gegen das Protein (Speidel et al., 1997). Bei der Untersuchung von Antikörper-Antworten gegen Allergene konnte gezeigt werden, dass die Immunisierung mit Hitze-aggregierten Proteinen die Produktion von Nicht-IgE-Isotypen, im Vergleich zu nativen Allergenen, anregt. So wurden bei aggregierten Allergenen weniger für die Hypersensitivität typischen IgE-Antikörper beobachtet, dafür aber mehr IgG2a Antikörper. Daraus folgerten die Autoren, dass Hitze-aggregierte Proteine bevorzugt T-Helferzell-Typ-1 (Th1)-Antworten (IgG2a und zelluläre Immunität allgemein) induzieren und nicht Th2-Antworten (IgE und humorale Immunität allgemein), wie es eher bei nativen Proteinen der Fall ist (Johansen et al., 2005). Diese durch aggregierte Antigene induzierten Th1-Antworten, die vor allem für zytotoxische T-Zell-Antworten wichtig sind, könnten auch die starken CD8<sup>+</sup> T-Zell-Antworten erklären, die in dieser Doktorarbeit und bei Speidel et al. gefunden wurden.

In einer anderen Studie konnte zudem durch Inhibierung der Antigen-Aufnahme mit Cytochalasin (verhindert Phagozytose durch Aktin-Polymerisierung) und  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (beeinflusst endosomales Trafficking und verhindert Ansäuerung) eine prädominante Aufnahme von Hitze-aggregierten NT60-Virus-Antigenen über phagosomale Kompartimente gezeigt werden (Cho et al., 2003). Welche molekularen und zellulären Mechanismen der Aufnahme und Kreuzpräsentation von aggregierten Proteinen zugrunde liegen, ist noch nicht bekannt. Interessant ist auch die Frage, wieweit der Mannose-Rezeptor, der vor kurzem als wichtiger Rezeptor für die Kreuzpräsentation entdeckt wurde (Burgdorf et al., 2007), hier involviert ist. Die in dieser Doktorarbeit beobachtete Kreuzpräsentation ist unabhängig von der Glykosylierung der hier verwendeten aggregierten Proteine. Glykosyliertes, kommerziell erhältliches Ovalbumin und nicht-glykosyliertes, rekombinantes Ovalbumin wurden nämlich nach Hitze-Aggregation gleich effizient kreuzpräsentiert.

Die Analyse der Kreuzpräsentationen nach Internalisierung verschiedener mtubHsp70-OVA-Präparationen zeigte eine verstärkte Präsentation des Ovalbumin-Epitopes SIINFEKL auf MHC-Klasse-I-Molekülen, wie durch die Färbung mit dem Antikörper 25.D1-16 ersichtlich wurde (Abbildung 4-45). Die unter denaturierenden Bedingungen aufgereinigten und Endotoxin-abgereicherten Fusionsproteine (rOVA agg. und mtubHsp70-OVA agg.) zeigten eine sehr starke Induktion der Kreuzpräsentation in BMDC, jedoch kaum zytotoxische T-Zell-Antworten ohne Adjuvans (Abbildung 4-18). Andererseits änderte die Zugabe von Adjuvans die Kreuzpräsentation aber nicht (Abbildung 4-45). Das auch unter denaturierenden Bedingungen hergestellte, aber nicht Endotoxin-abgereicherte mtubHsp70-OVA induzierte keine signifikante Kreuzpräsentation *in vitro*, obwohl es zu starken zytotoxischen T-Zell-Antworten führte (Abbildung 4-16). Die vergleichsweise schwache Kreuzpräsentation liegt wahrscheinlich am recht geringen Aggregationszustand dieses Präparats (Abbildung 4-37), wobei die starken zytotoxischen T-Zell-Antworten wahrscheinlich auf den hohen Endotoxin-Gehalt zurückgeführt werden können. Unter nativen Bedingungen hergestelltes und Endotoxin-abgereichertes mtubHsp70-OVA schien ebenfalls kaum die Kreuzpräsentation in BMDC zu induzieren. Auch die Zugabe von Adjuvans konnte die Kreuzpräsentation nicht verstärken.

Dagegen führte eine Hitze-Aggregation von unter nativen Bedingungen hergestelltem mtubHsp70-OVA vor der Inkubation mit den BMDC zu einer signifikanten Erhöhung der MHC-Klasse-I/SIINFEKL-Komplexe auf der Oberfläche der BMDC. Der

Aggregationszustand, nicht hingegen die Endotoxin-Beimischung, beeinflusste also die Kreuzpräsentation *in vitro* sehr stark.

Hier konnte zum ersten Mal eine direkte Beobachtung der Kreuzpräsentation durch die Antikörperfärbung spezifischer Peptid/MHC-Klasse-I-Komplexe gezeigt werden. Bis jetzt wurde die Kreuzpräsentation von aggregierten Proteinen nur über die Aktivierung von Antigen-spezifischen T-Zellen festgestellt. In der indirekten Messung der Kreuzpräsentation über CD8<sup>+</sup> T-Zell-Antworten spielt nicht nur die Anzahl der kreuzpräsentierten Peptid/MHC-Klasse-I-Komplexe eine Rolle, sondern auch der Aktivierungsstatus der APC. Bei der direkten Messung über Antikörperfärbung der Peptid/MHC-Klasse-I-Komplexe wird aber nur die Kreuzpräsentation selbst quantifiziert.

Cho et al. konnten eine Kreuzpräsentation von aggregierten Proteinen durch eine DC-Zelllinie (DC2.4), Thioglycolat-induzierte Makrophagen, sowie Makrophagen aus dem Knochenmark, jedoch nicht für BMDC beobachten (Cho et al., 2003). Wieso unterscheiden sich die Fähigkeiten der BMDC zur Kreuzpräsentation in der vorliegenden Doktorarbeit und jener Publikation? Die Kreuzpräsentation wurde bei Cho et al. über die induzierten CD8<sup>+</sup> T-Zell-Antworten bestimmt, und nicht direkt über die Peptid/MHC-Klasse-I-Komplexe. Daher kann gefolgert werden, dass mit aggregierten Proteinen inkubierte BMDC diese zwar gut kreuzpräsentieren können, aber nicht in allen Fällen genügend stimuliert werden, um T-Zellen zu aktivieren.

Die Aggregation war ein wesentlicher Grund dafür, warum vergleichbare Immunantworten von rOVA und mtubHsp70-OVA beobachtet werden konnten, denn auch die Hitze-Aggregation von kommerziell erhältlichem OVA führte zu vergleichbaren Antworten (Abbildung 4-35). Nur in Kombination mit einem starken Adjuvans konnte jedoch hier eine zytotoxische T-Zell-Antwort beobachtet werden. Hierbei war aber nur die Kombination mit dem Adjuvans CpG-ODN, nicht aber mit LPS erfolgreich (Abbildung 4-23). Daraus kann geschlossen werden, dass CpG vor allem die DC aktiviert und somit starke T-Zell-Antworten induziert, nicht jedoch notwendigerweise die Kreuzpräsentation in den APC verstärkt.

Es wäre zukünftig interessant zu untersuchen, wie die aggregierten rekombinanten Proteine aufgenommen und kreuzpräsentiert werden. Welche molekularen und zellulären

Mechanismen sind hierfür verantwortlich? Weiterführende Untersuchungen könnten auch zeigen, ob die Aufnahme von aggregierten Proteinen Rezeptor-vermittelt ist und wie sich die Effizienz der Kreuzpräsentation von aggregierten Protein im Vergleich zur Rezeptor-vermittelten Kreuzpräsentation von nativem Antigen (z.B. durch den DEC205-Rezeptor oder den Mannose-Rezeptor) darstellt. Es stellt sich auch die Frage, welche Zellen *in vivo* für die Kreuzpräsentation von aggregierten Antigen verantwortlich sind.

Des weiteren wäre es interessant, die Immunogenität von nicht-aggregierten mtubHsp70-OVA in Tumorexperimenten vergleichend zu untersuchen. Kann der TLR9-Ligand CpG-ODN 1668 auch hier als Adjuvans dienen, oder ist dieser kombinatorische Effekt nur bei aggregierten Protein zu beobachten? Vielleicht kann, wie oben beschrieben, Flagellin den Adjuvans-Effekt von mtubHsp70-OVA wieder rekonstituieren. Zuletzt stellt sich auch die Frage, ob das hier gewählte Expressionssystem optimal für die Herstellung der Fusionsproteine ist. Wäre ein eukaryontisches Expressionssystem vielleicht geeigneter, um Endotoxin-Kontamination und Einschlusskörperchen zu vermeiden, und damit vielleicht auch eine Aggregation nach Aufreinigung, zu verhindern? Es wurde jedoch auch berichtet, dass aus eukaryontischen Zellen isoliertes gp96 Endotoxin-kontaminiert ist, wenn auch nicht so stark wie in Bakterien exprimiertes (Warger et al., 2006). Daher müssten auch in anderen Expressionssystemen hergestellte HSP-Antigen-Fusionsproteine von Endotoxinen abgereichert werden.

Es konnte in dieser Doktorarbeit gezeigt werden, dass geringe Mengen Hsp70-OVA-Fusionsproteine Antigen-spezifische zytotoxische T-Zell-Antworten induzieren können. Zudem wurde in dieser Doktorarbeit gezeigt, dass die Hsp70-OVA induzierten CD8<sup>+</sup> T-Zell-Antworten *in vivo* abhängig von DC sind. Die Hsp70-OVA-Fusionsprotein hatten aber nach Endotoxin-Abreicherung keine immunstimulatorische Eigenschaften mehr und konnten keine zytotoxischen T-Zell-Antworten *in vivo* mehr auslösen. Der hier beobachtete Verlust des Adjuvans-Effektes steht im Einklang mit zwei Publikation (Bendz et al., 2007; Warger et al., 2006), die im Verlauf dieser Doktorarbeit erschienen sind.

Durch die Kombination von Hsp70-OVA mit einem starken Adjuvans (CpG-ODN) wurde eine starke protektive Anti-Tumorimmunität beobachtet. Diese Kombination war auch in einer therapeutischen Behandlung von Tumor-tragenden Mäusen erfolgreich. Darüber hinaus konnte in dieser Doktorarbeit gezeigt werden, dass die Aggregation des Antigens

vorteilhaft für dessen Immunogenität ist. Durch die Aggregation werden die Antigene verstärkt kreuzpräsentiert. In Kombination mit einem starken Adjuvans führte die Immunisierung mit diesen aggregierten Antigenen zu starken zytotoxischen T-Zell-Antworten und Anti-Tumorimmunität.

## 6. Schlussfolgerungen

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass schon kleine Mengen von HSP-OVA-Fusionsproteinen Antigen-spezifische CD8<sup>+</sup> T-Zellen *in vivo* aktivieren. Von den vier verschiedenen Hsp70-Varianten, die hier verglichen wurden (Maus-Hsp70, Maus-Hsc70, Maus-Hsp70L1 und das *Mycobacterium tuberculosis* Hsp70), konnte das *Mycobacterium tuberculosis* Hsp70 die stärksten zytotoxischen T-Zell-Antworten (für TCR-transgene und polyklonale T-Zellen) induzieren. Jedoch verschwanden die Unterschiede in den immunstimulatorischen Fähigkeiten zwischen den vier untersuchten Hsp70 nach der Endotoxin-Abreicherung. Die vier Hsp70-OVA-Fusionsproteine waren nach Endotoxin-Abreicherung nicht mehr immunogener als das rekombinante Antigen ohne HSP-Anteil (rekombinantes OVA). In Tumorexperimenten konnte die protektive Immunisierung mit mtubHsp70-OVA zwar Anti-Tumorimmunität erzeugen, diese war aber nicht stärker als beim rekombinanten Antigen allein. Die Anti-Tumorimmunität konnte in beiden Fällen durch die Kombination mit einem starken Adjuvans (CpG-ODN) verbessert werden. Hieraus kann geschlossen werden, dass Endotoxin-Kontamination einen starken Einfluss auf die Immunogenität der Hsp70-Moleküle hatte.

Für eine medizinische Anwendung der Hsp70-Antigen-Komplexe hat dies eine wichtige Konsequenz. Medizinische Präparate, u.a. auch rekombinante Fusionsproteine, müssen nach Bestimmungen der Zulassungsbehörden frei von bakteriellen Kontaminationen sein. Dies betrifft auch Endotoxine. Da aber nach Endotoxin-Abreicherung der HSP-Adjuvans-Effekt verloren geht, können diese nur noch schwache Anti-Tumorimmunität induzieren und verlieren somit an Interesse für eine therapeutische Anwendung. Nur durch Zugabe von zusätzlichem Adjuvans kann eine signifikante Anti-Tumorimmunität erreicht werden, welche hier aber nicht stärker war als in der Kombination von Adjuvans und rekombinanten Antigen allein.

Weiterführende Untersuchungen der starken Immunogenität des rekombinanten OVA-Antigens im Vergleich zu der schwachen Immunogenität von kommerziellem Antigen zeigten den wichtigen Einfluss des Aggregationsgrades des Antigens auf die Immunogenität. Aggregiertes Antigen wurde stärker als lösliches Antigen von DC

kreuzpräsentiert und führte in Kombination mit einem Adjuvans (CpG-ODN) zu starken Immunantworten und guter Anti-Tumorimmunität.

Daraus kann geschlossen werden, dass aggregierte Tumor-Antigene ein großes Potential für die Tumorstimmung haben, vor allem im Vergleich zu Hsp70-Antigen-Fusionsproteinen. Es ist einfacher und mindestens genauso effizient, ein Tumor-Antigen durch Aufkochen zu aggregieren als es mit einem rekombinanten HSP-Molekül zu fusionieren, um eine gute Kreuzpräsentation zu induzieren. Wichtig für eine starke Anti-Tumorimmunität ist in beiden Fällen eine Kombination mit einem starken Adjuvans. Vielleicht hat dieser Ansatz auch Chancen, ein Teil einer Kombinationstherapie aus herkömmlicher Tumorstimmung (Chemo- und Bestrahlungstherapie) und Immuntherapie zu werden.

## 7. Literaturverzeichnis

Aida, Y., und Pabst, M.J. (1990). Removal of endotoxin from protein solutions by phase separation using Triton X-114. *J Immunol Methods* 132, 191-195.

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

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

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

Barton, G.M., und Medzhitov, R. (2002). Toll-like receptors and their ligands. *Curr Top Microbiol Immunol* 270, 81-92.

Basu, S., Binder, R.J., Suto, R., Anderson, K.M., und 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.

Bausinger, H., Lipsker, D., Ziylan, U., Manie, S., Briand, J.P., Cazenave, J.P., Muller, S., Haeuw, J.F., Ravanat, C., de la Salle, H., *et al.* (2002). Endotoxin-free heat-shock protein 70 fails to induce APC activation. *Eur J Immunol* 32, 3708-3713.

Bendz, H., Ruhland, S.C., Pandya, M.J., Hainzl, O., Riegelsberger, S., Brauchle, C., Mayer, M.P., Buchner, J., Issels, R.D., und Noessner, E. (2007). Human heat shock protein 70 enhances tumor antigen presentation through complex formation and intracellular antigen delivery without innate immune signaling. *J Biol Chem* 282, 31688-31702.

Bennett, S.R., Carbone, F.R., Karamalis, F., Flavell, R.A., Miller, J.F., und Heath, W.R. (1998). Help for cytotoxic-T-cell responses is mediated by CD40 signalling. *Nature* 393, 478-480.

Bhakdi, S., und Trantum-Jensen, J. (1991). Complement lysis: a hole is a hole. *Immunol Today* 12, 318-320; discussion 321.



- Binder, R.J., Anderson, K.M., Basu, S., und Srivastava, P.K. (2000). Cutting edge: heat shock protein gp96 induces maturation and migration of CD11c+ cells in vivo. *J Immunol* *165*, 6029-6035.
- Binder, R.J., Vatner, R., und Srivastava, P. (2004). The heat-shock protein receptors: some answers and more questions. *Tissue Antigens* *64*, 442-451.
- Biron, C.A., Nguyen, K.B., Pien, G.C., Cousens, L.P., und Salazar-Mather, T.P. (1999). Natural killer cells in antiviral defense: function and regulation by innate cytokines. *Annu Rev Immunol* *17*, 189-220.
- Blachere, N.E., Darnell, R.B., und Albert, M.L. (2005). Apoptotic Cells Deliver Processed Antigen to Dendritic Cells for Cross-Presentation. *PLoS Biol* *3*, e185.
- Blachere, N.E., Li, Z., Chandawarkar, R.Y., Suto, R., Jaikaria, N.S., Basu, S., Udono, H., und 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.
- Bohm, W., Thoma, S., Leithauser, F., Moller, P., Schirmbeck, R., und Reimann, J. (1998). T cell-mediated, IFN-gamma-facilitated rejection of murine B16 melanomas. *J Immunol* *161*, 897-908.
- Brack, C., Hirama, M., Lenhard-Schuller, R., und Tonegawa, S. (1978). A complete immunoglobulin gene is created by somatic recombination. *Cell* *15*, 1-14.
- Brocke, P., Garbi, N., Momburg, F., und Hammerling, G.J. (2002). HLA-DM, HLA-DO and tapasin: functional similarities and differences. *Curr Opin Immunol* *14*, 22-29.
- Burgdorf, S., Kautz, A., Bohnert, V., Knolle, P.A., und Kurts, C. (2007). Distinct pathways of antigen uptake and intracellular routing in CD4 and CD8 T cell activation. *Science* *316*, 612-616.
- Cho, Y., Basta, S., Chen, W., Bennink, J.R., und Yewdell, J.W. (2003). Heat-aggregated noninfectious influenza virus induces a more balanced CD8(+)-T-lymphocyte immunodominance hierarchy than infectious virus. *J Virol* *77*, 4679-4684.
- Clay, T.M., Custer, M.C., Sachs, J., Hwu, P., Rosenberg, S.A., und Nishimura, M.I. (1999). Efficient transfer of a tumor antigen-reactive TCR to human peripheral blood lymphocytes confers anti-tumor reactivity. *J Immunol* *163*, 507-513.
- Cooper, N.R. (1985). The classical complement pathway: activation and regulation of the first complement component. *Adv Immunol* *37*, 151-216.
- Dayan, A.D. (1995). Safety evaluation of biological and biotechnology-derived medicines. *Toxicology* *105*, 59-68.
- Dudley, M.E., und Rosenberg, S.A. (2003). Adoptive-cell-transfer therapy for the treatment of patients with cancer. *Nat Rev Cancer* *3*, 666-675.

- Falo, L.D., Jr., Kovacsovics-Bankowski, M., Thompson, K., und Rock, K.L. (1995). Targeting antigen into the phagocytic pathway in vivo induces protective tumour immunity. *Nat Med* 1, 649-653.
- Faure, O., Graff-Dubois, S., Bretaudeau, L., Derre, L., Gross, D.A., Alves, P.M., Cornet, S., Duffour, M.T., Chouaib, S., Miconnet, I., *et al.* (2004). Inducible Hsp70 as target of anticancer immunotherapy: Identification of HLA-A\*0201-restricted epitopes. *Int J Cancer* 108, 863-870.
- Gao, B., und Tsan, M.F. (2003). Endotoxin contamination in recombinant human heat shock protein 70 (Hsp70) preparation is responsible for the induction of tumor necrosis factor alpha release by murine macrophages. *J Biol Chem* 278, 174-179.
- Gao, B., und Tsan, M.F. (2004). Induction of cytokines by heat shock proteins and endotoxin in murine macrophages. *Biochem Biophys Res Commun* 317, 1149-1154.
- Geissmann, F., Dieu-Nosjean, M.C., Dezutter, C., Valladeau, J., Kayal, S., Leborgne, M., Brousse, N., Saeland, S., und Davoust, J. (2002). Accumulation of immature Langerhans cells in human lymph nodes draining chronically inflamed skin. *J Exp Med* 196, 417-430.
- Gonzalo, J.A., Delaney, T., Corcoran, J., Goodearl, A., Gutierrez-Ramos, J.C., und Coyle, A.J. (2001). Cutting edge: the related molecules CD28 and inducible costimulator deliver both unique and complementary signals required for optimal T cell activation. *J Immunol* 166, 1-5.
- Gordon, S. (2002). Pattern recognition receptors: doubling up for the innate immune response. *Cell* 111, 927-930.
- Gough, P.J., und Gordon, S. (2000). The role of scavenger receptors in the innate immune system. *Microbes Infect* 2, 305-311.
- Groothuis, T.A., und Neefjes, J. (2005). The many roads to cross-presentation. *J Exp Med* 202, 1313-1318.
- Gross, L. (1943). Intradermal Immunization of C3H Mice against a Sarcoma That Originated in an Animal of the Same Line. *Cancer Res* 3, 326-333.
- Grossmann, M.E., Madden, B.J., Gao, F., Pang, Y.P., Carpenter, J.E., McCormick, D., und Young, C.Y. (2004). Proteomics shows Hsp70 does not bind peptide sequences indiscriminately in vivo. *Exp Cell Res* 297, 108-117.
- Guo, M., Gong, S., Maric, S., Misulovin, Z., Pack, M., Mahnke, K., Nussenzweig, M.C., und Steinman, R.M. (2000). A monoclonal antibody to the DEC-205 endocytosis receptor on human dendritic cells. *Hum Immunol* 61, 729-738.
- Harmala, L.A., Ingulli, E.G., Curtsinger, J.M., Lucido, M.M., Schmidt, C.S., Weigel, B.J., Blazar, B.R., Mescher, M.F., und Pennell, C.A. (2002). The adjuvant effects of Mycobacterium tuberculosis heat shock protein 70 result from the rapid and prolonged activation of antigen-specific CD8+ T cells in vivo. *J Immunol* 169, 5622-5629.

- Harty, J.T., Tvinnereim, A.R., und White, D.W. (2000). CD8+ T cell effector mechanisms in resistance to infection. *Annu Rev Immunol* 18, 275-308.
- Heath, W.R., und Carbone, F.R. (2001). Cross-presentation in viral immunity and self-tolerance. *Nat Rev Immunol* 1, 126-134.
- Hennecke, J., und Wiley, D.C. (2001). T cell receptor-MHC interactions up close. *Cell* 104, 1-4.
- Hogquist, K.A., Jameson, S.C., Heath, W.R., Howard, J.L., Bevan, M.J., und Carbone, F.R. (1994). T cell receptor antagonist peptides induce positive selection. *Cell* 76, 17-27.
- Hoshino, K., Takeuchi, O., Kawai, T., Sanjo, H., Ogawa, T., Takeda, Y., Takeda, K., und Akira, S. (1999). Cutting edge: Toll-like receptor 4 (TLR4)-deficient mice are hyporesponsive to lipopolysaccharide: evidence for TLR4 as the Lps gene product. *J Immunol* 162, 3749-3752.
- Jack, D.L., Klein, N.J., und Turner, M.W. (2001). Mannose-binding lectin: targeting the microbial world for complement attack and opsonophagocytosis. *Immunol Rev* 180, 86-99.
- Janeway, C.A., Jr., und Medzhitov, R. (2002). Innate immune recognition. *Annu Rev Immunol* 20, 197-216.
- Janeway, C.A., Travers, P., Walport, M., und Shlomchik, M. (2004). *Immunobiology: The Immune System in Health and Disease*. Garland Science, New York 6. Auflage.
- Johansen, P., Senti, G., Martinez Gomez, J.M., Wuthrich, B., Bot, A., und Kundig, T.M. (2005). Heat denaturation, a simple method to improve the immunotherapeutic potential of allergens. *Eur J Immunol* 35, 3591-3598.
- Jung, S., Unutmaz, D., Wong, P., Sano, G., De los Santos, K., Sparwasser, T., Wu, S., Vuthoori, S., Ko, K., Zavala, F., *et al.* (2002). In vivo depletion of CD11c(+) dendritic cells abrogates priming of CD8(+) T cells by exogenous cell-associated antigens. *Immunity* 17, 211-220.
- Kapsenberg, M.L. (2003). Dendritic-cell control of pathogen-driven T-cell polarization. *Nat Rev Immunol* 3, 984-993.
- Karakawa, W.W., Sutton, A., Schneerson, R., Karpas, A., und Vann, W.F. (1988). Capsular antibodies induce type-specific phagocytosis of capsulated *Staphylococcus aureus* by human polymorphonuclear leukocytes. *Infect Immun* 56, 1090-1095.
- Karre, K. (2002). NK cells, MHC class I molecules and the missing self. *Scand J Immunol* 55, 221-228.
- Kawarada, Y., Ganss, R., Garbi, N., Sacher, T., Arnold, B., und Hammerling, G.J. (2001). NK- and CD8(+) T cell-mediated eradication of established tumors by peritumoral injection of CpG-containing oligodeoxynucleotides. *J Immunol* 167, 5247-5253.

- Keefe, A.D., Wilson, D.S., Seelig, B., und Szostak, J.W. (2001). One-step purification of recombinant proteins using a nanomolar-affinity streptavidin-binding peptide, the SBP-Tag. *Protein Expr Purif* 23, 440-446.
- Kluger, M.J., Singer, R., und Eiger, S.M. (1985). Polymyxin B use does not ensure endotoxin-free solution. *J Immunol Methods* 83, 201-207.
- Kodama, T., Takeda, K., Shimozato, O., Hayakawa, Y., Atsuta, M., Kobayashi, K., Ito, M., Yagita, H., und Okumura, K. (1999). Perforin-dependent NK cell cytotoxicity is sufficient for anti-metastatic effect of IL-12. *Eur J Immunol* 29, 1390-1396.
- Komar, A.A., Lesnik, T., und Reiss, C. (1999). Synonymous codon substitutions affect ribosome traffic and protein folding during in vitro translation. *FEBS Lett* 462, 387-391.
- Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
- Laird, P.W., Zijderveld, A., Linders, K., Rudnicki, M.A., Jaenisch, R., und Berns, A. (1991). Simplified mammalian DNA isolation procedure. *Nucleic Acids Res* 19, 4293.
- Lankat-Buttgereit, B., und Tampe, R. (2002). The transporter associated with antigen processing: function and implications in human diseases. *Physiol Rev* 82, 187-204.
- Lehner, T., Bergmeier, L.A., Wang, Y., Tao, L., Sing, M., Spallek, R., und van der Zee, R. (2000). Heat shock proteins generate beta-chemokines which function as innate adjuvants enhancing adaptive immunity. *Eur J Immunol* 30, 594-603.
- Leonard, W.J., und O'Shea, J.J. (1998). Jaks and STATs: biological implications. *Annu Rev Immunol* 16, 293-322.
- Li, Q., und Chang, A.E. (1999). Adoptive T-cell immunotherapy of cancer. *Cytokines Cell Mol Ther* 5, 105-117.
- Li, Z., und Srivastava, P.K. (1993). Tumor rejection antigen gp96/grp94 is an ATPase: implications for protein folding and antigen presentation. *Embo J* 12, 3143-3151.
- Lieberman, J. (2003). The ABCs of granule-mediated cytotoxicity: new weapons in the arsenal. *Nat Rev Immunol* 3, 361-370.
- Linderoth, N.A., Popowicz, A., und Sastry, S. (2000). Identification of the peptide-binding site in the heat shock chaperone/tumor rejection antigen gp96 (Grp94). *J Biol Chem* 275, 5472-5477.
- Lindquist, S., und Craig, E.A. (1988). The heat-shock proteins. *Annu Rev Genet* 22, 631-677.
- Liu, H., Wu, B.H., Rowse, G.J., und Emtage, P.C. (2007). Induction of CD4-independent E7-specific CD8+ memory response by heat shock fusion protein. *Clin Vaccine Immunol* 14, 1013-1023.

- Lohmann, T., Leslie, R.D., und Londei, M. (1996). T cell clones to epitopes of glutamic acid decarboxylase 65 raised from normal subjects and patients with insulin-dependent diabetes. *J Autoimmun* *9*, 385-389.
- Lutz, M.B., Kukutsch, N., Ogilvie, A.L., Rossner, S., Koch, F., Romani, N., und Schuler, G. (1999). An advanced culture method for generating large quantities of highly pure dendritic cells from mouse bone marrow. *J Immunol Methods* *223*, 77-92.
- Ma, H., und Kapp, J.A. (2001). Peptide affinity for MHC influences the phenotype of CD8(+) T cells primed in vivo. *Cell Immunol* *214*, 89-96.
- MacAry, P.A., Javid, B., Floto, R.A., Smith, K.G., Oehlmann, W., Singh, M., und Lehner, P.J. (2004). HSP70 peptide binding mutants separate antigen delivery from dendritic cell stimulation. *Immunity* *20*, 95-106.
- Magalhaes, P.O., Lopes, A.M., Mazzola, P.G., Rangel-Yagui, C., Penna, T.C., und Pessoa, A., Jr. (2007). Methods of endotoxin removal from biological preparations: a review. *J Pharm Pharm Sci* *10*, 388-404.
- Mahnke, K., Qian, Y., Fondel, S., Brueck, J., Becker, C., und Enk, A.H. (2005). Targeting of antigens to activated dendritic cells in vivo cures metastatic melanoma in mice. *Cancer Res* *65*, 7007-7012.
- Marshak-Rothstein, A., Fink, P., Gridley, T., Raulet, D.H., Bevan, M.J., und Geffer, M.L. (1979). Properties and applications of monoclonal antibodies directed against determinants of the Thy-1 locus. *J Immunol* *122*, 2491-2497.
- Massa, C., Melani, C., und Colombo, M.P. (2005). Chaperon and adjuvant activity of hsp70: different natural killer requirement for cross-priming of chaperoned and bystander antigens. *Cancer Res* *65*, 7942-7949.
- Medana, I.M., Gallimore, A., Oxenius, A., Martinic, M.M., Wekerle, H., und Neumann, H. (2000). MHC class I-restricted killing of neurons by virus-specific CD8+ T lymphocytes is effected through the Fas/FasL, but not the perforin pathway. *Eur J Immunol* *30*, 3623-3633.
- Moore, M.W., Carbone, F.R., und Bevan, M.J. (1988). Introduction of soluble protein into the class I pathway of antigen processing and presentation. *Cell* *54*, 777-785.
- Moroi, Y., Mayhew, M., Trcka, J., Hoe, M.H., Takechi, Y., Hartl, F.U., Rothman, J.E., und 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.
- Morrison, D.C., und Jacobs, D.M. (1976). Binding of polymyxin B to the lipid A portion of bacterial lipopolysaccharides. *Immunochemistry* *13*, 813-818.
- Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G., und Erlich, H. (1986). Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* *51 Pt 1*, 263-273.

- Nieland, T.J., Tan, M.C., Monne-van Muijen, M., Koning, F., Kruisbeek, A.M., und van Bleek, G.M. (1996). Isolation of an immunodominant viral peptide that is endogenously bound to the stress protein GP96/GRP94. *Proc Natl Acad Sci U S A* *93*, 6135-6139.
- O'Sullivan, B., und Thomas, R. (2003). CD40 and dendritic cell function. *Crit Rev Immunol* *23*, 83-107.
- Ornstein, L. (1964). Disc Electrophoresis. I. Background and Theory. *Ann N Y Acad Sci* *121*, 321-349.
- Palladino, M.A., Jr., Srivastava, P.K., Oettgen, H.F., und DeLeo, A.B. (1987). Expression of a shared tumor-specific antigen by two chemically induced BALB/c sarcomas. *Cancer Res* *47*, 5074-5079.
- Pardoll, D.M. (2000). Therapeutic vaccination for cancer. *Clin Immunol* *95*, S44-62.
- Pardoll, D.M. (2002). Spinning molecular immunology into successful immunotherapy. *Nat Rev Immunol* *2*, 227-238.
- Parmiani, G., De Filippo, A., Pilla, L., Castelli, C., und Rivoltini, L. (2006). Heat shock proteins gp96 as immunogens in cancer patients. *Int J Hyperthermia* *22*, 223-227.
- Prevost-Blondel, A., Zimmermann, C., Stemmer, C., Kulmburg, P., Rosenthal, F.M., und Pircher, H. (1998). Tumor-infiltrating lymphocytes exhibiting high ex vivo cytolytic activity fail to prevent murine melanoma tumor growth in vivo. *J Immunol* *161*, 2187-2194.
- Reed, R.C., Berwin, B., Baker, J.P., und Nicchitta, C.V. (2003). GRP94/gp96 elicits ERK activation in murine macrophages. A role for endotoxin contamination in NF-kappa B activation and nitric oxide production. *J Biol Chem* *278*, 31853-31860.
- Roche, E.D., und Sauer, R.T. (1999). SsrA-mediated peptide tagging caused by rare codons and tRNA scarcity. *Embo J* *18*, 4579-4589.
- Schatz, D.G., Oettinger, M.A., und Schlissel, M.S. (1992). V(D)J recombination: molecular biology and regulation. *Annu Rev Immunol* *10*, 359-383.
- Schirmbeck, R., Bohm, W., Melber, K., und Reimann, J. (1995). Processing of exogenous heat-aggregated (denatured) and particulate (native) hepatitis B surface antigen for class I-restricted epitope presentation. *J Immunol* *155*, 4676-4684.
- Singh, G., Singh, B., Trajkovic, V., und Sharma, P. (2005). Mycobacterium tuberculosis 6 kDa early secreted antigenic target stimulates activation of J774 macrophages. *Immunol Lett* *98*, 180-188.
- 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., *et al.* (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.

- Speidel, K., Osen, W., Faath, S., Hilgert, I., Obst, R., Braspenning, J., Momburg, F., Hammerling, G.J., und Rammensee, H.G. (1997). Priming of cytotoxic T lymphocytes by five heat-aggregated antigens in vivo: conditions, efficiency, and relation to antibody responses. *Eur J Immunol* *27*, 2391-2399.
- Srivastava, P. (2002a). Interaction of heat shock proteins with peptides and antigen presenting cells: chaperoning of the innate and adaptive immune responses. *Annu Rev Immunol* *20*, 395-425.
- Srivastava, P. (2002b). Roles of heat-shock proteins in innate and adaptive immunity. *Nat Rev Immunol* *2*, 185-194.
- Srivastava, P.K. (1993). Peptide-binding heat shock proteins in the endoplasmic reticulum: role in immune response to cancer and in antigen presentation. *Adv Cancer Res* *62*, 153-177.
- Srivastava, P.K., und Das, M.R. (1984). The serologically unique cell surface antigen of Zajdela ascitic hepatoma is also its tumor-associated transplantation antigen. *Int J Cancer* *33*, 417-422.
- Srivastava, P.K., Menoret, A., Basu, S., Binder, R.J., und 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., und Old, L.J. (1988). Individually distinct transplantation antigens of chemically induced mouse tumors. *Immunol Today* *9*, 78-83.
- Storni, T., und Bachmann, M.F. (2004). Loading of MHC class I and II presentation pathways by exogenous antigens: a quantitative in vivo comparison. *J Immunol* *172*, 6129-6135.
- Suzue, K., und Young, R.A. (1996). Adjuvant-free hsp70 fusion protein system elicits humoral and cellular immune responses to HIV-1 p24. *J Immunol* *156*, 873-879.
- Suzue, K., Zhou, X., Eisen, H.N., und Young, R.A. (1997). Heat shock fusion proteins as vehicles for antigen delivery into the major histocompatibility complex class I presentation pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* *94*, 13146-13151.
- Takai, T. (1996). Multiple loss of effector cell functions in FcR gamma-deficient mice. *Int Rev Immunol* *13*, 369-381.
- Tamura, Y., Peng, P., Liu, K., Daou, M., und Srivastava, P.K. (1997). Immunotherapy of tumors with autologous tumor-derived heat shock protein preparations. *Science* *278*, 117-120.
- Tan, J.T., Whitmire, J.K., Ahmed, R., Pearson, T.C., und Larsen, C.P. (1999). 4-1BB ligand, a member of the TNF family, is important for the generation of antiviral CD8 T cell responses. *J Immunol* *163*, 4859-4868.

- Tobian, A.A., Harding, C.V., und Canaday, D.H. (2005). Mycobacterium tuberculosis heat shock fusion protein enhances class I MHC cross-processing and -presentation by B lymphocytes. *J Immunol* *174*, 5209-5214.
- Tomlinson, S. (1993). Complement defense mechanisms. *Curr Opin Immunol* *5*, 83-89.
- Triantafilou, K., Triantafilou, M., Ladha, S., Mackie, A., Dedrick, R.L., Fernandez, N., und Cherry, R. (2001). Fluorescence recovery after photobleaching reveals that LPS rapidly transfers from CD14 to hsp70 and hsp90 on the cell membrane. *J Cell Sci* *114*, 2535-2545.
- Tsan, M.F., und Gao, B. (2004). Cytokine function of heat shock proteins. *Am J Physiol Cell Physiol* *286*, C739-744.
- Turley, S.J., Inaba, K., Garrett, W.S., Ebersold, M., Unternaehrer, J., Steinman, R.M., und Mellman, I. (2000). Transport of peptide-MHC class II complexes in developing dendritic cells. *Science* *288*, 522-527.
- Udono, H., Levey, D.L., und Srivastava, P.K. (1994). Cellular requirements for tumor-specific immunity elicited by heat shock proteins: tumor rejection antigen gp96 primes CD8+ T cells in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* *91*, 3077-3081.
- Udono, H., Saito, T., Ogawa, M., und Yui, Y. (2004). Hsp-antigen fusion and their use for immunization. *Methods* *32*, 21-24.
- Udono, H., und Srivastava, P.K. (1993). Heat shock protein 70-associated peptides elicit specific cancer immunity. *J Exp Med* *178*, 1391-1396.
- Udono, H., Yamano, T., Kawabata, Y., Ueda, M., und Yui, K. (2001). Generation of cytotoxic T lymphocytes by MHC class I ligands fused to heat shock cognate protein 70. *Int Immunol* *13*, 1233-1242.
- Ullrich, S.J., Robinson, E.A., Law, L.W., Willingham, M., und Appella, E. (1986). A mouse tumor-specific transplantation antigen is a heat shock-related protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* *83*, 3121-3125.
- Wallin, R.P., Lundqvist, A., More, S.H., von Bonin, A., Kiessling, R., und Ljunggren, H.G. (2002). Heat-shock proteins as activators of the innate immune system. *Trends Immunol* *23*, 130-135.
- Walter, S., und Buchner, J. (2002). Molecular chaperones--cellular machines for protein folding. *Angew Chem Int Ed Engl* *41*, 1098-1113.
- Wan, T., Zhou, X., Chen, G., An, H., Chen, T., Zhang, W., Liu, S., Jiang, Y., Yang, F., Wu, Y., *et al.* (2004). Novel heat shock protein Hsp70L1 activates dendritic cells and acts as a Th1 polarizing adjuvant. *Blood* *103*, 1747-1754.



Warger, T., Hilf, N., Rechtsteiner, G., Haselmayer, P., Carrick, D.M., Jonuleit, H., von Landenberg, P., Rammensee, H.G., Nicchitta, C.V., Radsak, M.P., *et al.* (2006). Interaction of TLR2 and TLR4 ligands with the N-terminal domain of Gp96 amplifies innate and adaptive immune responses. *J Biol Chem* *281*, 22545-22553.

Wu, Y., Wan, T., Zhou, X., Wang, B., Yang, F., Li, N., Chen, G., Dai, S., Liu, S., Zhang, M., *et al.* (2005). Hsp70-like protein 1 fusion protein enhances induction of carcinoembryonic antigen-specific CD8<sup>+</sup> CTL response by dendritic cell vaccine. *Cancer Res* *65*, 4947-4954.

Xue, S.A., und Stauss, H.J. (2007). Enhancing immune responses for cancer therapy. *Cell Mol Immunol* *4*, 173-184.

Ye, Z., und Gan, Y.H. (2007). Flagellin contamination of recombinant heat shock protein 70 is responsible for its activity on T cells. *J Biol Chem* *282*, 4479-4484.

Zhang, M., Tang, H., Guo, Z., An, H., Zhu, X., Song, W., Guo, J., Huang, X., Chen, T., Wang, J., *et al.* (2004). Splenic stroma drives mature dendritic cells to differentiate into regulatory dendritic cells. *Nat Immunol* *5*, 1124-1133.

## 8. Abkürzungsverzeichnis

Ag	Antigen
APC	Antigen presenting cell (Antigen-präsentierende Zelle)
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
BMDC	Bone Marrow-derived Dendritic Cell (dendritische Zelle aus dem Knochenmark)
BSA	Bovine Serum Albumin (Rinderserumalbumin)
cDNA	complementary DNA (Komplementäre DNA)
CIP	Calf Intestinal Alkaline Phosphatase (alkalische Phosphatase vom Kalb)
Da	Dalton
DC	Dendritic Cell (dendritische Zelle)
DMEM	Dulbecco's modifiziertes Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Deoxyribonucleic acid (Desoxyribonukleinsäure)
dNTP	Desoxy-Nukleotidtriphosphat
DPBS	Dulbecco's PBS
EDTA	Ethylene-Diamine-Tetra-Acetic acid (-Essigsäure)
EU	Endotoxin Unit
FACS	Fluorescence-activated cell sorting
FCS	Fetal Calf Serum (Fötales Kälberserum)
h	hour (Stunde)
HEPES	N-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-N'-(2-ethan-sulfonic acid) (-(2-Hydroxyethyl)-piperacin-N'-(2-ethansulfon-säure)
His6	Hexa-Histidin
HSC	<i>heat shock cognate protein</i>
HSP	Hitze-Schock-Protein
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin

---

kb	Kilobasen
kDa	Kilo-Dalton
LB	Luria-Bertani (originale Abkürzung: lysogeny broth)
LPS	Lipopolysaccharid
m	Maus-, murin-
MFI	mittlere Fluoreszenzintensität
min	Minuten
mtub	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
NK-Zelle	natürliche Killerzelle
OD	Optische Dichte
OVA	Ovalbumin
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PAMP	<i>pathogen associated molecular patterns</i>
PRR	<i>pattern recognition receptors</i>
PVDF	Polyvinylidendifluorid
rOVA	rekombinantes Ovalbumin-Fragment (enthält aa146-359 von OVA)
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
RT	Raumtemperatur
S8L	SIINFEKL-Peptid
SDS	Sodium dodecyl sulfate (Natriumdodecylsulfat)
sec	seconds (Sekunden)
SOB	Super Optimal Broth
SOC	Super Optimal Broth for Catobolite repression
TAA	Tumor-assoziiertes Antigen
TAP	<i>Transporter associated with Antigen Processing</i>
TCR	<i>T-Cell receptor</i> (T-Zell Rezeptor)
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylenethylendiamin
TLR	Toll-like receptor
TNF $\alpha$	Tumor-Nekrosefaktor- $\alpha$
Tris	Trihydroxymethylaminomethan
Upm	Umdrehungen pro Minute

## Anhang

### Proteinsequenzen der N-terminalen His6-tag HSP-Antigen-Fusionsproteine

#### Legende:

**Blau:** Hexa-Histidin-tag  
**Lila:** Xpress Epitop und Enterokinase-Schnittstelle (fett hervorgehoben)  
**Orange:** HSP-Sequenz  
**Rot:** OVA-Fragment (fett hervorgehoben ist das H-2K<sup>b</sup> Epitop und das I-A<sup>b</sup> Epitop)  
**Grün:** SBP-tag

#### rOVA

MRGSHHHHHHGMASMTGGQQMGRDLY**DDDDK**DPSSRSAAGTMEFINSWVESQTNGIIRNVLQPSVDSQTAMVLVNAIVFKGLWEKT  
 FKDEDTQAMPFRVTEQESKPVQMMYQIGLFRVASMASEKMKILEL**PFASGTMSMLVLLPDEVSGLEQLESIINFEKL**TEWTSNVMEERK  
 IKVYLPRMKMEEKYNLTSVLMAMSITDVFSANLGGISSAESLKIS**QAVHAAHAEINEAGREVV**GSAEAGVDAASVSE**EFGSDEKTTGW**  
 RGGHVVEGLAGELEQLRARLEHHPQGGQREPSSSGGSKLG

Molekulargewicht: 36398.06 Da  
 Anzahl Aminosäuren: 334  
 Isolelektrischer Punkt: 5.195  
 Ladung bei pH 7.0: -14.119

#### mtubHsp70-OVA

MRGSHHHHHHGMASMTGGQQMGRDLY**DDDDK**DPSSRMEVQKDVLLLDVTPLSLGIETKGGVMTRLIERNTTIPTKRSETFTTADDNQPS  
 VQIQVYQGEREIAAHNKLKLSFELTGIPPAPRGIPQIEVTFDIDANGIVHVTAKDKGTGKENTIRIQEGSGLSKEDIDRMKIDAEAHAEEDRK  
 RREEADVRNQAETLVYQTEKFVKEQREAEAGGSKVPEDTLNKVDAVAEAKAALGGSDISAISAMEKLGQESQALGQAIYEAQAASQA  
 TGAHPGGEPGGAHPGSADSMEFINSWVESQTNGIIRNVLQPSVDSQTAMVLVNAIVFKGLWEKTFKDEDTQAMPFRVTEQESKPVQ  
 MMYQIGLFRVASMASEKMKILEL**PFASGTMSMLVLLPDEVSGLEQLESIINFEKL**TEWTSNVMEERKIKVYLPRMKMEEKYNLTSVLMAM  
 SITDVFSANLGGISSAESLKIS**QAVHAAHAEINEAGREVV**GSAEAGVDAASVSE**EFGSDEKTTGWRGGHVVEGLAGELEQLRARLEHH**  
 PQGGQREPSSSGGSKLG

Molekulargewicht: 60242.58 Da  
 Anzahl Aminosäuren: 555  
 Isolelektrischer Punkt: 4.978  
 Ladung bei pH 7.0: -26.306

#### mHsp70-OVA

MRGSHHHHHHGMASMTGGQQMGRDLY**DDDDK**DPSSRMAKNTAIGIDLGTTYSCVGVFQHGKVEIANDQGNRTTPSYVAFTDTERLIG  
 DAAKNQVALNPQNTVFDKRLIGRKFQGDVAVQSDMKHWPQVNDGDKPKVQVNYKGESRSFFPEISSMVLTKMKEIAEAYLGHVPTN  
 AVITVPAYFNDSQRQATKDAGVIAGLNVLRINEPTAAAIYGLDRTGKGERNVLIFDLGGGTFDVSILTIDDGIFEVKATAGDTHLGGEDFD  
 NRLVSHFVEEFKRKHKKDISQNKRAVRRRLTACERAKRTLSSSTQASLEIDSLFEGIDFYTSITRARFEELCSDLFRGTLEPVEKALRDAKM  
 DKAQIHDLVVGSTRIKPVQKLLQDFNFRDLNKSINPDEAVAYGAAVQAAILMGDKSENVQDLLLLDVAPLSLGLLETAGGVMTALIKRN  
 STIPTKQTQFTTYSQNPQGVLIQVYEGERAMTRDNNLLGRFELSGIPPAPRGVQIEVTFDIDANGILNVATDKTTGKANKITITNDKGR  
 SKEEIERMVQEAERYKAEDVQRDRVAAKNALESYAFNMKSAVEDEGLGKGLSEADKKVLDKCQEVISWLDNSNTLADKEEFVHKREEL  
 ERVCSPIISGLYQGAGAPGAGGFGAQAQPKGASGSGPTIEEVD**G**TMEFINSWVESQTNGIIRNVLQPSVDSQTAMVLVNAIVFKGLWEKT  
 FKDEDTQAMPFRVTEQESKPVQMMYQIGLFRVASMASEKMKILEL**PFASGTMSMLVLLPDEVSGLEQLESIINFEKL**TEWTSNVMEERK  
 IKVYLPRMKMEEKYNLTSVLMAMSITDVFSANLGGISSAESLKIS**QAVHAAHAEINEAGREVV**GSAEAGVDAASVSE**EFGSDEKTTGW**  
 RGGHVVEGLAGELEQLRARLEHHPQGGQREPSSSGGSKLG

Molekulargewicht: 103425.90 Da  
 Anzahl Aminosäuren: 944  
 Isolelektrischer Punkt: 5.366  
 Ladung bei pH 7.0: -22.931

## mHsc70-OVA

MRGSHHHHHHGMASMTGGQQMGRDLYDDDDKDPSSRMSKGPVAVGIDLTGTTYSVGVFQHGKVEIANDQGNRTTPSYVAFTDTERLI  
 GDAAKNQVAMNPTNTVFDARLIGRRFDDAVVQSDMKHWPFMVNDAGRPKVQVEYKGETKSFYPEEVSSMVLTKMKEIAEAYLGKTV  
 TNAVVTVPAYFNDSQRQATKDAGTIAGLNLVRIINEPTAAAIAYGLDKKVGAEARNVLIQDLGGGTFDVSILTIEDGIFEVKSTAGDTHLGGED  
 FDNRMVNHFAIEFKRKHKKDISENKRVRRLRTACERAKRTLSSSTQASIEIDSLYEGIDFYTSITRARFEELNADLFRGTLDPVEKALRDAK  
 LDKSQIHDIQVGGSTRIPKIQKLLQDFFNGKELNKSINPDEAVAYGAAVQAAILSGDKSENVQDLLLLLDVTPLSLGIETAGGVMTVLIKRNTT  
 IPTKQTQTFTTYSDNQPGVLIQVYEGERAMTKDNNLLGKFELTGIPPAPRGVVPQIEVTFDIDANGILNVSVDKSTGKENKITITNDKGRLSK  
 EDIERMVQEAKEYKAEDEKQRDKVSSKNSLESYAFNMKATVEDEKLQGGKINDEDKQKILDKCNELISWLDKNQTAEEKEFEHQKKELEKV  
 CNPIITKLYQSAGGMPGGMPGGFPGGGAPPSSGGASSGPTIEEVDGTMEFINSWVESQTNGIIRNVLQPSVDSQTAMVLVNAIVFKGLW  
 EKTFKDEDTQAMPFRVTEQESKPVQMMYQIGLFRVASMASEKMKILELPFASGTMSMLVLLPDEVSGLEQLESIIINFEKLTWETSSNVME  
 ERKIKVYLPRMKMEEKYNLTSVLMAMSIIDVFSSANLSGISSAESLKISQAVHAAHAEINEAGREVVGSAEAGVDAASVSEEFGSDEKTT  
 GWRGGHVVEGLAGELEQLRARLEHHPQQQREPSSSGGSKLG

Molekulargewicht: 104203.76 Da

Anzahl Aminosäuren: 949

Isolelektrischer Punkt: 5.262

Ladung bei pH 7.0: -25.069

## mHsp70L1-OVA

MRGSHHHHHHGMASMTGGQQMGRDLYDDDDKDPSSRMAAIGVHLGCTSAACVAVYKDGRAVDVANDAGDRVTPAIVAYSEREQVWGL  
 AAKQSRIRHVSSTVVKVKQILGRSSADPQAQKYISESKCLVIEKNGKLYEIDTGEETKLVNPDVARLIFSKMKETAHSVLSGSDANDVVVT  
 VPFDFGEKQKQKALGEEAAGFNVLRLIHEPSAALLAYGIGQDHTGKSNVLFKGGTSLSLVMEVNSGMVYRVLSTNTSDNIGGAHFT  
 DTLARYLASEFQRLFKHDVRGNARAMMKLMNSAEVAKHSLSTLGSANCFVDSLIEGQDFDCNVSRARFELLCSPLFNKCTEAIRELLRQ  
 TGFTADDINKVVLGGSSRIPKLLQKIDLPFPAVDLLNSIPPDEVIPIGAAIEAGILVGKESTSGDSSVMIECSAKDILVKGVDSESGADRFTVL  
 FPSGTPLPARRQHTLQAPGRVSSVCELELYESEKNSAKEEAKFAQVVLQDLKKNGLRDILAVLTMKRDGSLQVTCTDQDTGKCEAITV  
 EVASMEFINSWVESQTNGIIRNVLQPSVDSQTAMVLVNAIVFKGLWEKTFKDEDTQAMPFRVTEQESKPVQMMYQIGLFRVASMASEK  
 MKILELPFASGTMSMLVLLPDEVSGLEQLESIIINFEKLTWETSSNVMEERKIKVYLPRMKMEEKYNLTSVLMAMSIIDVFSSANLSGISSA  
 ESLKISQAVHAAHAEINEAGREVVGSAEAGVDAASVSEEFGSDEKTTGWRGGHVVEGLAGELEQLRARLEHHPQQQREPSSSGGSKL  
 G

Molekulargewicht: 87852.91 Da

Anzahl Aminosäuren: 810

Isolelektrischer Punkt: 5.483

Ladung bei pH 7.0: -20.005

## Proteinsequenzen der C-terminalen His6-tag HSP-Antigen-Fusionsproteine

### Legende:

Hellblau: T7-tag  
 Orange: HSP-Sequenz  
 Rot: OVA-Fragment (fett hervorgehoben ist das H-2K<sup>b</sup> Epitop und das I-A<sup>b</sup> Epitop)  
 Lila: Enterokinase-Schnittstelle  
 Grün: SBP-tag  
 Blau: Hexa-Histidin-tag

### rOVA

MASMTGGQQMGRISSRSAACTMEFINSWVESQTNGIIRNVLPSSVDSQTAMVLVNAIVFKGLWEKTFKDEDTQAMPFRVTEQESKPVQ  
 MMYQIGLFRVASMASEKMKILELPFASGTMSMLVLLPDEVSGLEQLE**SIINFEKLT**EWTSNNVMEERKIKVYLPKMKMEEKYNLTSVLMAM  
 SITDVFSSSANLSGISSAESLK**ISQAVHAAHAEINEAGRE**EVVGSAAEAGVDAASVSEEFGSDDDDK**TTGWRGGHVVEGLAGELEQLRRL**  
**EHHHPQGQREPVEHHHHHHH**

Molekulargewicht: 31695.93 Da  
 Anzahl Aminosäuren: 287  
 Isolelektrischer Punkt: 5.171  
 Ladung bei pH 7.0: -13.195

### mtubHsp70-OVA

MASMTGGQQMGRISSRMEVKDVLVLLDVTPLSLGIETKGGVMTRLIERNTTIPTKRSETFTTADDNQPSVQIQVYQGEREIAAHNKLGSFE  
 LTGIPPAPRGIPQIEVTFDIDANGIVHVTAKDKGTGKENTIRIQEGSGLSKEDIDRMIDAEAAHAEEDRKRREEADVRNQAETLVYQTEKFKV  
 EQREAEGGSKVPEDTLNKVDAVAEAKAALGGSDISAISAMEKLGQESQALGQAIYEAQAASQATGAAHPGGEPGGAHPPGSADESME  
 FINSWVESQTNGIIRNVLPSSVDSQTAMVLVNAIVFKGLWEKTFKDEDTQAMPFRVTEQESKPVQMMYQIGLFRVASMASEKMKILELP  
 FASGTMSMLVLLPDEVSGLEQLE**SIINFEKLT**EWTSNNVMEERKIKVYLPKMKMEEKYNLTSVLMAMSIITDVFSSSANLSGISSAESLK**ISQ**  
**AVHAAHAEINEAGRE**EVVGSAAEAGVDAASVSEEFGSDDDDK**TTGWRGGHVVEGLAGELEQLRRL****EHHHPQGQREPVEHHHHHHH**

Molekulargewicht: 58358.62 Da  
 Anzahl Aminosäuren: 536  
 Isolelektrischer Punkt: 4.971  
 Ladung bei pH 7.0: -26.305

### mHsp70-OVA

MASMTGGQQMGRISSRMAKNTAIGIDLTTYSCVGVFQHGKVEIANDQGNRTTPSYVAFTDTERLIGDAAKNQVALNPQNTVFDARLI  
 GRKFGDAVVQSDMKHWPFQVNDGDKPKVQVNYKGESRSFFPEEISSMVLTKMKEIAEAYLGHPVTNAVITVPAYFNDSQRQATKDAG  
 VIAGLNVLRINEPTAAAIAYGLDRTGKGERNVLIFFDLGGGTFDVSILTIDDGIFEVKATAGDTHLGGEDFDNRLVSHFVEEFKRRKHKKDISQN  
 KRAVRRRLTACERAKRTLSSSTQASLEIDSLFEGIDFYTSITRARFEELCSDLFRGTLEPVEKALRDAKMDKAQIHDVLVGGSTRIPKVQK  
 LLQDFNFGRDLNKSINPDEAVAYGAAVQAAILMGDKSENVQDLLLLDVAPLSLGLLETAGGVMTALIKRNSTIPTKQTQTFTTYSNQPGLI  
 QVYEGERAMTRDNNLLGRFELSGIPPAPRGVQIEVTFDIDANGILNVTATDKTTGKANKITITNDKGRLSKEEIERMVQEAERYKAEDVQ  
 RDRVAAKNALESYAFNMKSAVEDEGLKGLSEADKKKVLDKCQEVISWLDSENTLADKEEFVHKREELERVCSPIISGLYQGAGAPGAGGF  
 GAQAPKGASGSGPTIEEVDGTMEFINSWVESQTNGIIRNVLPSSVDSQTAMVLVNAIVFKGLWEKTFKDEDTQAMPFRVTEQESKPVQ  
 MMYQIGLFRVASMASEKMKILELPFASGTMSMLVLLPDEVSGLEQLE**SIINFEKLT**EWTSNNVMEERKIKVYLPKMKMEEKYNLTSVLMAM  
 SITDVFSSSANLSGISSAESLK**ISQAVHAAHAEINEAGRE**EVVGSAAEAGVDAASVSEEFGSDDDDK**TTGWRGGHVVEGLAGELEQLRRL**  
**EHHHPQGQREPVEHHHHHHH**

Molekulargewicht: 101541.94 Da  
 Anzahl Aminosäuren: 925  
 Isolelektrischer Punkt: 5.362  
 Ladung bei pH 7.0: -22.930

## mHsc70-OVA

MASMTGGQQMGRISSRMSKGPVAVGIDLGTTYSCVGVFQHGKVEIANDQGNRTTPSYVAFTDTERLIGDAAKNQVAMNPTNTVFDARLI  
 GRRFDDAVVQSDMKHWPFMVDNDAGRPKVQVEYKGETKSFYPEEVSSMVLTKMKEIAEAYLGKVTNAVVTVPAYFNDSQRQATKDA  
 GTIAGLNVLRINEPTAAAIAYGLDKKVGAEARNVLFIDLGGGTFDVSILTIEDGIFEVKSTAGDTHLGGEDFDNRMVNHFAIEFKRKHKKDISE  
 NKRAVRRRLTACERAKRTLSSTQASIEIDSLYEGIDFYTSITRARFEELNADLFRGTLDPVEKALRDAKLDKSIHQHDIIVLVGGSTRIPKIQKL  
 LQDFFNGKELNKSINPDEAVAYGAAVQAAILSGDKSENVQDLLLLDVTPLSLGIETAGGVMTVLIKRNTTIPTKQTQFTTYSNQPGLVIQV  
 YEGERAMTKDNNLLGKFFELTGPPAPRGVQIEVTFDIDANGILNVSADVKTSGKENKITITNDKGRLSKEDIERMVQEAKEYKADEKQRD  
 KVSSKNSLESYAFNMKATVEDEKLGKINDEDKQKILDKCNELISWLDKNQTAEEKEEFHQKQKELEKVCNPIITKLYQSAGGMPGGMPGG  
 FPGGGAPPSGGASSGPTIEEVDGTMFEFINSWVESQTNIGIIRNVLQPSVSDQTAMVLVNAIVFKGLWEKTFKDEDTQAMPFRVTEQESK  
 PVQMMYQIGLFRVASMASEKMKILELPPFASGTMSMLVLLPDEVSGLEQLESIINFEKLEWTSNVMEERKIKVYLPRMKMEEKYNLTSVL  
 MAMSIDVFSSANLGGISSAESLKISQAVHAAHAINEAGREVVGSAEAGVDAASVSEEFSGDDDDKTTGWRGGHVVVEGLAGELEQLR  
 ARLEHHPQGQREPVEHHHHHH

Molekulargewicht: 102319.79 Da  
 Anzahl Aminosäuren: 930  
 Isolelektrischer Punkt: 5.258  
 Ladung bei pH 7.0: -25.068

## mHsp70L1-OVA

MASMTGGQQMGRISSRMAAIGVHLGCTSACVAVYKDGRAVDVANDAGDRVTPAIVAYSEREQVWGLAAKQSRIRHVSSTVVKVKILGR  
 SSADPQAQKYISESKCLVIEKNGKLYEIDTGEETKLVNPEVARLIFSKMKETAHSVLSGSDANDVVVTPVDFGEEKQSALGEAAGAAGF  
 NVLRLIHEPSAALLAYGIGQDHTGKSNVLFKLGSTLSLSVMEVNSGMRYVLSNTSDNIGGAHFTDLARYLASEFQRLFKHVDVRGN  
 ARAMMKLMNSAEVAKHSLSTLGSANCFVDSLVEGQDFCNVSRARFELLCSPFNKCTEAIRELLRQTGFADDINKVVLCCGSSRIPKL  
 QQLIKDLFPVAVDLLNSIPPDEVIPIGAAIEAGILVKGESTSGDSSVMIECSAKDILVKGVDSESGADRFTVLFPSGTPLPARRQHTLQAPGRVS  
 SVCLELYESEGKNSAKEEAKFAQVVLQDLDDKENGRLDILAVLTMKRDGSLQVTCDDQDTGKCEAITVEVASMMEFINSWVESQTNIGIIR  
 NVLQPSVSDQTAMVLVNAIVFKGLWEKTFKDEDTQAMPFRVTEQESKPVQMMYQIGLFRVASMASEKMKILELPPFASGTMSMLVLLPD  
 EVSGLEQLESIINFEKLEWTSNVMEERKIKVYLPRMKMEEKYNLTSVLMAMSIDVFSSANLGGISSAESLKISQAVHAAHAINEAGR  
 EVVGSAEAGVDAASVSEEFSGDDDDKTTGWRGGHVVVEGLAGELEQLRARLEHHPQGQREPVEHHHHHH

Molekulargewicht: 86100.15 Da  
 Anzahl Aminosäuren: 792  
 Isolelektrischer Punkt: 5.480  
 Ladung bei pH 7.0: -20.004

## mtubHsp70

MASMTGGQQMGRISSRMEVKDVLVLLDVTPLSLGIETKGGVMTRLIERNTTIPTKRSETFTTADDNQPSVQIQVYQGEREIAAHNKLKLSFE  
 LTGIPPAPRGIPQIEVTFDIDANGIVHVTAKDKGTGKENTIRIQEGSGLSKEDIDRMIKDAEAAHAEDRKRREEADVRNQAETLVYQTEKQVFK  
 EQREAEGGSKVPEDTLNKVDAVAEAKAALGGSDISAIKSAMEKLGQESQALGQAIYEAQAASQATGAAHPGGEPGGAHPGSADSME  
 FGSDDDDKTTGWRGGHVVVEGLAGELEQLRARLEHHPQGQREPVEHHHHHH

Molekulargewicht: 34723.48 Da  
 Anzahl Aminosäuren: 322  
 Isolelektrischer Punkt: 5.230  
 Ladung bei pH 7.0: -15.685

## mHsp70

MASMTGGQQMGRISSRMAKNTAIGIDLTTYSCVGVFQHGKVEIANDQGNRTTPSYVAFTDTERLIGDAAKNQVALNPQNTVFDARLI  
 GRKFGDAVVQSDMKHWPFQVVDNDGDKPKVQVNYKGESRFFPEEISSMVLTKMKEIAEAYLGHVPTNAVITVPAYFNDSQRQATKDA  
 VIAGLNVLRINEPTAAAIAYGLDRTGKGERNVLFIDLGGGTFDVSILTIDDGIFEVKATAGDTHLGGEDFDNRVLSHFVEEFKRKHKKDISQN  
 KRAVRRRLTACERAKRTLSSTQASLEIDSLFEGIDFYTSITRARFEELCSDLFRGTLEPVEKALRDAKMDKAQIHDIVLVGGSTRIPKQVQK  
 LLQDFFNGRDLNKSINPDEAVAYGAAVQAAILMGDKSENVQDLLLLDVAPLSLGLLETAGGVMTALIKRNSTIPTKQTQFTTYSNQPGLVI  
 QVYEGERAMTRDNNLLGRFELSGIPPAPRGVQIEVTFDIDANGILNVTATDKTTGKANKITITNDKGRLSKEEIERMVQEAERYKADEEVQ  
 RDRVAANKNALESYAFNMKSAVEDEGLKGLSEADKKVLDKQCEVISWLDSENTLADKEEFVHKREELERVCSPIISGLYQAGAPGAGGF  
 GAQAPKASGSGPTIEEVDGTMFEFINSWVESQTNIGIIRNVLQPSVSDQTAMVLVNAIVFKGLWEKTFKDEDTQAMPFRVTEQESK  
 PVQMMYQIGLFRVASMASEKMKILELPPFASGTMSMLVLLPDEVSGLEQLESIINFEKLEWTSNVMEERKIKVYLPRMKMEEKYNLTSVL  
 MAMSIDVFSSANLGGISSAESLKISQAVHAAHAINEAGREVVGSAEAGVDAASVSEEFSGDDDDKTTGWRGGHVVVEGLAGELEQLRARLEHHPQGQREPVEHHHHHH

Molekulargewicht: 77905.79 Da  
 Anzahl Aminosäuren: 711  
 Isolelektrischer Punkt: 5.833  
 Ladung bei pH 7.0: -12.310