

Aus der Abteilung für Dermatologie und Venerologie
der Medizinischen Hochschule Hannover

**Einfluss der Hitzeschockproteine 27 und 70 auf die
Entzündungsreaktion der Haut**

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin in der Medizinischen
Hochschule Hannover

vorgelegt von Kai Wille
aus Oldenburg
Hannover 2006

Angenommen vom Senat der Medizinischen Hochschule Hannover
am 25.06.2007

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Hochschule Hannover

Präsident: Prof. Dr. Dieter Bitter-Suermann

Betreuer: Prof. Dr. Miriam Wittmann

Referent: Prof. Dr. Britta Eiz-Vesper

Korreferent: Prof. Dr. Martin Stangel

Tag der mündlichen Prüfung: 25.06.2007

Promotionsausschussmitglieder:

Prof. Dr. Thomas Werfel

Prof. Dr. Georg Scheumann

PD Dr. Torsten Witte

Danksagung und Widmung

Bedanken möchte ich mich bei meiner „Doktormutter“ Prof. Dr. med. Miriam Wittmann für die gute Betreuung und Unterstützung bei dieser Arbeit. Weiterhin bedanke ich mich bei allen Mitarbeitern des Labors, ohne deren freundliche Aufnahme, Hilfe und endlose Geduld mir gegenüber, die Versuche sicher nicht beendet worden wären.

Herzlichen Dank an Oliver Tutschke, dessen Kenntnisse in Textverarbeitung eine große Hilfe bei der Fertigstellung dieser Arbeit waren.

Vielen Dank auch an meine geduldigen Korrekturleser Rene Zander und Katrin Hagemann.

Widmen möchte ich diese Dissertation meinen Eltern, die mich mein ganzes Leben mit viel Liebe und Verständnis unterstützt haben und die ich auch während meines Studiums immer an meiner Seite wusste.

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1. Allgemeine Beschreibung der Hitzeschockproteine.....	1
1.2. Hitzeschockproteine und ihr Einfluss auf das Entzündungsgeschehen	3
1.3. Hitzeschockproteine und Antigenpräsentation.....	9
1.4. Hitzeschockproteine und Apoptose	12
1.5. Professionelle versus nicht-professionelle antigen-präsentierende Zellen	15
1.6. Haut und Hitzeschockproteine.....	20
1.7. Fragestellung	23
2. Material, Methoden, Geräte und Hilfsmittel	25
2.1. Methoden.....	25
2.1.1. Isolation peripherer mononukleärer Blutzellen (PBMC)	25
2.1.2. Berechnung der Zellzahl mithilfe der Neubauer-Zählkammer	26
2.1.3. Anreicherung der Monozytenfraktion.....	26
2.1.4. Durchflusszytometrische Messung am FACS-Scan	27
2.1.5. Oberflächenfärbung von Zellen	28
2.1.6. Durchflußzytometrische Messung und Auswertung.....	28
2.1.7. ELISA zum Nachweis von Interleukin-12.....	29
2.1.8. CFSE –Färbung	30
2.1.9. Apoptose- Nekrose- Färbung	30
2.1.10. Gewinnung von Keratinozyten aus Vollhautspenden.....	32
2.1.11. Passage von HaCats.....	33
2.1.12. Passage von Keratinozyten.....	33
2.1.13. Einfrieren der HaCat-Zellen.....	34
2.1.14. Auftauen der HaCat-Zellen.....	34
2.1.15. Medienwechsel bei HaCat bzw. Keratinozyten- Kulturen.....	34
2.1.16. UVB-Bestrahlung von Zellen	35
2.1.17. Real Time PCR	35
2.1.18. Quantitativer chromogener LAL-Endpunkt-Test („Endotoxin-Test“)	40
2.1.19. Statistische Analyse	40
2.2. Material	41
2.2.1. Keratinozyten	41
2.2.2. HaCat-Zellen	41
2.2.3. Chemikalien/ Reagenzien.....	41
2.2.4. Zellkulturmedien.....	42
2.2.5. Zytokine/ Stimuli.....	43
2.2.6. Antikörper.....	44
2.2.7. Primer	44
2.3. Geräte und sonstige Hilfsmittel.....	44
2.3.1. Geräte.....	44
2.3.2. Kits	45

3. Ergebnisse	46
3.1. Einleitung	46
3.2. Beeinflussung der IL-12-Produktion in Monozyten durch HSP	47
3.3. Beeinflussung der IL-12-Produktion in Keratinozyten durch HSP	51
3.4. Einfluss von HSP auf die Oberflächenexpression bei Monozyten	51
3.5. Einfluss von HSP27 auf die Oberflächenexpression von HaCat-Zellen	54
3.6. Untersuchung des Einflusses von HSP27 auf die Antigenwirkung	54
3.7. Einfluss auf die intrazelluläre HSP27-Konzentration.....	56
3.8. Schutzfunktion von HSP27 beim Sterbeverhalten in Monozyten	60
3.9. Schutzfunktion von HSP27 beim Apoptosevorgang bei HaCat-Zellen	65
3.10. Schutzfunktion von HSP27 beim Apoptosevorgang bei Keratinozyten	66
4. Diskussion	68
4.1. Beurteilung des Einflusses von HSP auf die IL-12-Produktion.....	68
4.2. Beurteilung des Einflusses von HSP auf die Oberflächenexpression	72
4.3. Beurteilung des Einflusses von HSP27 auf die Antigenwirkung.....	74
4.4. Beurteilung der Beeinflussung der intrazelluläre HSP27-Konzentration	75
4.5. Beurteilung des Einflusses von HSP auf die Apoptose.....	79
4.6. Beurteilung des Einflusses von LPS in den durchgeführten Versuchen.....	82
5. Zusammenfassung	86
6. Literaturverzeichnis	88
Abbildungsverzeichnis	102
Tabellenverzeichnis	103
Lebenslauf	104
Erklärung nach § 2 Abs. 2 Nr. 5 und 6 PromO	105

1. Einleitung

1.1. Allgemeine Beschreibung der Hitzeschockproteine

Im Verlauf der Evolution haben Zellen komplexe Mechanismen entwickelt, um auf verschiedene physiologische und umweltbedingte Reize zu reagieren. Die genauere Betrachtung dieser Reaktionen hat zu der Entdeckung von „Stressproteinen“ geführt, deren Rolle bei einer Reihe von Erkrankungen ein stetig wachsendes Interesse findet (Minowanda et al., 1995). Als „Stressproteine“ werden mehrere Gruppen von Proteinen bezeichnet. Die bekannteste Gruppe ist die der Hitzeschockproteine (HSP).

Erstmals beschrieben wurden HSP im Jahre 1962, als Ritossa an der Fliege *Drosophila melanogaster* bei Temperaturänderungen eine veränderte Genexpression beobachtete (Ritossa, 1962). Eine zelluläre Antwort auf eine Temperaturänderung war entdeckt. Im Jahre 1974 entdeckten dann Tissières und Mitchell die durch die veränderte Genexpression vermehrt gebildeten Proteine, die HSP (Tissières et al.; 1974). Weitere Experimente von Georgopoulos und Neidhardt an *E. coli*-Bakterien haben zusätzliche Erkenntnisse hinsichtlich der Hitzeschockantwort und ihrer Regulation auf Genebene erbracht. Ende der 1970er Jahre gab es schließlich viele Hinweise, dass die Hitzeschockreaktion keine Eigenheit bestimmter Zellen oder bestimmter Organismen ist, sondern einen allgemeinen Zellschutzmechanismus darstellt.

Heute weiß man, dass die HSP in allen pro- und eukaryotischen Zellen vorkommen. Sie beinhalten verschiedene Gruppen von Proteinen und können anhand ihrer molekularen Größe, ihrer Struktur und ihrer Funktion in fünf Familien eingeteilt werden (Lindquist et al., 1988): die HSP110, HSP90, HSP70, HSP60 und die kleine HSP-Familie. Das Molekulargewicht der einzelnen HSP-Familien spiegelt sich dabei in den Namen der Familien wider (z.B. HSP60: Hitzeschockproteine mit dem Molekulargewicht von 60 Kilodalton).

Wie oben beschrieben, wurden die HSP anfangs aufgrund ihrer raschen Induktion nach einem Temperaturanstieg benannt. Im Laufe der Zeit ist aber gezeigt

worden, dass eine große Bandbreite an verschiedenen Reizen auf die Zelle eine erhöhte Expression von HSP induziert (Morimoto et al., 1993; Morimoto, 1997). Zu diesen Belastungen gehören: Hypoxie, zelltoxische Substanzen (Schwermetalle, Chemotherapeutika, Alkohol, Natriumarsenit, Inhibitoren des Energiestoffwechsels), oxidativer und osmotischer Stress (Beckmann et al., 1992; Jacquier-Sarlin et al., 1995; Neuhaus-Steinmetz et al., 1997). Dabei spielen die HSP sowohl eine wichtige Rolle beim Schutz vor irreversiblen Zellschaden als auch bei der späteren Erholung der gestressten Zellen.

Weiterhin wichtig für das Verständnis von HSP ist, dass sie in kleineren Mengen auch in „ungestressten“ Zellen gebildet werden. Hier sind sie vor allem aufgrund ihrer Chaperoneigenschaft wichtig (Georgopoulos et al., 1993). Chaperone sind „Proteinfaltungshelfer“, die mit teilweise oder vollständig entfalteten Proteinen interagieren und damit eine Aggregation denaturierter Proteinmoleküle verhindern können.

Bei einer Stressantwort wird die Bildung dieser und anderer HSP stark induziert, da nun auch eine erhöhte Konzentration von ungefalteten, aber auch von beschädigten und denaturierten Proteinen zu erwarten ist. Die HSP binden an diese Polypeptide und helfen bei ihrer Neufaltung oder bei ihrem Abbau mit (Parsell et al., 1993).

Insofern wirken die HSP zytoprotektiv, weil sie Proteine vor der Denaturierung schützen beziehungsweise den Abbau von denaturierten Polypeptiden beschleunigen. Dadurch kann ein Zellschaden durch denaturierte Polypeptide verhindert werden (Samali et al., 1998).

Weitere Forschungen ergaben zusätzliche Funktionen von HSP auf zellulärer Ebene, wovon einige im Folgenden näher betrachtet werden sollen.

1.2. Hitzeschockproteine und ihr Einfluss auf das Entzündungsgeschehen

Bei Entzündungsprozessen kommt es unter anderem zur Freisetzung von reaktiven Sauerstoffmolekülen (ROI), sauren Metaboliten und einer Vielzahl proinflammatorischer Botenstoffe (TNF- α), welche die HSP-Expression nachweislich fördern (Polla et al., 1998).

Seit langem ist bekannt, dass die HSP eine Zellschutzfunktion im Entzündungsgeschehen besitzen. Neuere Erkenntnisse deuten jedoch darauf hin, dass man die Rolle von HSP differenzierter betrachten muss (Polla et al., 1998). Der protektive Effekt gegenüber toxischen Entzündungsmediatoren, wie ROI oder TNF- α (Fehrenbach et al., 2001), die auch einen Einfluss auf das Apoptoseverhalten von Zellen besitzen (Mehlen et al., 1995; Mehlen et al., 1996), bleibt aber unumstritten. Auch eine Inhibition der Aktivierung von NF- κ B, einem im Entzündungsgeschehen in zentraler Position stehenden Transkriptionsfaktor, ist nachgewiesen (Rossi et al., 1998; Wong et al., 1997). Zusätzlich dazu gibt es Hinweise darauf, dass ein anderer wichtiger Signalweg im Entzündungsgeschehen, nämlich der MAPKinase-Signalweg, beeinflusst wird (Malago et al., 2002). Andere Arbeitsgruppen wiesen nach, dass ein bestimmtes HSP (HSP27) phosphoryliert wird (entweder unter Beteiligung des erwähnten MAPKinase-Signalweges (Stokoe et al., 1992, Ahlers et al., 1994; Engel et al., 1995) oder von cGMP abhängigen Protein Kinasen (Butt et al., 2001)). Diese Phosphorylierung von HSP27 scheint einen Einfluss auf die Plättchenaggregation und auf die Mikrofilament-Organisation zu besitzen (Butt et al., 2001).

In letzter Zeit zeichnet sich jedoch ab, dass HSP andere Einflüsse auf die Immunregulation besitzen, die als eher negativ, d.h. im Sinne einer Verstärkung oder einer Chronifizierung des Entzündungsgeschehens, anzusehen sind. Insbesondere ergeben sich Hinweise auf einen inhibierenden Effekt von intrazellulär gebildeten HSP auf die Apoptose von Immunzellen mit der Konsequenz der Anreicherung immunkompetenter Zellen (siehe unten). Allerdings scheint es so, dass hierfür die Expression von HSP vor dem eigentlichen Entzündungsgeschehen induziert werden muss. Folgt dagegen zum Beispiel ein Hitzeschock

der Entzündung, wird ein vermehrtes Zellsterben beobachtet (Buchmann et al., 1993; Xu et al., 1996). Dieser Effekt scheint ebenfalls mit der Inhibition des NF- κ B-Signalwegs in Verbindung zu stehen (DeMeester et al., 2001; Malhorta et al., 2002). Weitere Zusammenhänge zwischen HSP und Apoptose werden weiter unten beschrieben.

Außerdem wurde beschrieben, dass HSP (hauptsächlich solche aus den HSP60 und HSP70 Familien) wirksame Ziele für die antikörpervermittelte zelluläre Immunantwort bei Infektionskrankheiten darstellen können (Anderton et al., 1993; van Eden et al., 1998), was für so stark konservierte Proteine eher ungewöhnlich ist.

Es existieren ebenfalls Hinweise, dass HSP an der Verbindung von Infektion und Autoimmunität beteiligt sind. Da pathogene Keime, die an der Auslösung und Aufrechterhaltung von Entzündungsprozessen beteiligt sind, ganz ähnliche HSP wie der Mensch exprimieren, könnte das Immunsystem, bei unzureichender Fokussierung auf diese bakteriellen HSP, auch wirtseigene HSP-Regionen angreifen („molekulares Mimikry“) (Wendling et al., 1997; van Eden W., 1991 und van Eden I., 2000). Gezeigt wurde dies für unterschiedliche Autoimmunerkrankungen (Übersicht: Fracella et al., 1995). So scheint HSP60 beispielsweise bei der Adjuvantien induzierten Arthritis, dem systemischen Lupus erythematoses, dem Typ I Diabetes und anderen Autoimmunerkrankungen eine Rolle zu spielen (van Eden et al., 1998; Feige et al., 1996; Linington, 1995; van Eden, 1993; van Noort, 1996).

Zusätzlich dazu gibt es Hinweise auf eine Beeinflussung von HSP60 auf die Entstehung von arteriosklerotischen Plaques (Amberger et al., 1999). Besonders bei der Entstehung dieser Plaques durch eine Infektion mit *Chlamydia pneumoniae*, die seit längerem postuliert wird (Kuo et al., 1993; Jackson et al., 1997; Curry et al., 2000), scheint bakterielles HSP60 eine Rolle zu spielen (Kol et al., 1998).

Am besten untersucht in ihrem direkten Einfluss auf das Entzündungsgeschehen sind allerdings die aus der HSP70 Familie stammenden HSP (Williams et al., 1993; Bellmann et al., 1996; Jacquier-Sarlin et al., 1994). Sie sind sowohl im Zytosol als auch im Kern lokalisiert und beinhalten als wichtigste Vertreter das

in geringer Menge ständig gebildete (konstitutive) HSP73 (HSC70) und das bei Stress induzierte HSP70 (Jäättelä, 1999).

Für das durch Hitzeschock induzierte intrazelluläre HSP70 ist beispielsweise eine inhibierende Wirkung auf den NF- κ B-Signalweg und die ICAM-1-Expression, einem interzellulären Adhäsionsmolekül, das für die Leukozyten-einwanderung im Entzündungsgeschehen wichtig ist, nachgewiesen (Chen et al., 2004; Kohn et al., 2002). Diese anti-inflammatorischen Wirkungen scheinen beim Myokardinfarkt (Yellon et al., 1994; Plumier et al., 1995), bei der akuten Pankreatitis (Ethridge et al., 2000) und bei der rheumatoiden Arthritis (van Eden W. et al., 2000) wichtig zu sein.

Zudem gibt es Hinweise, dass HSP70 eine Rolle bei der Entstehung der Arteriosklerose spielt. Erhöhte Blutspiegel von HSP70 wurden bei Patienten mit peripheren und renalen Gefäßkrankheiten nachgewiesen (Wright et al., 2000; Pockley, 2002), wobei der Einfluss von HSP60 hier wichtiger zu sein scheint (siehe oben). Außerdem beeinflusst intrazelluläres HSP70 das Apoptoseverhalten von Entzündungszellen (Samali et al., 1996; Lindquist et al., 1998; Morimoto et al., 1998).

Dagegen wurden aber auch erhöhte intrazelluläre HSP70-Konzentrationen bei der schweren Form des Asthma bronchiale gemessen. Klinische Besserung erfolgte durch Steroidinhalation, die mit einer HSP70 Konzentrationsabnahme einhergeht (Fajac et al., 1997; Bertorelli et al., 1998).

Ähnliche Beobachtungen wurden bei verschiedenen anderen Erkrankungen, wie z.B. der Muskeldystrophie Typ Duchenne gemacht, bei der ebenfalls eine erhöhte HSP70 Expression zu finden ist (Bornman et al., 1995). Es stellt sich also auch für das HSP70 die Frage, ob es pro- oder anti-inflammatorisch wirkt.

In diesem Zusammenhang ist die Wirkung dieses HSP auf die Zytokinproduktion in immunologisch wichtigen Zellen von Bedeutung. Allgemein nachgewiesen wurde, dass HSP eine inhibierende Wirkung auf die Zytokinexpression (u.a. durch Hemmung des NF- κ B-Signalwegs) besitzen. Bei der Produktion von IL-12 zeigt sich, dass hier eine differenziertere Betrachtungsweise angezeigt ist.

IL-12 ist ein zellulärer Botenstoff, dessen biologische Aktivität darin besteht, dass er T- und NK-Zellen anregt, zu proliferieren und vermehrt IFN γ zu produzieren. Dies erhöht unter anderem ihre Zytotoxizität gegenüber Tumorzellen

(Trinchieri, 1995). IL-12 ist ein heteromeres Molekül, das hauptsächlich von antigen-präsentierenden Zellen (APC) gebildet wird. Eine wichtige Rolle spielt es in der Entzündungsantwort, in der Polarisierung von CD4⁺ T-Zellen zu Th1 Zellen (Adorini, 1999) und die Aktivierung von Th1 Zellen (Kremer et al., 1996) (Auf die Rolle der Th1- und Th2-Antwort wird im Kapitel 1.6. genauer eingegangen.)

Werden mononukleäre Zellen durch bakterielles Lipopolysaccharid (LPS) unter anderem zur IL-12 Expression angeregt, wird dieser Effekt durch intrazelluläres HSP70 inhibiert (Ding et al., 2001; Wang et al., 2001). Dies führt zur Unterdrückung der Entzündung und der zellulären Immunität.

Im Gegensatz dazu wird in vorher nicht durch LPS aktivierten mononukleären Zellen eine Erhöhung der IL-12 Produktion durch extrazelluläres HSP70 beobachtet (Wang et al., 2002; Millar et al., 2003; Wan et al., 2004). HSP70 kann demnach bezüglich der IL-12 Produktion unterschiedliche Effekte ausüben. Zu unterscheiden ist dabei, ob es intra bzw. extrazellulär exprimiert wird, oder intra- bzw. extrazellulär auf die Zellen trifft.

Hinsichtlich der Wirkung auf immunologisch wichtige Zellen sind in den letzten Jahren weitere Erkenntnisse bezüglich HSP70 hinzugekommen, die darauf hindeuten, dass dieses Protein selbst ähnlich wie ein Zytokin im inflammatorischen Prozess wirkt. Der Name „Chaperokine“ (Asea et al., 2000a und b) weist auf die unterschiedlichen Fähigkeiten dieses HSP hin, auf der einen Seite als Chaperon, und auf der anderen als Zytokin zu wirken.

Per Definition sind Zytokine Proteine, die von Zellen sezerniert werden und einen regulatorischen Effekt auf andere Zellen haben. Um ähnliche Wirkung zu erzielen wie ein Zytokin muss sichergestellt sein, dass HSP70 im extrazellulären Raum vorkommt. Dafür gibt es mehrere Hinweise. Es wurde gezeigt, dass humane Monozyten, die einer sublethalen Temperatur (42°C für eine Stunde) ausgesetzt werden, HSP70 in den extrazellulären Raum abgeben (Asea et al., 2000b). Auch anders gearteter Stress, wie Zytokineinfluss, psychologischer Stress oder körperliche Anstrengung führen zu einer Sezernierung von HSP70 (Asea, 2003). Außerdem haben sowohl Patienten mit Autoimmunerkrankungen (Minota et al., 1988) als auch „Normalpersonen“ (Pockley et al., 1998) Antikörper gegen HSP70 im Blut, was ebenfalls auf ein extrazelluläres Vorkommen

dieses Proteins hindeutet. Zusätzlich dazu zeigte sich, dass nekrotische (aber nicht apoptotische) Zellen HSP in den extrazellulären Raum freisetzen, darunter auch HSP70 (Basu et al., 2000; Somersan et al., 2001; Moroi et al., 2000; Medzhitov et al., 1997).

Unter der Annahme des extrazellulären Vorkommens von HSP70 wurde nun gezeigt, dass dieses HSP in der Lage ist, Monozyten zur Produktion von proinflammatorischen Zytokinen anzuregen, nämlich IL-1, TNF- α , IL-6 und IL-12 (Asea et al., 2000a und b, Moroi et al., 2000; Binder et al., 2000; Wang et al., 2002; Millar et al., 2003; Wan et al., 2004). Dieser Vorgang wird durch zwei verschiedene Signalwege aktiviert. Der eine Weg ist abhängig von intrazellulärem Kalzium und resultiert in der Produktion von TNF- α . Der andere benötigt (neben der ebenfalls vorhandenen Abhängigkeit zu intrazellulärem Kalzium) zusätzlich noch den Oberflächenrezeptor CD14.

Für den Ablauf des Signalwegs wurde nun postuliert, dass HSP70 an CD14 auf Monozyten bindet, einen schnellen intrazellulären Kalziumfluss auslöst (ein Vorgang, der in verschiedenen Systemen nach der Rezeptorbindung erfolgt (Gosh et al., 1998)) und schließlich über eine Aktivierung des NF- κ B-Signalwegs die Produktion der oben genannten Zytokine anregt (Moroi et al., 2000). Auch für das HSP60 wurde eine Aktivierung der Zytokinproduktion via CD14 postuliert (Kol et al., 2000).

Wie sich der genaue Ablauf der intrazellulären Signalkaskade über CD14 darstellt, ist nicht genau bekannt. Verschiedene Studien wiesen aber darauf hin, dass die Toll-like Rezeptoren (TLR) 2 und 4 in diesen Signalweg involviert sind (Yang et al., 1998; Poltorak et al., 1998; Hoshino et al., 1999; Ohashi et al., 2000; Vabulas et al., 2001).

Allgemein wird jedoch angenommen, dass der CD14 Rezeptor eine eher untergeordnete Rolle für die Wirkung von HSP70 als Zytokin spielt (trotz Asea et al., fehlende Bestätigung durch andere Studien). Der Einfluss von HSP70 (mit oder ohne Peptidbeladung) auf immunologische Zellen über die Toll-like Rezeptoren sowie über CD91 und CD40 (siehe unten) erscheint wahrscheinlicher.

TLR sind Typ I Transmembranproteine, die in ihrer Sequenz und Struktur dem Toll-Protein der Drosophila-Fliege gleichen. Sie besitzen eine extrazelluläre Leucin-reiche Region, die für die Ligandenbindung wichtig ist, und eine intrazel-

luläre Signaldomäne (Aderem et al., 2000; Kopp et al., 1999; Rock et al., 1998). Die TLR der Säugetiere werden als eine Gruppe von Rezeptoren angesehen, die eine zentrale Rolle im Erkennen und in der Abwehr von mikrobiellen, pathogenen Molekülen (wie z.B. LPS) spielen (Anderson, 2000; Janeway, 1999, Zhang et al., 2001). Sie kontrollieren die Immunantwort über ein Adaptorprotein (MyD88), das im Endeffekt zu einer Aktivierung des NF- κ B- oder MAPKinase-Signalwegs führt (Kopp et al., 1999). Diese Aktivierung führt dann zu einer erhöhten Produktion von Zytokinen, kostimulatorischen Molekülen aus der B7 Familie und Adhäsionsmoleküle (z.B. ELAM-1) (Vabulas et al., 2002a).

Die mit am besten charakterisierten TLR sind die TLR4, welche durch Bindung von LPS (Miyake, 2003), Taxol oder HSP60 die Signalkaskade initiieren, und TLR2, welche Moleküle aus der Wand von gram-positiven Bakterien binden.

Asea et al. (2002) wiesen nun nach, dass HSP70 via TLR2 und 4, in Abhängigkeit von CD14 und MyD88, den NF- κ B-Signalweg aktiviert und so die Produktion von proinflammatorischen Zytokinen (IL-1, IL-6 und TNF- α) anregt. Dieser Induktionsweg wurde auch für HSP60 (Ohashi et al., 2000, Vabulas et al., 2001), gp96 (Vabulas et al., 2002b) und LPS (Fenton et al., 1998) gezeigt. Außerdem aktiviert HSP70 dendritische Zellen und induziert deren Reifung über denselben Signalweg. Wie bei vielen Wirkungen, die für HSP nachgewiesen werden, stellt sich auch in diesem Falle die Frage nach einem versteckten Effekt durch kontaminierendes Endotoxin (Tsan et al., 2004). Ein anderer bedeutender Rezeptor für die Aufnahme verschiedener HSP wurde mit CD91 beschrieben (Binder et al., 2002 und 2003, Stebbing et al., 2004, Tobian et al., 2004) Dieser wird auf Seite 10 näher beleuchtet.

Die oben zusammengefassten Einflüsse auf die Entzündung führen zu der Annahme, dass extrazelluläres HSP70, das z.B. aus im Entzündungsprozess in den unprogrammierten Zelltod (Nekrose) gegangenen Zellen freigesetzt wurde, als „danger signal“ das angeborene und das spezifische Immunsystem aktiviert, wie es auch für andere endogene Aktivatoren von APC angenommen wird (Matzinger, 1998).

Diese Beobachtungen über die Einflüsse von HSP70 auf die Entzündung zeigen, dass dieses Protein je nach intra- oder extrazellulärem Vorkommen wichti-

ge Signalwege und Zytokine beeinflusst. Die Zytokin-ähnliche Funktion ist dabei auf das extrazellulär vorkommende HSP70 zurück zu führen. Einen Einfluss auf die IL-12 Produktion besitzt dagegen sowohl die intra- als auch die extrazelluläre Form dieses Proteins.

Abhängig von den Rahmenbedingungen (dem vorhandenen Mikromilieu) kann HSP70 dabei eine pro- oder eine anti-inflammatorische Wirkung besitzen.

1.3. Hitzeschockproteine und Antigenpräsentation

Neben der Wirkung im Entzündungsgeschehen stellen HSP auch eine wichtige Rolle in der Antigenpräsentation dar. Viele Untersuchungen deuten darauf hin, dass endogene HSP daran beteiligt sind, Peptide zu binden, zu prozessieren und zu präsentieren (Srivastava et al., 1994).

Klassischerweise werden zwei Wege der Antigenpräsentation unterschieden. Endogene Antigene werden demnach mithilfe von MHC Klasse I Molekülen CD8⁺ T-Zellen (zytotoxischen T-Zellen, CTL) präsentiert. Typisches Beispiel hierfür ist die durch ein Virus infizierte Zelle, die Viruspeptide den CTL präsentiert. Diese attackieren dann die infizierte Zelle. Es wird vermutet, dass die Präsentation zelleigener Bestandteile auch eine wichtige Rolle in Aufbau und Erhalt von immunologischer Toleranz gegenüber den eigenen Zellen spielt. Eine Störung in diesem Ablauf kann zu Autoimmunkrankheiten führen.

Exogene Antigene werden demgegenüber von außen in Zellen aufgenommen und von APC mithilfe von MHC Klasse II Molekülen CD4⁺ T-Zellen (T-Helferzellen) präsentiert.

HSP können in ihrer Funktion als molekulare Chaperone Proteine/Peptide binden. Interessanterweise sind sie in diesem Zusammenhang daran beteiligt, exogene Antigene in den „endogenen Präsentationsweg“, also MHC Klasse I-Präsentation an CD8⁺ T-Zellen, einzuschleusen (Suto et al., 1995). Für diesen Prozess scheint die Beteiligung von APC, wie Makrophagen bzw. dendritische Zellen und Langerhans-Zellen in der Haut (Udono et al., 1994), unabdingbar notwendig zu sein. Als erstes HSP wurde in diesem Zusammenhang gp96 un-

tersucht. Es wurde gezeigt, dass gp96 gebundenes Antigen einige hundertmal effektiver ist, eine CTL-Antwort hervorzurufen, als freies Peptid.

Auf diese Art tragen HSP vermutlich zu dem bekannten Phänomen des „Cross-Priming“ bei (Srivastava et al., 1994; Carbone et al., 1998). Bei diesem Prozess nehmen APC exogene HSP, die Peptide gebunden haben, per Rezeptor-vermittelten Endozytose auf (Arnold - Schild et al., 1999). Dies führt dann zu einer Antigenpräsentation via MHC I (Castellino et al., 2000).

Gp96 wurde hinsichtlich dieses Phänomens näher untersucht (Blachere et al., 1997; Arnold et al., 1995; Breloer et al., 1998).

Auch für das HSP70 wurde seit langer Zeit eine Beteiligung an der Antigenpräsentation vermutet (Udono et al., 1993). Gestützt wurde diese Vermutung durch die strukturelle Analogie der C-terminalen Peptidbindungsstelle von HSP70 und derjenigen von MHC, sowie die Lokalisation der HSP70-Gene in der Nachbarschaft der Gene der MHC-Moleküle (Sargent et al., 1989). Schließlich wurde dann das „cross-priming“ (wie schon für gp96 gezeigt) auch für das HSP70 nachgewiesen (Wells et al., 1998; Gantress et al., 2002; Milani et al., 2002; Becker et al., 2002; MacAry et al., 2004).

Als Rezeptor für die HSP-Antigen-Komplexe über die der „cross-priming“ Weg eingeschlagen wird, wurde der Rezeptor für α 2-Makroglobulin, CD91, beschrieben. Binder et al. identifizierten ihn als erstes als Rezeptor für gp96. Daraufhin wurde aber erkannt, dass auch andere HSP, wie HSP70, HSP90 und Calreticulin, an ihn binden können (Basu et al., 2001). Srivastava et al. (2002) und Stebbing et al. (2004) machten schließlich die Beobachtung, dass alle identifizierten HSP an den CD91-Rezeptor andocken können und dass eine Antikörperblockade von CD91 das „cross-priming“ durch die HSP unterdrückt.

Genauer untersucht wurde dieser Rezeptor z.B. für die Re-präsentation von gp96-gebundenem Peptid durch MHC-Moleküle. Dies erscheint für die entzündliche Reaktion, die auf einen nekrotischen Zelltod folgt, als wichtig (Binder et al., 2004) und könnte beispielsweise in der Tumor-Immunologie eine wichtige Rolle spielen (Binder et al., 2002).

Außerdem können neben wirtseigenen auch prokaryotische HSP, die bakterielle Peptide in ihrer Chaperonfunktion gebunden haben, durch Aufnahme (mithilfe

von CD91) in dendritische Zellen CD8⁺ T-Zellen aktivieren (Tobian et al., 2004). So ist es möglich, dass die Abwehr von bakteriellen Erregern, nach Aufnahme der Erreger HSP-Protein-Komplexe, auch über den MHC I-Präsentationsweg stattfindet.

Als weiterer Rezeptor für exogene HSP70-Peptid-Komplexe wurde CD40 auf Makrophagen und dendritischen Zellen entdeckt (Becker et al., 2002). Es wurde eine vermehrte Zytokinproduktion (z.B. IL-12) nach Aufnahme von HSP70-Peptid-Komplex beobachtet (Millar et al., 2003). Auch der Scavenger Receptor LOX-1 wurde in diesem Zusammenhang untersucht (Delneste et al., 2002).

Ob diese Rezeptoren oder CD91 die größere Rolle bei der Antigenpräsentation durch HSP spielt, ist noch nicht endgültig geklärt. Weitere Untersuchungen zur Klärung dieser Frage sind nötig, um eine endgültige Aussage tätigen zu können.

Klinische Relevanz besitzt das oben beschriebene „cross-priming“ beispielsweise für die Bekämpfung von viralen Infektionen (Stebbing et al., 2003 und 2004) oder von Neoplasien (Wells et al., 2000; Binder et al., 2002; Ueda et al., 2004) durch das Immunsystem.

Zur Tumorbekämpfung wurde ebenfalls eine direkte Interaktion von HSP70 mit tumorsensitiven NK-Zellen (NK-Zellen) über den NK-Rezeptor CD94 beobachtet (Multhoff et al., 2002; Gross et al., 2003).

Ein negativer Einfluss, gerade für HSP70 und seine gebundenen Proteine, hinsichtlich der Entstehung von Autoimmunerkrankungen (Millar et al., 2003) oder in der Verschlechterung der rheumatoiden Arthritis (Martin et al., 2003) wurde postuliert.

Der oben erwähnte positive Effekt hinsichtlich eines malignen Geschehens und der negative Einfluss im Hinblick auf die Autoimmunerkrankungen stellt immunologisch kein Widerspruch dar. Dies erklärt sich damit, dass die HSP das Immunsystem stimulieren (insbesondere das innate Immunsystem) und so sowohl einen positiven Einfluss z.B. im Hinblick auf eine Neoplasie, als auch einen negativen z.B. durch Überstimulation und einer möglicherweise daraus entstehenden Autoimmunerkrankung haben können.

1.4. Hitzeschockproteine und Apoptose

Seit einiger Zeit ist bekannt, dass Zellen mit einer relativ hohen intrazellulären Konzentration an HSP zytotoxische Reize in höherem Maße tolerieren als andere Zellen. Dieses Phänomen wird auch als „Thermotoleranz“ bezeichnet (Parsell et al., 1993; Li et al., 1980; Li et al., 1982) und deutet darauf hin, dass HSP den Zelltod verhindern können.

Hinsichtlich des Ablaufes des Zelltodes werden allgemein zwei Wege unterschieden, nämlich die Nekrose und die Apoptose.

Die Nekrose ist die passive Form des Zelltods, die hauptsächlich unter pathologischen Bedingungen auftritt. Dabei führt ein schneller Ionenfluss zu einer Schwellung und einer Ruptur der Zelle und ihrer Organellen (Concannon et al., 2003).

Dagegen stellt die Apoptose (programmierter Zelltod) ein physiologisches Erlöschen der Zellfunktionen dar. Der Organismus kann mithilfe der Apoptose die Zellzahl und die Gewebegröße kontrollieren und sich selbst vor fehlentwickelten oder überflüssigen Zellen schützen (Hengartner et al. 2000). Die morphologischen Merkmale der Apoptose sind Chromatinverklumpung, Kernschrumpfung (Karyopyknose), Auflösung von Organellen und Zellkontakten, Zellschrumpfung und schließlich Bildung von Apoptosekörperchen. Dieser energieabhängige Prozess setzt eine Signalkaskade voraus, die sowohl an der Initiation als auch an der Ausführung des programmierten Zelltods beteiligt ist.

Diverse Stimuli können die Apoptose triggern, indem sie eine oder mehrere Signalwege aktivieren, die dann schließlich zu einer Aktivierung von Cysteinproteasen führt. Diese gehören zu einer großen Proteinfamilie, die Caspasen genannt werden (Alnemri et al., 1996). Diese Polypeptide werden in einer inaktiven Form exprimiert. Bei der Initiation der Apoptose erfolgt ihre proteolytische Spaltung und damit ihre Aktivierung (Thornberry et al., 1998). Einmal aktiviert, spalten sie spezifische zelluläre Substrate (Stroh et al., 1998). Diese Spaltung resultiert in den charakteristischen biochemischen und morphologischen Veränderungen der Zelle, die während der Apoptose auftreten (Samali et al., 1996).

Die Aktivierung der Apoptose kann über zwei Signaltransduktionswegen, einem intrinsischen und einem extrinsischen, erfolgen.

Der extrinsische Weg beginnt mit der Bindung eines Liganden an spezielle Zelloberflächenrezeptoren (z.B. FAS/CD95/Apo-1). Daraufhin wird am zytosolischen Ende des Rezeptormoleküls ein Adaptermolekül (FADD= Fas-associated death domain Protein) angedockt, was zu einer Rekrutierung mehrerer Procaspase-8-Proteine und deren Aktivierung zu Caspase-8 führt. Daraufhin spaltet Caspase-8 proteolytisch Pro-Caspase-3 (Ashkenazi et al., 1998).

Auf der anderen Seite beginnt der intrinsische Weg intrazellulär durch eine Freisetzung von Cytochrom c aus dem intramembranösen Raum der Mitochondrien ins Zytosol (Green et al., 1998). Dort bildet das Cytochrom c zusammen mit dATP und Apaf-1 (Apoptosis Protease Activating Factor 1) das sogenannte Apoptosom, was Pro-Caspase-9 aktiviert (Zou et al., 1999). Das aktivierte Caspase-9-Molekül kann daraufhin entweder seine eigenen Pro-Enzyme aktivieren oder (genauso wie Caspase-8) Caspase-3 aktivieren (Li et al., 1997). Caspase-3 führt über weitere Signalkaskadewege zu einer Aktivierung der Apoptose. Caspase-Moleküle sind beispielsweise in der Lage, eine Fragmentierung der DNA via CAD (caspase-activated DNase) zu induzieren (Wyllie, 1980; Nagata, 1999; Liu et al., 1997; Enari et al., 1998; Sakahira et al., 1998). Außerdem werden Kern- und Zytoskelettproteine von Caspasen angegriffen (Rao et al., 1996; Buendia et al., 1999; Kothakota et al., 1997).

Eine zentrale Rolle in der Koordinierung der Signalwege der Apoptose nehmen die Mitochondrien ein. Viele der für die Apoptose wichtigen Moleküle sind im oder am Mitochondrium lokalisiert. Dazu gehören Cytochrom c (Liu et al., 1996), AIF (Lorenzo et al., 1999), Smac/Diablo (Verhagen et al., 2000) und pro-Caspase-3 (Samali et al., 1999). Diese Moleküle können nach ihrer Freisetzung sowohl an der Initiation als auch an der Ausführung des Apoptoseprogramms mitwirken.

Die endogenen Modulatoren dieses Programms, die am besten charakterisiert sind, sind die Mitglieder der Bcl-2-Protein-Familie (Adams et al., 1998). Sie beinhalten sowohl pro- als auch antiapoptotisch wirkende Polypeptide.

Da es, wie oben erwähnt, Hinweise darauf gibt, dass eine Korrelation zwischen der Expression von HSP und einem erhöhtem Zellüberleben besteht, stellt sich die Frage, ob HSP eine Rolle in der Regulation der Apoptose spielen. Experimente wurden dabei mit HSP70 (Lang et al., 2002), HSP72 (Beere et al., 2000;

Saleh et al., 2000) und HSP90 (Pandey et al., 2000a) durchgeführt. Näher betrachtet werden soll im Folgenden die Einwirkung von HSP27 auf den Apoptoseprozess.

Bisher liegen ausschließlich Daten zum Einfluss von intrazellulärem HSP27 auf den Zelltod vor. Dabei kann HSP27 die Apoptose verhindern, indem es als Chaperon ATP-unabhängig (Jakob et al., 1993), beschädigte Proteine repariert. Dies wurde beispielsweise für Kernproteine gezeigt (Kampinga et al., 1994). Der Schutz für die Zelle liegt darin begründet, dass große Mengen an fehlgefalteten Proteinen als Signal für die Induktion der Apoptose gelten (Soldatenkov et al., 1997). Anzunehmen ist, dass zusätzlich die „unfolded protein response“ (UPR) durch dieses HSP beeinflusst wird. UPR ist ein Signalweg, der durch fehlgefaltete Proteine aktiviert wird und unter anderem Einfluss nimmt auf die Biosynthese in Zellen (Schroder et al., 2005).

Die Translation von Proteinen *in vitro* wird unter Stress (Hitzeschock) durch HSP27 inhibiert (Cuesta et al., 2000). So kann die Bildung von potentiell fehlgefalteten Polypeptiden verhindert werden. Zusätzlich dazu hilft HSP27 bei der Wiederaufnahme der Proteinsynthese nach einem Hitzeschock (Carper et al., 1997), was für die Zellen einen Überlebensvorteil darstellt.

Weiterhin inhibiert HSP27 direkt die Caspaseaktivierung (Garrido et al., 1999; Samali et al., 2001). Wahrscheinlich interagiert HSP27 mit Teilen des Apoptosomkomplex. Diese Interaktion ist vor allem für das Cytochrom c nachgewiesen (Bruey et al., 2000; Concannon et al., 2001). Außerdem kann HSP27 die Aktivität von Caspase-3 durch Inhibition von Pro-Caspase-3 herunter regulieren (Concannon et al., 2001, Pandey et al., 2000b).

Dazu werden auch caspaseunabhängige Apoptosewege herunter reguliert. So wirkt das Protein Daxx als Mediator einer Fas-induzierten Apoptose zwischen dem Fas-Rezeptor und einer Kinase (Ask1) (Yang et al., 1997). Intrazelluläres HSP27 interagiert mit Daxx und verhindert seine Bindung an den Fas-Rezeptor und an Ask1 (Charette et al., 2000).

Hinzu kommt, dass HSP27 die Stress-induzierte Beschädigung des Zytoskeletts verhindert. Verschiedene Studien haben gezeigt, dass die Stabilität von F-Aktin Mikrofilamenten während einer Exposition mit hoher Temperatur, Oxidan-

tion und Cytochalasin D durch das HSP erhöht wurde (Lavoie et al., 1993; Huot et al., 1995; Guay et al., 1997). Der genaue Mechanismus ist nicht bekannt. Weiterhin wurde nachgewiesen, dass HSP27 die intrazelluläre Konzentration an Glutathion erhöht (Mehlen et al., 1996). Diese erhöhte Konzentration schützt die Zellen gegen freie Sauerstoffradikale. Es konnte gezeigt werden, dass HSP27 gegen Sauerstoffradikale schützen, die durch TNF- α Stimulation oder durch oxidativen Stress entstanden waren (Mehlen et al., 1995; Arrigo et al., 2005). Also scheint HSP27 über verschiedene Mechanismen eine protektive Rolle für Zellen zu spielen. Einmal trägt es dazu bei, dass die Zellfunktionen während des Stresses weiterhin funktionieren (Chaperoneffekt, Schutz des Cytoskeletts), und zusätzlich dazu verhindert es die Apoptose (Interaktion mit Caspasen, Glutathionbildung).

1.5. Professionelle versus nicht-professionelle antigen-präsentierende Zellen

Wenn von APC gesprochen wird, so sind im Allgemeinen die „professionellen“ APC gemeint. Hierunter fallen die Zellen, die im Knochenmark entstehen, wie z.B. dendritische Zellen, B-Zellen, Makrophagen, aber auch die Langerhans-Zellen in der Haut. Neben diesen professionellen APC existieren aber auch andere, als „nicht-professionelle“ APC bezeichnete, Zellen. Diesen ist gemein, dass ihre Hauptaufgabe nicht in der immunologischen Abwehr des Körpers liegt, sondern dass sie sozusagen im „Nebenberuf“ (und unter besonderen Stimulationsbedingungen) noch eine Rolle, zum Beispiel in der Antigenpräsentation, spielen. Hierunter fallen auch die epithelialen und endothelialen Zellen des Körpers, wie zum Beispiel die Keratinozyten in der Haut.

Die Keratinozyten repräsentieren mehr als 90% der Epidermis und ihre primäre Aufgabe ist die Aufrechterhaltung der Barrierenfunktion der Haut. Aufgrund ihrer anatomischen Lage sind sie aber auch die ersten Zellen, die in Kontakt mit externen Stimuli kommen. In letzten Jahren wurde beobachtet, dass sie eine wichtige Rolle in der Initiation und Aufrechterhaltung der immunologischen Antwort im Hautorgan und von Hautentzündungen spielen (Wakem et al., 1999, Albanesi et al., 2005).

Keratinocyten sind eine wichtige Quelle von Zytokinen und Chemokinen (Albanesi et al., 2005). Auf der einen Seite werden kontinuierlich einige Zytokine von ruhenden Keratinocyten gebildet. Auf der anderen Seite führen eine Vielzahl an umweltbedingten Stimuli, wie UV-Licht, chemische Stoffe oder auch Kontaktallergene, zur Freisetzung bestimmter Botenstoffe. Insbesondere werden proinflammatorische (u.a. IL-1, IL-18, TNF- α , die Chemokine CXCL8/IL-8, CCL5/RANTES, CCL22/MDC, CXCL10/IP-10 und CCL/MCP-1, wachstumsfördernde (u.a. IL-6, IL-15 und GM-CSF) und regulatorische Zytokine (u.a. der T-Zell-Antwort (IL-10, IL-12, IL-18 und TGF- β) gebildet (Wittmann et al., 2005; Purwar et al., 2006; Barker et al., 1991; Mohamadzadeh et al., 1994; Wakem et al., 1999; Williams et al., 1996). Diese Zytokinproduktion beeinflusst durch die Keratinocyten (zusätzlich zu der unten beschriebenen möglichen Fähigkeit der Keratinocyten zur Antigenpräsentation (Banerjee et al., 2004; Fan et al.; 2003)) die immunkompetenten Zellen in der Haut in hohem Maße. Banerjee et al. (2004) und Albanesi et al. (2001) stellten fest, dass Keratinocyten die CD4 Lymphocyten zu einer Th-1-Zellantwort polarisieren, die für die zellvermittelte Immunität wichtig ist. (Andere sehen Keratinocyten eher mit einem Th2-Milieu oder Anergie-Induktion assoziiert (Goodman et al., 1994; Bal et al., 1990)).

Zusätzlich dazu können Keratinocyten, wie professionelle APC auch, MHC II-Moleküle auf ihrer Oberfläche exprimieren (Gonzalez-Gay et al., 1994; Krueger et al., 1990). Dies tun sie nach Aktivierung mit Interferonen, wobei IL-18 diese Expression deutlich verstärkt (Wittmann et al., 2005; Nickoloff et al., 1994; Albanesi et al., 1998) und unter bestimmten pathologischen Umständen, z.B. bei Psoriasis oder allergischer Kontaktdermatitis. Solche Erkenntnisse führten zu der Vermutung, dass die Keratinocyten mit T-Lymphocyten interagieren können (Mutis et al., 1993; Kerr et al., 1990). Fan et al. (2003) assoziierten diese MHC II-Expression mit verschiedenen kutanen Autoimmunerkrankungen.

Allerdings zeigten einige Studien, dass diese Interaktion zwischen den MHC-II exprimierenden Keratinocyten und CD4⁺ T-Zellen, anders als bei den professionellen APC, zu einer Toleranzentwicklung bzw. zu einer Unterdrückung der T-Zellantwort, anstatt zu ihrer Aktivierung führt (Gaspari et al., 1988; Laning et al., 1997; Bal et al., 1990). Einige Autoren gehen davon aus, dass eine Antigenpräsentation ähnlich der der professionellen APC nicht stattfindet (Strange et al.,

1994). Trotzdem zeigt sich, dass IFN γ aktivierte Keratinozyten eine Proliferation von vorher aktivierten, Antigen-spezifischen T-Zell-Klonen induzieren können (Cunningham et al., 1989; Muits et al., 1993; de Bueger et al., 1993). Unter bestimmten Umständen erwiesen sie sich sogar als stärkere APC als bestimmte professionelle APC, wie die Langerhans-Zelle im Mausmodell (Nakano et al., 1998). Zusätzlich können mit IFN γ aktivierte (aber auch nicht aktivierte) Keratinozyten die Mitogen oder Superantigen induzierte T- Zellproliferation unterstützen (Nickoloff et al., 1993a; Nickoloff et al., 1994; Strange et al., 1993).

Hinsichtlich der Expression anderer wichtiger Oberflächenmoleküle für die Interaktion mit immunkompetenten Zellen übernehmen die Keratinozyten Aufgaben ähnlich den professionellen APC. Beispielsweise ICAM-1 (CD54) wird eine zentrale Rolle in der Immunantwort zugesprochen, unter anderem bei der Antigenpräsentation an T-Zellen, Leukozyteneinwanderung ins Gewebe und zellvermittelte Zytotoxizität (Simmons, 1995; Marlin et al., 1987; Kishimoto et al., 1989).

Keratinozyten exprimieren kontinuierlich eine geringe Anzahl an ICAM-1-Molekülen auf ihrer Oberfläche (Lonati et al., 1996; de Panfilis et al., 1992). Bei Zellen von Spendern, die unter einer allergischen Kontaktdermatitis leiden, ist die Zahl der CD54-Oberflächenmoleküle allerdings stark erhöht (Willis et al., 1991; Vejlsgaard et al., 1989; Garioch et al., 1991). Ebenso führt eine Vielzahl an Zytokinen (z.B. IFN γ oder TNF- α (Dustin et al., 1988; Griffiths et al., 1990; Barker et al., 1990a; Middleton et al., 1990)) zu einer Hochregulation von ICAM-1 auf den Keratinozyten (Dustin et al., 1988). Diese Hochregulation scheint unerlässlich für die Leukozyten/Keratinozyten Interaktion zu sein und unterstützt die Einwanderung von Leukozyten aus der Zirkulation in die Dermis und nachfolgend in die Epidermis (Nickoloff, 1988; Barker et al., 1992). Somit leisten die Keratinozyten über die CD54 Expression einen Beitrag zur Einleitung der immunologischen Abwehr in der Haut.

Zusätzlich werden von den Keratinozyten noch andere kostimulatorische Oberflächenmoleküle exprimiert, die für eine T-Zellaktivierung wichtig sind. T-Zellen sind für eine vollständige Aktivierung von zwei Signalen abhängig. Das erste Signal stellt die Interaktion von Antigen, das im MHC II-Molekül gebunden ist,

mit dem T-Zell-Rezeptor dar. Darauf folgt das zweite Signal zwischen spezifischen kostimulatorischen Molekülen und ihren Rezeptoren auf der T-Zelle (Mueller et al., 1989). Zu diesen Molekülen gehören Mitglieder der wachsenden B7-Familie, insbesondere CD80 (B7-1) und CD86 (B7-2) (Dustin et al., 1989; Van-Seventer et al., 1990; Gimmi et al., 1991; Linsley et al., 1991a; Armitage et al., 1992; Liu et al., 1992; Young et al., 1992). Die korrespondierenden T-Zell-Rezeptoren für diese kostimulatorischen Moleküle sind CD28 und CTLA-4 (CD152) (Thompson et al., 1989; June, 1990; Linsley et al., 1990 und 1991b). Antigenpräsentation plus zweites Signal führen zu einer erfolgreichen Aktivierung der T-Zelle. Nach Lehrmeinung führt die Antigenpräsentation ohne zweites Signal zur Anergie (Unerregbarkeit der Th Zellen) (Mueller et al., 1989).

CD80 und CD86 werden von professionellen APC exprimiert. Eine deutliche Hochregulation dieser Rezeptoren erfolgt durch diverse Stimuli, wie bestimmte Zytokine (IFN γ), cAMP, CD40L, CD120b (Freedman et al., 1991; Ranheim und Kipps, 1993), bakterielle Produkte oder andere Mediatoren (Thurner et al., 1997; Agren et al., 1997; Wetzler et al., 1996).

Ruhende menschliche Keratinozyten scheinen kein CD80 (Simon et al., 1994) oder wenn, dann nur in sehr geringer Menge (Fleming et al., 1993; Vandenberghe et al., 1993; Nasir et al., 1995) zu bilden, was nicht für ein ausreichendes zweites Signal genügt und unter normalen Bedingungen eher zu einer Unerregbarkeit bzw. Toleranz der T-Zelle führt. Bei T-Zell-abhängigen entzündlichen Hauterkrankungen allerdings wurden erhöhte Mengen an CD80 auf den Oberflächen der Keratinozyten gemessen (Nickoloff et al., 1993b; Simon et al., 1994). Auch Wakem et al. (2000) stellten fest, dass die CD80-Expression bei Keratinozyten durch bestimmte Allergene und toxische Chemikalien induziert wird. Es scheint also so, dass die Keratinozyten, ähnlich wie die professionellen APC, unter bestimmten pathologischen Umständen CD80 auf ihrer Oberfläche exprimieren und so durch Kostimulation die Aktivierung von T-Zellen unterstützen können.

Ein weiteres wichtiges Rezeptor-Ligandenpaar in der APC-T-Zell Interaktion stellt CD40 / CD40L dar. CD40 ist ein Mitglied der TNF/NGF-Rezeptor-Familie und wurde zuerst auf professionellen APC entdeckt (Banchereau et al., 1991; Noelle et al., 1992; van Kooten et al., 1996). Es ist bekannt, dass CD40 und

sein Ligand (CD40L) auf aktivierten T-Zellen (Armitage et al., 1992) eine Schlüsselrolle in der Entwicklung der zellulären und humoralen Abwehr spielen. Viele Studien haben belegt, dass die CD40-CD40L-Interaktionen essentiell für die volle Entwicklung der kostimulatorischen Funktion der APC, also dem zweiten Signal an die T-Zelle sind (van Essen et al., 1995; Grewal et al., 1995; Höllander et al., 1996). Triggerung des CD40-Rezeptors auf den APC führt zu einer Hochregulation von MHC II-Klasse Molekülen, CD23, ICAM-1, CD80 und CD86 (Kennedy et al., 1994; Peguet-Navarro et al., 1995; Yellin et al., 1995). Insofern ist der Einfluss von CD40/CD40L auf die kostimulatorischen und antigenpräsentierenden Fähigkeiten der professionelle APC immens.

Auch auf Keratinozyten wird CD40 kontinuierlich präsentiert (Peguet-Navarro et al., 1997) und wiederum durch IFN γ hochreguliert (Denfeld et al., 1996). Dies könnte bedeuten, dass in einer Entzündung CD40 eine wichtige Rolle in der Keratinozytenaktivierung spielt.

Außerdem wird durch die Bindung von CD40L an den CD40-Rezeptor auf Keratinozyten die Bildung von Zytokinen, wie TNF- α , IL-6 und IL-8, eine erhöhte ICAM-1-Expression, sowie die Differenzierung der Zellen induziert (Peguet-Navarro et al., 1997; Gaspari et al., 1996; Denfeld 1996). Allerdings zeigte sich in diesem Zusammenhang keine Hochregulation von kostimulatorischen Molekülen, wie z.B. CD80 oder CD86 (Denfeld et al., 1996; Grousson et al., 1998). Diese Versuche wurden *in vitro* an Keratinozyten durchgeführt. Fuller et al. (2002) beobachteten aber auch *in vivo* im Mausmodell im Zusammenhang mit einer erhöhten CD40 Expression in Keratinozyten eine erhöhte TNF- α Sekretion. Dies führte zu einer Migration von dendritischen Zellen in die Haut und zu einer T-Zell Aktivierung (das allerdings nur *in vitro*). Es wird also immer deutlicher, dass die CD40 Expression auf den Keratinozyten eine regionale T-Zellantwort aktivieren und verstärken kann und somit eine wichtige Rolle im Entzündungsgeschehen der Haut spielt.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass nicht-professionelle APC, wie die Keratinozyten, eine Reihe an Fähigkeiten besitzen, die die immunologische Abwehr aktivieren und unterstützen können. Im Gegensatz zu professionellen APC erscheint allerdings die Antigenpräsentation durch MHC II-Moleküle nicht vergleichbar. Außerdem wird in den meisten Fällen ein Stimulus, wie z.B.

IFN γ , benötigt, damit die nicht-professionellen APC bestimmte immunologische Rollen übernehmen. Ob zu diesen Stimuli auch HSP gehören, ist eine interessante Überlegung. Für professionelle APC wurde jedenfalls eine Induktion von MHC II-Molekül- und CD86-Expression durch gp96 und eine erhöhte CD86 durch HSP70 beobachtet (Basu et al., 2000).

1.6. Haut und Hitzeschockproteine

Nachdem im vorherigen Teil der Einfluss der HSP auf Entzündung und Apoptose dargestellt wurde, soll nun das Augenmerk auf eine mögliche klinische Relevanz dieser Fähigkeiten im Hinblick auf entzündliche Hauterkrankungen, im Besonderen auf die atopische Dermatitis, gelegt werden.

Bei der atopischen Dermatitis handelt es sich um eine chronisch rezidivierende Ekzemerkrankung, die typischerweise zuerst im Kindesalter beginnt (Leung et al., 2004). Die Inzidenz dieser häufigsten chronischen Hauterkrankung hat ebenso wie die anderen Erkrankungen des atopischen Formkreises (allergisches Asthma und Heuschnupfen), in den letzten Jahrzehnten kontinuierlich zugenommen. Diese Tendenz, deren Ursache letztendlich nicht geklärt ist, hält weiter an. Bei der multifaktoriell bedingten atopischen Dermatitis ist zwar eine genetische Prädisposition vorhanden, jedoch kommt es in der Regel erst unter dem Einfluss unterschiedlicher „Provokationsfaktoren“ zur klinischen Symptomatik (Leung et al. 2004). Zu solchen Provokationsfaktoren gehören bei entsprechender Sensibilisierung insbesondere Umweltallergene wie Pollen, Hausstaubmilben, Tierhaare, Nahrungsmittel. Ebenso besitzen emotionale Belastungen, hormonelle Veränderungen, Wohnverhältnisse etc. einen Einfluss (Werfel und Kapp, 1998). Für verschiedene Allergene wurde nachgewiesen, dass sie bei entsprechend sensibilisierten Personen zu IgE-Spiegelerhöhungen und zu einer Aktivierung von zirkulierenden Lymphozyten führen (Werfel et al., 1998; Wistokat-Wülfing et al., 1998). Zusätzlich weisen Ablagerungen von eosinophilen-spezifischen Proteinen in Hautläsionen auf eine eosinophile Infiltration und Degranulation in der Haut von „Atopikern“ hin (Kiehl und Kapp, 1998). T-Zellen spielen eine wichtige Rolle in der Pathogenese der atopischen Dermatitis, die in den letzten Jahren besser aufgeklärt wurde. Die

Mehrzahl der hautinfiltrierenden Lymphozyten gehört zu den T-Helferzellen, wobei der größte Teil MHC II-Moleküle als Zeichen ihrer Aktivierung exprimiert. In akuten Läsionen werden vor allem aktivierte Th2-Lymphozyten vorgefunden, während chronische Läsionen eher von einer Th-Zellinfiltration mit Th-1 ähnlichem Zytokinmuster geprägt sind (Werfel et al., 1996). Es werden also in der frühen Phase der Entzündung eher Typ-2 Zytokine, wie IL-4, IL-5 und IL-13, und zu einem späteren Zeitpunkt bevorzugt Typ-1 Zytokine, wie IFN γ , produziert (Grewe et al., 1998). Dem IFN γ wird dabei eine maßgebliche Beteiligung an der Chronifizierung des Ekzems zugeschrieben. Dies zeigt sich zum Beispiel darin, dass Mäusen, denen IFN γ in die Epidermis gespritzt wurde, spontan Ekzeme entwickeln, was ein wichtiges klinisches Zeichen der atopischen Dermatitis darstellt (Carrol et al., 1997). Barker et al. beobachteten dieses Phänomen auch in der menschlichen Haut (Barker et al., 1990b).

Worin dieser Wechsel des Zytokinmusters begründet liegt, ist bisher unklar. Diese T-Zellzytokine üben wichtige regulatorische Effekte auf andere immunkompetente Zellen sowie auf das lokale Mikromilieu der Entzündung aus, mit z.B. vermehrter Expression bestimmter Adhäsionsmoleküle.

Ein weiterer wichtiger Mechanismus in der Entwicklung der atopischen Dermatitis ist die Pathologie der Keratinozyten. In Proben aus den Ekzemen atopischer Patienten wird histologisch charakteristischerweise eine intraepidermale Spalt- und Blasenbildung (Akantholyse) beobachtet (Trautmann et al., 2001a). Diese Akantholyse geht auf einen Verlust der Adhäsion zwischen den Keratinozyten zurück, der zu einem Flüssigkeitseinfluss aus der Dermis in die Epidermis führt. Außerdem induziert das von den aktivierten T-Zellen sezernierte IFN γ den FAS-Rezeptor auf den Keratinozyten. Dadurch können FAS-Liganden auf epidermalen T-Zellen oder freie FAS-Liganden, die von T-Zellen produziert wurden, Apoptose induzieren. Diese Keratinozyten-Apoptose, begründet in einer Hautinfiltration durch aktivierte T-Zellen, stellt gemäß der Ansicht einiger Autoren ein Schlüsselereignis in der Pathogenese der atopischen Dermatitis dar (Trautmann et al., 2000).

Daneben existieren aber noch zwei weitere Dysregulationen in der Apoptose von immunregulatorischen Zellen, die in der Pathologie der atopischen Dermatitis wichtig sind. Einmal wird die Apoptose der Eosinophilen in der Haut durch erhöhte IL-3, IL-5 und GM-CSF Spiegel verzögert (Akdis et al., 1999, Wedi et

al., 1998). Als zweites werden epidermale, aktivierte T-Zellen, die sowohl den FAS-Rezeptor als auch dessen Liganden exprimieren, von dem Untergang durch Apoptose geschützt, im Gegensatz zu vergleichbaren T-Zellen im peripheren Blut. Der Schutz vor der Apoptose wird durch die Zytokine IL-2, IL-4 und IL-15 und extrazelluläre Matrixkomponenten, wie Fibronectin und Transferrin aufgebaut (Akdis et al., 2000).

Im Zusammenhang mit dem Schutz vor der Apoptose und der atopischen Dermatitis muss also differenziert werden zwischen dem Schutz bei Keratinozyten, was einen positiven Einfluss auf die Krankheit bedeuten würde, und dem Schutz bei infiltrierenden Entzündungszellen, wie z.B. den eosinophilen Granulozyten, was einen negativen Einfluss darstellt. Ob bei Veränderungen im Apoptoseverhalten auch HSP eine Rolle spielen, ist bisher wenig erforscht worden. So könnten HSP als mögliche Schutzproteine vor Apoptose (siehe oben) die atopische Dermatitis sowohl positiv als auch negativ beeinflussen. Dies ist in diesem Zusammenhang beispielsweise schon für Dexamethason gezeigt worden, dass direkt die Fas-vermittelte Apoptose der Keratinozyten verhindert (Trautmann et al., 2001b).

Wie genau der Einfluss von HSP auf die Apoptose der Keratinozyten auf zellulärer Ebene aussehen könnte, ist unklar. Einmal existieren die oben zusammengefassten Beobachtungen, dass HSP70/HSP27 direkt vor Apoptose schützen können. Auf der anderen Seite könnte auch die oben beschriebene Induktion der IL-12-Produktion von Monozyten durch HSP70 einen Effekt auf die Keratinozytenlebensspanne haben. Schwarz et al. (2002) stellten nämlich fest, dass IL-12 (die durch UV-Bestrahlung ausgelöst) Apoptose bei Keratinozyten unterdrückt. Also könnten HSP auch auf diesem indirekten Wege die Lebenszeit von Hautzellen verlängern.

Dass HSP einen positiven Einfluss auf verschiedene Hauterkrankungen besitzen, postulierte Polla schon 1990. Dabei war lange unklar, ob HSP überhaupt extrazellulär in der Haut vorkommen, um eine Wirkung entfalten zu können. Inzwischen verdichten sich die Hinweise, dass beispielsweise HSP70 durchaus extrazellulär in der Haut vorkommt, was in Beispielversuchen von Wittmann et al. (unpubliziert) bestätigt wurde:

HSP70 (ng/ml)	Hautprobe 1	Hautprobe 2	Hautprobe 3
Epidermis	7,7	4,8	2,5
Dermis	<0,7	<0,7	0,9

Tabelle 1: HSP70 extrazellulär in Hautproben

Die Beobachtung, dass nekrotische Zellen HSP freisetzen (Basu et al., 2000), lässt die Schlussfolgerung zu, dass in Entzündungsprozessen in der Haut durch eine Nekrose untergegangene Zellen dies auch tun.

1.7. Fragestellung

Intrazellulär und extrazellulär vorkommende Hitzeschockproteine haben einen vielfältigen und noch nicht vollständig geklärten Einfluss auf Entzündungsabläufe. Sie beeinflussen die Zytokinproduktion, Antigenpräsentation und das „Sterbeverhalten“ von Zellen.

Die Rolle von HSP für chronisch entzündliche Hauterkrankungen ist bisher nur ansatzweise untersucht. Bei diesen Erkrankungen, zu denen auch die atopische Dermatitis und das allergische Kontaktekzem gehören, kommt es zur Infiltration von Lymphozyten in die Epidermis. Hier erfolgt die Interaktion mit den residenten Zellen der Epidermis, den Keratinozyten. Die aktive Rolle der Keratinozyten am Entzündungsverlauf als „immunkompetente Zellen“ wird zunehmend aufgedeckt. Bisher ist die Rolle von Hitzeschockproteinen auf die funktionellen Eigenschaften von Keratinozyten nicht vollständig bekannt. Dies trifft auch auf die Regulation der HSP-Expression in Keratinozyten unter „entzündlichen“ Bedingungen zu.

Ziel dieser Arbeit ist es, einen ersten Eindruck über die Regulation von HSP in Keratinozyten und Einfluss von HSP auf Keratinozyten zu erhalten. Monozyten/Makrophagen des peripheren Blutes, bei denen bereits zahlreiche Daten zur HSP-Antwort bekannt sind, wurden zum Vergleich mit untersucht.

Diese Arbeit soll ebenso Hinweise liefern, ob „extrazelluläres“ HSP27, welches bisher fast ausschließlich als intrazelluläres „phospho“Protein im MAPKinase Signalweg untersucht wurde, funktionellen Einfluss auf Keratinozyten und im Vergleich dazu auf Monozyten ausübt.

Insbesondere sollten – vor dem Hintergrund bestehender Vorarbeiten - folgende Fragen beantwortet werden:

- Haben HSP70 und HSP27 einen Einfluss auf die Zytokinproduktion (und Oberflächenexpression), insbesondere des immunregulatorisch wichtigen IL-12 in humanen Monozyten und primären Keratinozyten?
- Haben HSP einen Einfluss auf Apoptose/Überleben von humanen Monozyten und Keratinozyten?
- Hat HSP27 einen Einfluss auf die antigen-spezifische T-Zell Antwort?
- Wird die intrazelluläre HSP27 Expression durch „Entzündungsmediatoren“ messbar verändert in humanen Monozyten und humanen primären Keratinozyten?

Diese Arbeit soll auch als Basis für weitere Untersuchungen an Keratinozyten verschiedener Spender bzw. für ex vivo Untersuchungen bei chronisch entzündlichen Hauterkrankungen dienen.

2. Material, Methoden, Geräte und Hilfsmittel

2.1. Methoden

2.1.1. Isolation peripherer mononukleärer Blutzellen (PBMC)

Periphere mononukleäre Blutzellen (PBMC) werden aus heparanisierten Vollblutspenden gewonnen. Diese Spenden sind von atopisch oder nicht atopischen Freiwilligen (je nach Fragestellung) zur Verfügung gestellt worden. Nach erfolgter Blutabnahme aus einer Armvene des Spenders wird die Lymphozyten-Monozyten-Fraktion aus der gesamten Blutspende isoliert. Um die Erythrozyten und Granulozyten von dieser Fraktion zu separieren, wird eine Dichtegradientenzentrifugation des Vollblutes über einem Trennmedium (Lymphoprep (d=1,077g/ml)) durchgeführt. Zu Beginn wird eine Verdünnung mit Iscove im Verhältnis 1:2 vorgenommen. Anschließend erfolgt die vorsichtige Überschichtung des Trennmediums mit diesem Gemisch. Dabei wird eine erneute Verdünnung im Verhältnis 1:3 (1 Teil Lymphoprep und 2 Teile Blut/Medium-Gemisch) erreicht. Nach Zentrifugation (40 min zuzüglich jeweils 3 min Ein- und Auslaufzeit, 403g, 25°C, Bremse 0) befinden sich die PBMC aufgrund von Dichteunterschieden im Interphasenring zwischen Lymphoprep und Iscove, die Erythrozyten und Granulozyten im Sediment.

Im Anschluss wird der Interphasenring mit einer Pasteurpipette abgenommen und erneut zentrifugiert (403g, 15 min, 4°C, Bremse 9). Um die vorhandenen Thrombozyten aus der Probe zu entfernen, folgen zwei weitere Waschgänge (250g, 15 min, 4°C, Bremse 9). Die Überstände werden verworfen und die Zellpellets in Vollmedium (IAB= Iscove + 4% AB-Serum s.u.) resuspendiert. Die Zellzahl wird mithilfe der Neubauer-Zählkammer bestimmt.

2.1.2. Berechnung der Zellzahl mithilfe der Neubauer-Zählkammer

Zur Berechnung der Zellzahl wird die Probe je nach erwarteter Anzahl in 1-10ml IAB-Medium aufgenommen. Danach erfolgt die Verdünnung eines kleinen Teils dieser Zellsuspension im Verhältnis 1:20 mit Türk´scher Lösung. Unter dem Mikroskop werden nun 4 Großquadrate der Neubauer-Zählkammer ausgezählt. Die Zellen erscheinen blau angefärbt. Die Berechnung erfolgte nach der Formel:

Mittelwert der Zellzahl x Verdünnungsfaktor x Volumen der Ausgangszellsuspension in ml x Kammer-Festfaktor 10^4 = Zellzahl/ml.

2.1.3. Anreicherung der Monozytenfraktion

Zur Gewinnung von Monozyten aus dem Vollblut werden die aufgereinigten PBMC einem Adhärenzschritt unterworfen. Dabei wird die Eigenschaft von Monozyten genutzt, schnell und ausgeprägt bei Wärme an Plastikflächen zu adhären. Dieses Verhalten zeigen Lymphozyten und NK-Zellen nicht.

Zur Durchführung dieses Verfahrens werden die PBMC nach dem letzten Thrombozytenwaschgang in einer Dichte von 5×10^6 Zellen/ml in IAB-Vollmedium aufgenommen. Jeweils 10ml dieser Zellsuspension wird nun in eine vorgewärmte Petrischale überführt, sodass die Zelldichte bei 5×10^7 pro Schale liegt. Die Monozyten adhären während einer zweistündigen Inkubation bei 37°C in feuchter, mit 5% CO₂ angereicherter Atmosphäre am Boden der Petrischale. Anschließend wird das Medium mit den nicht adhären Zellen abgesaugt. Zum Erreichen einer hohen Anreicherung von Monozyten mit einem möglichst geringen Lymphozytenanteil folgen drei bis acht Waschgänge mit Iscove. Die Reinheit der Monozyten mit dieser Methode liegt bei 60-80%. Darauf folgt eine etwa 10 minütige Einlagerung der Petrischale in Eis, was den Ablösevorgang der Monozyten unterstützt. Mit Hilfe eines Zell-Schabers werden die Monozyten vollständig abgelöst. Nach lichtmikroskopischer Kontrolle werden die Monozyten in IAB-Vollmedium kultiviert.

2.1.4. Durchflusszytometrische Messung am FACS-Scan

Zur intrazellulären Messung von Proteinen muss zunächst einmal gewährleistet werden, dass die Zellen ihre unter Stimulation produzierten Proteine nicht über den Golgi-Apparat ausschleußen. Deswegen wird dieses Zellorganell direkt nach der Stimulation mit dem Reagenz GolgiPlug in Kontakt gebracht, das zu 90% aus Dimethylsulfoxid und zu 10% aus Brefeldin A, dem eigentlich blockierenden Stoff, besteht. Nun kann der Golgi-Apparat keine Proteine "sezernieren". Diese akkumulieren intrazellulär und können mittels Antikörper-Färbung gemessen werden. Um eine Schädigung der Zellen durch Brefeldin und eine damit verbundene nicht aussagekräftige Messung zu verhindern, dürfen die Zellen nicht länger als 12 Stunden mit dem Brefeldin inkubiert werden.

Für die eigentliche Messung muss die Zellwand für mit Farbstoff konjugierte spezifische Antikörper durchlässig werden. Hierfür werden die Zellen zunächst fixiert (Cytofix, BD) und anschließend die Zellwand permeabilisiert (Cytoperm, BD). Weitere Waschschrte und die Antikörperinkubation werden in Gegenwart von Cytoperm durchgeführt, um die Poren in der Zellmembran aufrecht zu erhalten. Die intrazelluläre Messung wird folgendermaßen durchgeführt:

Nachdem die Zellen stimuliert und mit GolgiPlug in Kontakt gebracht worden sind, wird nach 12 Stunden die Mikrotiterplatte zentrifugiert (Zentrifuge: 1300 U/min, 3 min, 4°C, 98 RZB, 9 Bremse) und der Überstand abgeschlagen. Danach erfolgt die Zugabe von 100µl Cytofix Lösung und ein Inkubation für 20 min bei 4°C. Nach zweimaligem Waschen mit jeweils 200µl Perm/Wash Lösung (Zentrifuge: siehe oben) werden die Zellen anschließend in 50µl der Perm/Wash Lösung aufgenommen.

Nun wird 5µl/well eines mit Farbstoff konjugierten Antikörpers hinzugefügt (Antikörperkonzentration zwischen 1 und 2,5 µg/ml gemäß im Labor durchgeführten Titrationsexperimenten) und die Zellen für 60 min bei 4°C in Dunkelheit inkubiert.

Nach weiteren zwei Waschschrten (siehe oben) werden die Zellen schließlich in 200µl PBS aufgenommen und können am FACS gemessen werden.

2.1.5. Oberflächenfärbung von Zellen

Für die Messung von Proteinen an der Oberfläche von Zellen genügt es, sie mit Farbstoff konjugierten, spezifischen monoklonalen Antikörpern in Kontakt zu bringen. Die Zellen werden nach Stimulation und entsprechender Inkubationszeit zweimal mit Blockpuffer (=PBS mit Immunglobulinen) gewaschen (Zentrifugeeinstellung: siehe Kapitel 2.1.4.). Nach anschließender Aufnahme in 100µl PBS wird eine ausreichende Menge an Antikörper (1-2,5 µg/ml) hinzugefügt. Nach 45 Min Inkubation in Dunkelheit und zwei weiteren Waschschrritten werden die Zellen schließlich in 200µl PBS aufgenommen und können am FACS gemessen werden.

2.1.6. Durchflußzytometrische Messung und Auswertung

An einem FACS der Firma Becton Dickinson, Heidelberg werden die durchflußzytometrischen Messungen durchgeführt. Mit der CELL Quest Software von Becton Dickinson erfolgt die Auswertung.

Die zu messende Probe wird in ein Polypropylenröhrchen pipettiert und gelangt durch Überdruck in eine Meßküvette innerhalb des FACS-Gerätes. Nun wird jeder Partikel der Probensuspension kontinuierlich an einem Argonlaser (emittierte Wellenlänge: 488nm) vorbeigeführt.

Die Streuung des Lichtbündels in Richtung des Laserstrahles zeigt die Größe des Partikels an (Vorwärtsstreulicht, engl.: „Forward Scatter“, FSC). Durch die Streuung im rechten Winkel zum Strahl erschließt sich die Granularität der gemessenen Partikel (Seitwärtsstreulicht, engl.: „Side Scatter“, SSC).

Zusätzlich dazu kann in drei Kanälen die Fluoreszenzintensität von verwendeten Farbstoffen gemessen werden. Gängig sind die Farbstoffe Fluoresceinisothiocyanat (FITC, Wellenlänge: 525nm (grün)) und Phycoerythrin (PE, Wellenlänge: 575nm (rot)).

Es wurden pro Probe 10.000 Ereignisse gemessen und, sortiert nach Größe, Granularität und Farbe, elektronisch gespeichert. In der Auswertung können bestimmte Filter („Gates“) um spezielle Zellpopulationen gesetzt werden, die genauer betrachtet werden sollen.

2.1.7. ELISA zum Nachweis von Interleukin-12

Dieser ELISA arbeitet nach dem „Sandwich“-Prinzip.

Auf den Mikrotiterplatten (MTP) befinden sich IL-12 spezifische monoklonale Antikörper. Nachdem nun die Standard- bzw. Probenlösungen auf die MTP pipettiert worden sind, wird das Zytokin durch den Antikörper gebunden. Durch einen Waschvorgang (siehe unten) werden ungebundene Proteine eliminiert. Nun wird ein polyklonaler Enzym-gebundener Antikörper gegen IL-12 hin zugegeben. Ein erneuter Waschvorgang entfernt nicht gebundenen Antikörper. Nach Zugabe einer Substratlösung entsteht eine messbare Farbreaktion, die abgestoppt wird. Der Farbumschlag von blau nach gelb kann schließlich in einem Spektrophotometer quantitativ gemessen werden.

Der genaue Ablauf sieht wie folgt aus:

Der so genannte capture antibody (IL-12 spezifischer monoklonaler Antikörper), der in einem „coating buffer“ verdünnt ist, wird auf die MTP pipettiert und 24 Stunden bei 4 °C inkubiert.

Hiernach erfolgt ein Waschvorgang der Platte. Die Flüssigkeit der Löcher wird durch Umdrehen und Dekantieren der MTP entfernt. Die restliche Flüssigkeit kann nun durch kurzzeitiges Auflegen der umgedrehten MTP auf Zellstoff entfernt werden. Daraufhin wird 300µl Waschpuffer pro well pipettiert und die Flüssigkeit wieder durch Umdrehen und Dekantieren der MTP entfernt. Dieser Waschvorgang wird insgesamt viermal durchgeführt. Nun folgt die Zugabe von 200µl „assay diluent“ pro well und eine Inkubation für 1 Stunde. Nach einem weiteren Waschvorgang (siehe oben) erfolgt jetzt die Zugabe von 100µl Standard bzw. Probe pro well.

Daraufhin wird, nach einer Inkubationszeit von 2 Stunden und einem weiteren Waschvorgang, 100µl „detection antibody“ (polyklonaler Enzym-gebundener Antikörper gegen IL-12), der in „assay diluent“ gelöst ist, pro well hinzugefügt.

Auf eine weitere Inkubationszeit von einer Stunde und einem Waschschrift folgt nun die Zugabe von 100µl Avidin-HRP pro well. Dies ist eine vortitrierte Enzymlösung, die bei der Entstehung der Farbreaktion nach Zugabe der Substratlösung eine entscheidende Rolle spielt. Nach der letzten Inkubation und dem letzten Waschen wird 100µl/well „substrat solution“ zugegeben. Nun kann nach 15

min und anschließendem Stoppen der Reaktion mit 50µl „stop solution“ pro well die Messung bei 450nm im Photometer erfolgen.

2.1.8. CFSE –Färbung

Um die Proliferation von teilungsfähigen Zellen darzustellen, kann der Farbstoff CFSE (5-(und 6-) carboxyfluorescein diacetate, succinimidyl ester) verwendet werden. Sein Absorptionsmaximum liegt bei 290nm.

Nachdem der Ester CFSE durch die Zellmembran diffundiert ist, wird er durch zytoplasmatische Esterasen gespalten. Der freie Farbstoff kann nun die Zelle nicht mehr verlassen. Erfolgt im weiteren Verlauf eine Zellteilung, verteilt sich der Farbstoff jeweils zur Hälfte auf die beiden Tochterzellen. Die am FACS gemessene Fluoreszenz nimmt dementsprechend mit einer steigenden Anzahl an Zellteilungen immer mehr ab.

Zur Färbung werden 1×10^7 Zellen in 1ml Iscove-Medium aufgenommen. Nachdem das CFSE mit einer Endkonzentration von 10^{-6} M hinzugefügt worden ist, erfolgt eine 3-minütige, lichtgeschützte Inkubation unter leichtem Schwenken. Zum Abstoppen der Reaktion wird nun 2ml IAB-Medium (gleiches Volumen wie Lösung) hinzugefügt und eine Min ruhen gelassen. Nach zweimaligem Waschen mit Iscove-Medium (Zentrifuge:1200 U/min, 7 min lang, 4°C) werden die Zellen in IAB aufgenommen.

Schließlich erfolgt die Ausplattierung die Proben und die Stimulation. Nach einem Zeitraum von ca. einer Woche kann die Proliferation durchflusszytometrisch bestimmt werden.

2.1.9. Apoptose- Nekrose- Färbung

Die Apoptose, oder auch physiologischer Zelltod, beschreibt das allmähliche Erlöschen der einzelnen Zellfunktionen. Dabei ist die Veränderung der Plasmamembran eine der ersten Zeichen der Apoptose. Zum Beispiel wird das Membranphospholipid Phosphatidylserin (PS) von apoptotischen Zellen auf der extrazellulären Seite der Plasmamembran exponiert. Annexin V, ein 35-36 kDa Ca^{2+} -abhängiges Phospholipid-bindendes Protein, besitzt eine hohe Affinität zu diesem PS. So ist also Annexin V ein Marker für Zellen, die sich in einem frühen

Stadium der Apoptose befinden. Um eine durchflusszytometrische Bestimmung zu ermöglichen, ist das Annexin V mit dem Farbstoff FITC konjugiert.

Um eine Apoptose von einer Nekrose, also eine morphologische Veränderung einer Zelle nach ihrem Absterben, zu unterscheiden, wird Annexin V zusammen mit Propidium-Jodid (PI) verwendet. Dieser Stoff färbt Zellen an, die keine intakte Zellmembran mehr besitzen. So kann man (früh-)apoptotische (Annexin V positiv, PI negativ) von nekrotischen (oder spät apoptotischen) Zellen (Annexin V positiv, PI positiv) unterscheiden.

Probleme bei dieser Art der Darstellung bestehen einmal in einer immer vorhandene, meist relativ kleinen Menge an apoptotischen bzw. nekrotischen Zellen in jeder Probe. Dies kann jedoch durch eine unbehandelte Kontrollprobe abgeglichen werden. Die Menge an apoptotischen bzw. nekrotischen Zellen in diesem Standard wird dann jeweils von der Menge ebendieser Zellen in den anderen Probelösungen subtrahiert.

Außerdem sollte immer eine Positivkontrolle vorhanden sein. Dazu wird eine Probe ausschließlich mit PI gefärbt, um den Anteil an nekrotischen Zellen in der unbehandelten Ursprungszellpopulation zu ermitteln.

Ein weiteres Problem besteht darin, dass Zellen, welche die Apoptose durchlaufen, in einem Endstadium von nekrotischen Zellen morphologisch nicht zu unterscheiden sind. Also werden Zellen, die die Apoptose (fast) vollständig durchlaufen haben, und nekrotische Zellen von beiden Farbstoffen angefärbt. Die Unterscheidung zwischen den beiden Gruppen ist mit der angewendeten Methode nicht möglich.

Es wurden sowohl Monozyten, als auch Keratinozyten und HaCats nach Stimulation auf ihr Apoptose-Nekrose-Verhalten untersucht. Hier nun der genaue Ablauf:

Monozytenfärbung

Nachdem die mit verschiedenen Stoffen behandelten Zellen zweimal mit PBS gewaschen wurden, erfolgt nach einer Stunde Inkubationszeit die Resuspension aller Zellen mit 100µl „binding buffer“. Danach werden sie in ein 5ml Kulturröhrchen gegeben. Nun erfolgt die Zugabe von 5µl Annexin V und 5µl PI in jedes Röhrchen. Jede Probe wird jetzt gut geschüttelt und für 15 Min bei 25°C bei

Dunkelheit inkubiert. Daraufhin kann nach Zugabe von 400µl binding buffer am FACS gemessen werden.

HaCat- und Keratinozytenfärbung

Die Zellen werden, wie im Abschnitt über die Passage von HaCats und Keratinozyten (siehe unten) beschrieben, abgelöst. Danach erfolgt ein Waschgang mit PBS (Zentrifuge bei 1300 U/min, 6 min lang), wonach die Zellen in 5ml Kulturröhrchen gegeben werden. Nach zwei weiteren Waschschrritten und einer Inkubationszeit von 15 min werden alle Zellen mit 100µl „binding buffer“ resuspendiert. Das weitere Vorgehen ist äquivalent zum Ablauf bei der Monozytenfärbung.

2.1.10. Gewinnung von Keratinozyten aus Vollhautspenden

Keratinozyten sind die Zellen, die den größten Teil der Epidermis der menschlichen Haut bilden. Um sie in ausreichender Anzahl aus einer Vollhautspende zu gewinnen, sind mehrere Verarbeitungsprozesse notwendig.

Nachdem die Haut im Transportmedium Hank/Hepes Genta (s.u.) aus dem OP angeliefert worden ist, wird sie mithilfe einer Pinzette und einer chirurgischen Schere in kleine Stücke geschnitten. Diese werden über 24 Stunden mit Dispase bei 4°C inkubiert. Dieses Enzym trennt die Epidermis von der Dermis. Nun wird 0,025g Trypsin abgewogen und in 10ml Hanks/Hepes Genta aufgelöst. Nachdem jetzt die Epidermis von der Dermis mithilfe einer Pinzette getrennt wurde, werden die gewonnenen Epidermisstücke in die auf 37°C aufgewärmte Trypsinlösung gegeben. Dieses Enzym trennt die einzelnen Keratinozyten aus dem epidermalen Verband heraus. Nach etwa 20 Min Inkubation bei 37°C wird 10ml steriles PBS zusammen mit FCS zum Abstoppen der Enzymreaktion hinzugegeben. Die so gewonnenen Zellen werden nach zweimaligem Waschen mit PBS (Zentrifuge: 1200 U/min, 3 min) in KGM-Medium aufgenommen und in einer Zellkulturflasche ausgesäht. Diese Flasche darf die nächsten 48 Stunden nicht bewegt werden, um nicht das Anwachsen der Keratinozyten an den Boden zu stören.

2.1.11. Passage von HaCats

Die HaCat-Zelllinie wächst unter optimalen Bedingungen sehr schnell. Deswegen ist es nach gewissen Zeitabständen notwendig, die Zellen abzulösen und in ein größeres Behältnis zu überführen oder aufzuteilen (=passagieren). Die abgelösten Zellen stehen für Experimente zur Verfügung.

Alle Medien und Lösungen werden in einem Wasserbad angewärmt. Als erstes muss das Kulturmedium, in dem die HaCats aufgenommen sind, abgesaugt werden. Nach zweimaligem Waschen mit PBS wird 0,02%iges EDTA zugegeben (ca. 5ml bei mittlerer Kulturflasche oder ca. 300µl pro well in der 24er Platte). Nach einer Inkubationszeit von mindestens 15 Min und einer mikroskopischen Prüfung, ob sich bereits Zellen abgelöst haben, erfolgt nun das vorsichtige Absaugen des EDTAs. Nun wird Trypsin/EDTA (ca. 5ml bei mittlerer Kulturflasche oder ca. 300µl pro well in der 24er Platte) zugegeben. Hieraufhin lösen sich die Zellen vom Boden des jeweiligen Behältnisses ab. Der Zeitraum, bis dieses beginnt, ist variabel. Auf Grund dessen ist eine ständige mikroskopische Kontrolle während der folgenden Inkubationszeit von 1 bis ca. 10 Min im Brutschrank notwendig. Nach erfolgter Ablösung der HaCats werden sie in ein vorbereitetes Röhrchen mit Medium/10% Serum (FCS) überführt. Dies muss sehr schnell erfolgen, da dass Trypsin bei zu langer Einwirkzeit zytotoxisch wirkt. Die im Serum (FCS) vorhandenen Enzyme spalten das Trypsin.

Nach einer Zentrifugation des Röhrchens und dem Absaugen des Überstandes kann die Zellzahl mittels Neubauer Zählkammer bestimmt und die Zellen in neuer Lösung in ein anderes Behältnis überführt werden.

2.1.12. Passage von Keratinozyten

Der Ablauf ist mit dem Verfahren bei den HaCats nahezu identisch. Einziger Unterschied ist eine Verkürzung der Inkubationszeiten, da sich Keratinozyten leichter ablösen lassen.

2.1.13. Einfrieren der HaCat-Zellen

Um HaCat-Zellen über einen längeren Zeitraum unbeschadet lagern zu können, ist es notwendig sie einzufrieren.

Dazu werden, nachdem sich die HaCat-Zellen vom Boden der Zellkulturflasche abgelöst haben (siehe oben), ca. 10^6 Zellen mit PBS gewaschen (Zentrifuge: 1200 U/min, ca.3 Min lang) und in ein spezielles „Einfrierröhrchen“ („frozen tube“) mit einem Gesamtvolumen von 1,8ml gegeben. Um ein möglichst langes Überleben zu garantieren, werden die Zellen vorher in eine Lösung aufgenommen, die zu 80% aus FCS, zu 10% aus DMEM und zu 10% aus DMSO (Dimethylsulfoxid) besteht. DMSO wirkt auf der einen Seite als Frostschutzmittel einer Kristallbildung entgegen. Auf der anderen Seite ist es als stark zytotoxisch anzusehen, so dass die Lösung mit den HaCat-Zellen möglichst schnell eingefroren werden muss, um eine zu starke Schädigung der Zellen zu verhindern. Nachdem die Zellen mit einer Abkühlgeschwindigkeit von 1°C pro Min eine Temperatur von -80°C erreicht haben, können sie nach 1-2 Tage in Flüssigstickstoff bei circa -196°C eingefroren werden. Auf diese Weise ist es möglich, die HaCat-Zellen auf nahezu unbegrenzte Zeit unbeschadet aufzubewahren.

2.1.14. Auftauen der HaCat-Zellen

Auch das Auftauen der Zellen muss aufgrund der Zytotoxizität des DMSO sehr schnell geschehen. Dazu wird das Röhrchen mit den eingefrorenen HaCat-Zellen in ein Wasserbad mit einer Temperatur von 37°C gelegt. Nach wenigen Min ist die Lösung in diesem Röhrchen bis auf einen kleinen Eisklumpen aufgetaut. Dieser Klumpen, der auch die Zellen enthält, wird jetzt in ein mit DMEM gefülltes Röhrchen gegeben und zweimal gewaschen (Zentrifuge: 1200U/min, 3 min). Danach stehen die Zellen einer erneuten Kultivierung oder Versuchen zur Verfügung.

2.1.15. Medienwechsel bei HaCat bzw. Keratinozyten- Kulturen

Ein häufiges Wechseln der Zellmedien ist aufgrund des Wachstumsverhaltens und des Verbrauchs an "Nährstoffe", insbesondere bei den schnell wachsenden HaCat-Zellen regelmäßig notwendig.

Die jeweils in der Aufzählung der verwendeten Medien (siehe unten) genannten DMEM- bzw. KGM- Medien müssen vorher auf 37°C aufgewärmt werden. Das alte Medium wird entweder direkt abdekantiert oder mit einer sterilen Pasteur-Pipette abgesaugt. Dabei darf die Pipettenspitze niemals die Wachstumsfläche in der Kulturflasche berühren, da sonst T-Zellen geschädigt werden können.

Nun wird mit einer sterilen Auslauf-Pipette neues, aufgewärmtes Medium in die Kulturflasche gegeben. Das frische Medium darf nicht über die Wachstumsfläche gespült werden, da die Gefahr besteht, dass Zellen sich ablösen. Außerdem muss schnell neues Medium hin zugegeben werden, um ein Austrocknen der Zellen zu verhindern.

Um beim Medienwechsel die maximal mögliche Sterilität zu gewährleisten, sollte die Kulturflasche nie länger als nötig außerhalb des Brutschrankes stehen, und die Arbeitsschritte so schnell wie möglich durchgeführt werden.

2.1.16. UVB-Bestrahlung von Zellen

Um eine Apoptose bei Zellen als Positivkontrolle auszulösen, besteht die Möglichkeit, dies durch eine Bestrahlung mit UVB-Licht zu erreichen.

Dazu werden die Zellen in ihrer Zellkulturplatte unter die Bestrahlungsbank gelegt. Nachdem die gewünschte UVB-Dosis eingestellt worden ist, wird die Bestrahlung automatisch in einem ausreichenden Zeitraum durchgeführt (bei 40 mJ etwa 22 sec). Wichtig ist dabei, dass der Deckel der Platte vorher abgenommen wird, da die UVB-Strahlen diesen nicht durchdringen können.

2.1.17. Real Time PCR

Die Polymerase Chain Reaction (PCR) ist eine Methode zur Vervielfältigung (Amplifizierung) eines vorher bestimmten Abschnittes einer DNA. Diese Methode wurde 1985 von Karl Mullis entwickelt. Die Sequenz eines nachzuweisenden DNA-Fragments muss zur Durchführung der PCR bekannt sein.

Zunächst werden die beiden Stränge der DNA zu zwei Einzelstränge aufgetrennt (Denaturierung). Dies geschieht durch eine Temperaturerhöhung auf 90°C.

Nun binden zwei Oligonucleotide (Primer) mit einer Länge von 15-25 Basen komplementär an spezifische Stellen der Einzelstränge. Sie umrahmen den ge-

suchten Bereich auf der DNA und dienen als Reaktionspartner für die DNA Polymerisation. Die Hybridisierung der Primer mit den Einzelsträngen erfolgt je nach Primer bei einer Temperatur von i.d.R. 50-65°C (Annealing).

Eine thermostabile DNA-Polymerase (Taq-Polymerase) kann nun die Primer in 3'-Richtung unter Verwendung von zu den Einzelsträngen komplementären Basen verlängern. Dies geschieht bei einer Temperatur von 72°C (Elongation). Die so entstandenen zwei Kopien der Ursprungs-DNA dienen im nächsten Zyklus der PCR ebenfalls als Vorlage für die Primer. So führt mehrmaliges Wiederholen (in der Regel 25-35 Zyklen) zu einer raschen Vervielfältigung des gesuchten Abschnittes.

Um Rückschluss über das Vorliegen von Transkripten für ein bestimmtes Protein zu erhalten, muss zunächst die mRNA das Enzym reverse Transkriptase in cDNA umgeschrieben werden. Dann kann eine PCR durchgeführt werden.

Probengewinnung

Nach der Stimulation müssen die Zellen mit PBS gewaschen werden. Danach erfolgt die Aufnahme in 20µl PBS und 80µl Lysis Puffer (Firma: Roche). Dieser zerstört die Zell- und die Kernmembran. Nun werden die Proben in ihren Eppendorfgefäßen in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur weiteren Verarbeitung bei -80°C gelagert.

Isolierung der RNA

Eine möglichst saubere Isolation intakter RNA ist für die PCR eine wesentliche Voraussetzung. Die Kontamination der Proben mit RNAsen und die damit verbundene Zerstörung der gewonnenen RNA muss unbedingt verhindert werden. Zur Isolation kam das m-RNA Isolationskit der Firma Roche zur Anwendung.

Das Prinzip der RNA-Isolation besteht in der Bindung von Biotin-poly-T an die poly-A-Schwänze der RNA. Darauf folgt eine Koppelung der Biotin-poly-T-RNA an magnetische Streptavidinpartikel, die Separation in einem magnetischen Feld und das Herauslösen der so gewonnenen RNA aus der festen Phase der Magnetpartikel durch Erniedrigung der Salzkonzentration mit Hilfe von destilliertem Wasser.

Ein Magnetständer wird mit einem Eppendorf-Gefäß für jede Probe vorbereitet und mit einem Volumen von 50µl der magnetischen Streptavidinpartikel gefüllt.

Aufgrund des magnetischen Feldes setzten sich die magnetischen Partikel am Rand fest und die Flüssigkeit kann abgenommen werden. Die Partikel werden einmal mit 70µl Lysispuffer gewaschen, indem sie aus der Magnetbank herausgenommen, gevortext, in diese wieder zurückgestellt und der Überstand abgenommen wird. Die Probe wird nun mit 0,6µl Volumen oligo(dt)₂₀ probe, biotin labeled, hybridisiert, die als Bindeglied zwischen RNA und Magnetpartikel fungiert. Das gesamte Volumen der Probe wird jetzt in die vorbereiteten Eppendorf-Röhrchen überführt, aus dem Magnetständer genommen und fünf Minuten bei 37°C inkubiert. Im Anschluss werden sie in die Magnetbank zurückgestellt und ruhen für 3 Minuten. Nun wird der Überstand abgenommen, während die RNA an den am Rand befindlichen Magnetpartikeln haftet. Anschließend wird das Eppendorf-Röhrchen dreimal, wie oben schon beschrieben, mit jeweils 200µl Waschpuffer gewaschen und erneut Überstand abgenommen. Zuletzt werden 60µl destilliertes Wasser hinzugefügt und zwei Minuten lang bei 72°C inkubiert. Durch Erniedrigung der Salzkonzentration und Erwärmung wird die RNA von den Magnetpartikeln und dem Biotin-poly-T separiert und kann abschließend als Überstand abgenommen werden.

cDNA-Synthese

Die gewonnene RNA wird nun mithilfe einer reversen Transkriptase in eine einzelsträngige cDNA (DNA ohne Introns) umgeschrieben.

Hierfür werden 8,2µl der isolierten RNA in ein Reaktionsgefäß gegeben. Da diese sich nach der Isolation leicht zu Haarschleifen zusammenlagert, muss vor der reversen Transkription zunächst ein so genanntes „Entstrippen“, also ein Glätten der Schleifen, erfolgen. Dazu werden die Proben für 5 Min bei 65°C in den Thermocycler zu geben.

Nun werden zu der Anzahl der Proben gleich viele „Mastermixe“ mit den folgenden Komponenten hergestellt: 2µl Reaktionspuffer, 4µl MgCl₂, 2µl Desoxynukleotide (Basen zur Herstellung der cDNA), 2µl Oligonucleotide (Primer für die reverse Transkriptase), 1µl RNase Inhibitor und 0,8µl AMV reverse Transkriptase.

Diese 11,8µl Mastermix werden nun zusammen mit den 8,2µl RNA-Probe für 1 Stunde bei 42°C inkubiert. Hierbei wird die cDNA generiert.

Real Time PCR

Am Light Cycler erfolgt die Messung der PCR. Dieses Gerät kann die Fluoreszenz der Proben messen und so den Ablauf der PCR darstellen. Dadurch ist es möglich, die PCR während der Amplifikation zu überwachen und Analysen im Bereich der logarithmischen-linearen Phase durchzuführen.

Der Light Cycler besteht aus einer Unter- und einer Obereinheit. In der Obereinheit befindet sich eine Heizspirale. Diese heizt Luft auf, die dann mithilfe eines Gebläses in die Probenkammer gelangt, die sich in der Untereinheit befindet. So wird eine effiziente Luftzirkulation und eine homogene Temperatur während der PCR-Zyklen erreicht. Durch einen hohen Oberflächen/Volumen-Koeffizienten ist eine sehr schnelle Anpassung der Temperatur möglich. Die Untereinheit besteht aus Thermokammer, Fluoreszenzdetektor, „drive units“, „electronic units“ und dem „Power Supply“.

Zeitgleich mit den Messungen wird durch Rotation der Proben sichergestellt, dass die Spitzen der Probenkapillaren genau vor dem Fluorimeter zum Stehen kommen. Dieser befindet sich ebenfalls in der Untereinheit des Light Cyclers.

Im Reaktionsmix für die PCR befindet sich neben 1µl Primer, 1-2µl MgCl₂ und 1µl Probe auch 1µl des Farbstoff SYBR Green I, der sich während der PCR an die entstehende doppelsträngigen DANN bindet. So kann nach jeder Elongationsphase durch Bestimmung der Fluoreszenz in der Probenkammer die Bildung des spezifischen Produktes verfolgt werden.

Nach einer zehnmütigen Denaturierung wird für alle Zielgene eine „touch down PCR“ durchgeführt (1. Zieltemperatur 68 °C, 2. Zieltemperatur 58 °C, Stufengröße 0,5 °C, Stufenverzögerung 1).

Für die relative Quantifizierung wird die Kalibrator-normalisierte relative Quantifizierung mit Effizienz-Korrektur benutzt. Für die quantitative Analyse wird „second derivative maximum method“ genutzt. Für jede Probe und für einen definierten Kalibrator wird die relative Menge von Zielgen und Referenzgen bestimmt. Die Berechnung der Daten basiert auf den Werten der Schnittpunkte (Crossingpoints, Cp), die durch den Light Cycler erhoben werden. Diese Schnittpunkte sind eine Funktion der Amplifikations-Effizienz der jeweiligen PCR. Die Ergebnisse werden ausgedrückt als Verhältnis Ziel/Referenz der Probe geteilt durch das Verhältnis Ziel/Referenz des Kalibrators und sind folglich

korrigiert für Probenungleichheiten und Abweichungen, die durch die Detektion entstehen.

Kleine Unterschiede in der Amplifikations-Effizienz zwischen den einzelnen Proben können zu großen Unterschieden in den Ergebnissen führen. Effizienzunterschiede haben einen bedeutenden Einfluss auf die Genauigkeit der Berechnung der initialen Menge. Die Effizienz-berichtete Quantifizierung basiert auf relativen Standardkurven, welche die PCR-Effizienz des Zielgens und des Referenzgens beschreiben. Diese relativen Standardkurven werden einmalig erhoben und in der „Relative Quantification Software“ gespeichert.

Die Amplifikations-Effizienz der PCR wird durch folgende Formel beschrieben:

$$N = N_0 \times 2^{\exp n}$$

N ist die Anzahl aller Kopien nach n Zyklen

N_0 ist die initiale Anzahl der Kopien

n ist die Anzahl der durchgeführten PCR-Zyklen

Die maximal erreichbare Effizienz ist 2- dabei wird jedes PCR-Produkt bei jedem Zyklus repliziert. Die minimale Effizienz ist somit 1- es findet keine Amplifikation statt. In der Realität ist die PCR-Effizienz meist kleiner als 2. Die Light Cycler-Software berechnet die Neigung (slope) für jede Standardkurve, wofür sie die relativen Abstände zwischen den einzelnen Kreuzpunktwerten benutzt. Folglich kann die Effizienz einer PCR nach folgender Formel berechnet werden:

$$E = 10^{\exp - 1/\text{slope}}$$

Bei schwachen Signalen ist die Standardkurve nicht mehr linear. Daher wird eine optimierte Kurvenpassform durch die Datenpunkte gelegt. Diese Kurve besteht aus zwei Abschnitten: einem linearen Abschnitt, der die oberen Konzentrationen mit starkem Signal beschreibt, und einem gebogenem Abschnitt für die untere Konzentrationen. Die Passform ist mathematisch durch den Passformkoeffizienten definiert. Relative Standardkurven werden aus den Verdünnungsreihen von Target und Referenz ermittelt. Unter Verwendung eines Kalibrators aus dem Standardlauf können die unbekanntenen Proben Benutzer-unabhängig relativ quantifiziert werden.

2.1.18. Quantitativer chromogener LAL-Endpunkt-Test („Endotoxin-Test“)

Mit diesem quantitativen Test wird die Endotoxinkonzentration in wässrigen Lösungen bestimmt. Eingesetzt werden dabei ein modifiziertes Limulus-Amöbozyten-Lysat und ein asynthetisches, chromogenes Substrat zur Endotoxinbestimmung.

Vor allem das Endotoxin gram-negativer Bakterien wird mit diesem Test nachgewiesen. Dies ist aus dem Grund notwendig, da beobachtete Effekte bei Zellstimulation auch immer durch Endotoxinverunreinigungen der Stimulantien hervorgerufen werden können. Um unterscheiden zu können, worauf die Beobachtung zurückzuführen ist, muss man möglichst exakt die Menge an Endotoxin in den verwendeten Proteinlösungen kennen. Dann ist es möglich, durch gleichzeitige Stimulation mit einer äquivalenten Menge an Endotoxin zu erfahren, worauf der beobachtete Effekt beruht.

Beim LAL-Endpunkt-Test wird die Probe mit dem LAL-Reagenz gemischt und 10 Min bei 37°C inkubiert. Dasselbe erfolgt dann nach Zugabe des chromogenen Substrates weitere 6 Min (auch bei 37°C). Schließlich wird die Reaktion mit einem Stop-Reagenz beendet. Eine entstandene gelbe Färbung ist ein Hinweis auf das Vorhandensein von Endotoxin. Die Absorption der Probe wird nun bei 405nm gemessen. Da sie direkt proportional zu der vorhandenen Endotoxinmenge ist, kann nun die Konzentration mittels einer Standardkurve berechnet werden.

Beim Ablauf des Tests muss streng darauf geachtet werden, dass endotoxinfreie Verbrauchsmaterialien Verwendung finden.

2.1.19. Statistische Analyse

Die Ergebnisse sind als Mittelwerte +/- standard error of the mean (SEM) dargestellt. Es wurde der Student t-Test für normalverteilte unverbundene oder der für verbundene Stichproben (paired t-test) durchgeführt. Die Berechnung dieses Testverfahrens wurde mit der Software Sigma Stat für Windows (Jandel Scientific, Erkrath) durchgeführt.

2.2. Material

2.2.1. Keratinozyten

Die verwendeten Keratinozyten wurden aus Hautproben nach der oben genannten Methode gewonnen. Diese Spenden wurden freundlicherweise vom Klinikum Nordstadt, Hannover zur Verfügung gestellt. Sie stammen ausnahmslos von gesunden Spendern und fielen nach Mamma-Reduktionsplastiken an.

2.2.2. HaCat-Zellen

Die Tumorzelllinie der HaCat-Zellen, die den Keratinozyten sehr ähnlich ist, wurde mit Genehmigung von Fusing (vgl. Publikationen) zur Verfügung gestellt. Zu Beginn war es die 58. Passage, in der sich die Zellen befanden.

2.2.3. Chemikalien/ Reagenzien

Chemikalien/ Reagenzien	Hersteller
Aqua dest.	Merck, Darmstadt
Candida albicans-Extrakt	Allergopharma, Reinbek
Dispase	Roche, Mannheim
DMEM	Biochrom, Berlin
EDTA	Biochrom, Berlin
Essigsäure	Zentralapotheke, Klinikum Hannover
Ethanol	Zentralapotheke, Klinikum Hannover
Fetales Kälberserum (FCS)	Gibcon BRL, Eggstein
Dexamethason	Sigma, Deisenhofen
Dimethylsulfoxid	Sigma, Deisenhofen
Gelantine	Sigma, Deisenhofen
Gentamycin	Seromed, Berlin
Hanks	Sigma, Deisenhofen
Heparin (Liquemin N 7500)	Hoffmann La Roche AG, Basel, Schweiz
Hepes	Sigma, Deisenhofen
Humanes AB-Serum	Abteilung Transfusionsmedizin, MHH
Iscove	Seromed, Berlin

KBM	Cellsystems, St. Katharinen
L-Glutamin	Seromed, Berlin
Lymphoprep (Ficoll-Hypaque)	Nycomed Pharma AS, Oslo, Norwegen
NaCl-Lösung 1,8%	Merck, Darmstadt
Natriumazide (NaN ₃)	Merck, Darmstadt
Natriumhydroxid	Merck, Darmstadt
Nichtessentielle Aminosäuren	Seromed, Berlin
PBS Dulbecco instamed 9,55g/l	Seromed, Berlin
Penicillin/Streptomycin	Seromed, Berlin
Salzsäure	Merck, Darmstadt
Tetanustoxoid	Behringwerke, Hannover/ Marburg
Trypanblau	Seromed, Berlin
Trypsin	Sigma, Deisenhofen
Türk'sche Lösung	Merck, Darmstadt

Tabelle 2: Verwendete Chemikalien und Reagenzien

2.2.4. Zellkulturmedien

Zellkulturmedien	Zusammensetzung
IAB-Vollmedium (für Blutzellen)	Iscove mit: 4% hitzeinaktiviertes humanes AB-Serum 1% L-Glutamin 100µg/ml Penicillin/Streptomycin 50µg/ml Gentamycin 1% nichtessentielle Aminosäuren 0,2µm Sterilfiltration
„Serumfreies“-Medium (Medium, zur Auslösung der Apoptose bei Zellen)	Iscove mit: 1% L-Glutamin 100µg/ml Penicillin/Streptomycin 50µg/ml Gentamycin 1% nichtessentielle Aminosäuren 0,2µm Sterilfiltration
DMEM (Kulturmedium für HaCat)	DMEM mit: 10% FCS 1% Penicillin/Streptomycin 0,5% Gentamycin
„Einfriermedium“ für HaCat-Zellen	80% FCS 10% DMEM 10% Dimethylsulfoxid (DMSO)

Hanks/Hepes Genta (Kulturmedium bei der Gewinnung von Keratinozyten)	Hanks mit: 0,5% Gentamycin 2% Hepes
KGM (Kulturmedium für Keratinozyten)	KBM mit: mitgelieferte Supplemente dazupipettieren
Blockpuffer	Instamed 9,55g/l PBS-Pulver w/o Ca ²⁺ , Mg ²⁺ wird in 1l Aqua dest. gelöst In 100ml PBS werden gelöst: 1ml 2M Natriumazide (130mg) 0,2g Gelantine 20ml hitzeaggregiertes humanes IgG Lagerung bei 4 °C
Coating buffer (ELISA)	1,0 L H2O mit: 0,1M Carbonat Puffer 8,4g NaHCO ₃ 3,5g Na ₂ CO ₃
Waschpuffer (ELISA)	PBS mit 0,05% TWEEN 20

Tabelle 3: Verwendete Zellkulturmedien

2.2.5. Zytokine/ Stimuli

Zytokine/ Stimuli	Hersteller
IFN γ	Tebu, Peprotech
Lipopolysaccharid (LPS; salmonella)	Sigma, Deisenhofen
Rekombinantes humanes IL-4	RD Systems, Wiesbaden-Nordenstadt
Rekombinantes humanes IL-12	RD Systems, Wiesbaden-Nordenstadt
Rekombinantes humanes IL-18	RD Systems, Wiesbaden-Nordenstadt
Rekombinantes humanes HSP27	Stressgen, Victoria, Kanada
Rekombinantes humanes HSP60	Stressgen, Victoria, Kanada
Rekombinantes humanes HSP70	Stressgen, Victoria, Kanada
TNF- α	RD Systems, Wiesbaden-Nordenstadt

Tabelle 4: Verwendete Zytokine und Stimuli

2.2.6. Antikörper

Antikörper	Hersteller
Anti-IL-12	BD Biosciences, Heidelberg
mouse-anti human CD40-PE (mAb)	Coulter-Immunotech, Krefeld
mouse-anti human CD54-FITC (mAb)	Coulter-Immunotech, Krefeld
mouse-anti human CD80-FITC (mAb)	Coulter-Immunotech, Krefeld
Goat anti-Mouse IgG-FITC	Sigma, Deisenhofen
mouse-anti human HLA-DR-FITC	BD Biosciences, Heidelberg
mouse-anti human HLA-DR-PE	BD Biosciences, Heidelberg
mouse-anti human HSP27	Biomol, Hamburg
mouse-anti human HSP70 (SPA810)	Biomol, Hamburg
Isotypkontrolle: Maus IgG1-FITC	Sigma, Deisenhofen
Isotypkontrolle: Maus IgG1-PE	Sigma, Deisenhofen
Isotypkontrolle: Maus IgG1	Sigma, Deisenhofen

Tabelle 5: Verwendete Antikörper

2.2.7. Primer

Primer	Hersteller
B-actin	Operon, USA
Gata-3	Operon, USA
HSP27	Biomol, Hamburg

Tabelle 6: Verwendete Primer

2.3. Geräte und sonstige Hilfsmittel

2.3.1. Geräte

Geräte und sonstige Hilfsmittel	Hersteller
Autoklav, Tecnoklav 50	Tecnomara, Fernwald
Brutschrank	Heraeus, Hanau (Hamburg)
ELISA-Lesegerät, Easy Reader EAR 400 AT	SLT/ECAN Labinstruments, Crailsheim
FACScan (zusammen mit Cellquest, Compu-	Becton-Dickinson, Heidelberg

terprogramm zur Auswertung der FACS Messung)	
Gefrierschrank (-20 °C)	Liebherr, Deutschland
Gefrierschrank (-80 °C)	GFL, Burgwedel
Kühlschrank (4 °C)	Liebherr, Deutschland
Light Cycler (zusammen mit LightCycler System für Real-time-PCR, Computerprogramm zur Auswertung der Messung am LightCycler)	Roche, Mannheim
Mikroskop	Zeiss, Jena
Minifuge	Heraeus Gmbh, Hanau
Objektträger-Clips	Shandon, Frankfurt
PTC-200 Peltier Thermal Cycler	Biozym, Hessisch Oldendorf
UV-Bestrahlungsgerät	Waldmann UV 3003K
Wasserbad	GFL, Burgwedel
Zentrifuge	Hettrich Rotanta/RP, Tuttlingen

Tabelle 7: Verwendete Geräte

Allgemeine Labor- und Verbrauchsmaterialien wie Reaktionsgefäße, Pipettenspitzen und Plastikwaren für die Zellkultur wurden von den Firmen Eppendorf (Hamburg), Nunc (Wiesbaden), Roth (Karlsruhe), Greiner (Solingen), Becton-Dickinson(Heidelberg) und Sarstedt (Nürnberg) bezogen.

2.3.2. Kits

Verwendete Kits	Hersteller
Annexin V-FITC ("Apoptose-Nekrose-Kit")	BD Biosciences, Heidelberg
Cytofix/Cytoperm Plus Kit with Golgi-Plug	BD Biosciences, Heidelberg
cDNA Synthesis Kit	Roche Molecular Biochemicals, Mannheim
Cytostain Kit	BD Biosciences, Heidelberg
Human IL-12 p70 ELISA	Biocarta, Hamburg
Light Cycler master SYBR Green I	Roche Molecular Biochemicals, Mannheim
m-RNA Isolationskit	Roche Molecular Biochemicals, Mannheim
Quantitativer chromogener LAL-Endpunkt-Test	Cellsystems, St. Katharinen
NE-PER Nuclear and Cytoplasmatic Extraction Reagents Kit	Pierce, Rockford, USA

Tabelle 8: Verwendete Kits

3. Ergebnisse

3.1. Einleitung

Wie in Kapitel 1 bereits beschrieben, können Hitzeschockproteine (HSP) die Immunantwort beeinflussen. Hierbei können sowohl extrazellulär vorkommende HSP auf unterschiedliche Zellsubpopulationen wirken, als auch die intrazelluläre Expression von HSP als Antwort auf Entzündungsabläufe beeinflusst werden. In den durchgeführten Experimenten wurde das Augenmerk vornehmlich auf das HSP27 gerichtet. Aber auch Einflüsse anderer HSP, wie HSP60 und HSP70, wurden untersucht.

Folgende Versuche wurden durchgeführt:

- 1) Veränderung der IL-12-Produktion in Monozyten durch verschiedene HSP
- 2) Veränderung von kostimulatorischen Oberflächenrezeptoren und MHC Molekülen auf Monozyten und Keratinozyten durch HSP
- 3) Einfluss von exogenem HSP27 auf die antigenspezifische Proliferation von PBMC
- 4) Veränderung der intrazellulären HSP27 Expression in Monozyten und Keratinozyten unter verschiedenen Stimulationsbedingungen
- 5) Einflüsse auf Apoptose und Überleben von Monozyten, HaCat-Zellen und primär humanen Keratinozyten durch HSP.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde deutlich, dass die verwendeten rhHSP-Präparationen (entgegen der Herstellerangaben) zum Teil mit Endotoxin kontaminiert waren. Im durchgeführten Endotoxintest (siehe Kapitel 2.1.18) wurden für die HSP folgende Endkonzentrationen bei Einsatz in der Zellkultur ermittelt: HSP60: 4,75ng/ml, HSP70: 22,00ng/ml und HSP27: 3,00ng/ml. Um einen möglichen Einfluss auf die Ergebnisse zu verhindern, wurde bei der Stimulation mit HSP Polymyxin B (0,5mg/ml) hinzu gegeben, welches das Endotoxin binden und neutralisieren soll. Zudem wurde bei den Untersuchungen mit HSP27 zusätzlich eine Lipopolysaccharid (LPS)-Stimulation von 3,00ng/ml (entspricht dem Endotoxingehalt in der verwendeten HSP27-Probe) durchgeführt.

3.2. Beeinflussung der IL-12-Produktion in Monozyten durch HSP

Wie bereits in Kapitel 1 erwähnt, wird IL-12 vor allem von APC produziert. Auf Grund seiner zentralen Rolle in der Generierung der Th1-gerichteten Immunantwort wurde nach einem Einfluss auf seine Produktion durch HSP gesucht. Vorbefunde lagen dabei schon für HSP70 vor (Wang et al., 2002; Millar et al., 2003; Wan et al., 2004). Zur Induktion der Produktion erfolgte ein Priming der Monozyten mit IFN γ (wobei IFN γ alleine keine deutliche IL-12 Expression in humanen Monozyten hervorruft) und anschließend eine Stimulation mit den Hitzeschockproteinen HSP60 und HSP70, sowie mit LPS. Eine signifikant erhöhte Produktion war bei Zugabe von LPS und bei der Zugabe von HSP70 zu beobachten.

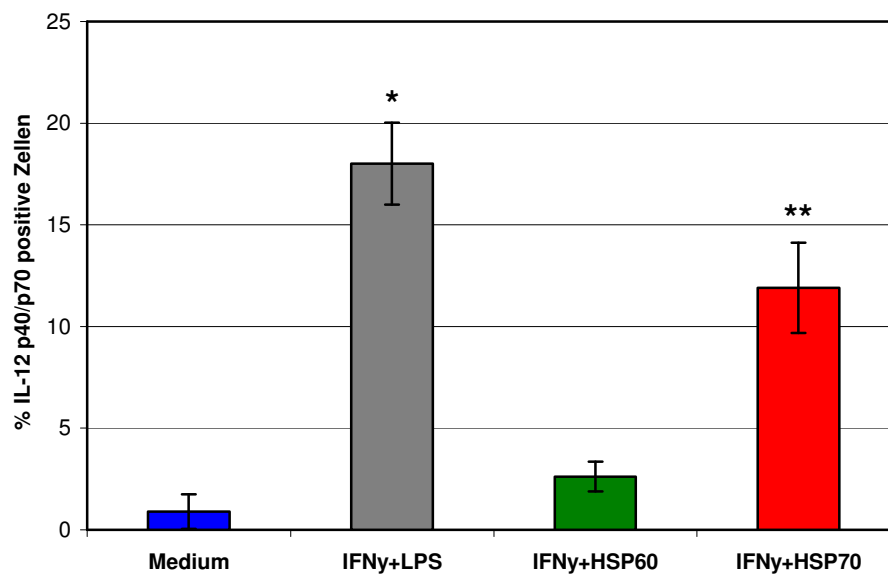


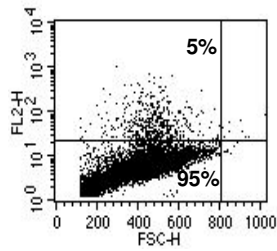
Abbildung 1: IL-12 Induktion in Monozyten.

Die Zellen wurden an Tag 1 aus Spenderblut isoliert. Nach 2 Tagen erfolgte die Stimulation und am 3. Tag die intrazelluläre Messung von IL-12. Die Quadranten wurden anhand der Isotypenkontrolle „gesetzt“. Als positiv angefärbt wurden die Zellen im oberen linken Quadranten angesehen (siehe Abb. 4). Konzentrationen: IFN γ : 20ng/ml, HSP60: 5 μ g/ml, HSP70: 5 μ g/ml, LPS: 50ng/ml. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM. n=11.

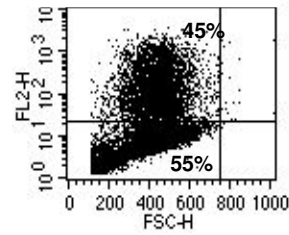
* p<0,001 im Vergleich zum Medium im paired t-test.

** p=0,012 im Vergleich zum Medium im paired t-test.

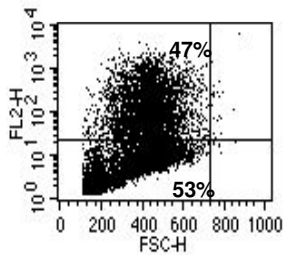
Zur besseren Übersicht wurde ein Säulendiagramm zur Darstellung gewählt



Medium wenig intrazelluläres IL-12



IFN γ +LPS: starke Induktion von intrazellulärem IL-12



IFN γ +HSP 70: ebenfalls starke Induktion von intrazellulärem IL-12

Abbildung 2: Exemplarische Darstellung der IL-12-Expression

Eine intrazelluläre Färbung für IL-12 wurde wie in Abbildung 1 beschrieben durchgeführt. Die Quadranten wurden anhand des Isotypen gesetzt. Die Prozentzahlen beziehen sich auf den Anteil positiver Zellen im entsprechenden Quadranten.

Es ist bekannt, dass eine Vorinkubation von Monozyten mit LPS zur Nicht-Induzierbarkeit/Hemmung der IL-12 Produktion bei der nachfolgenden Stimulation führen kann (Wittmann et al., 1999). Dieses Phänomen wird auch als Endotoxintoleranz bezeichnet. Zur Überprüfung einer solchen möglichen Hemmung der IL-12 Produktion durch HSP wurden Monozyten mit HSP60, HSP70 bzw. mit LPS stimuliert. Einen Tag später erfolgte eine zweite Stimulation mit IFN γ und LPS. Eine signifikante Hemmung war in dieser Versuchsreihe allerdings nur bei der Vorinkubation mit LPS zu beobachten. Eine sichtbare, aber statistisch nicht signifikante Hemmung war bei der Vorinkubation mit HSP70 zu erkennen.

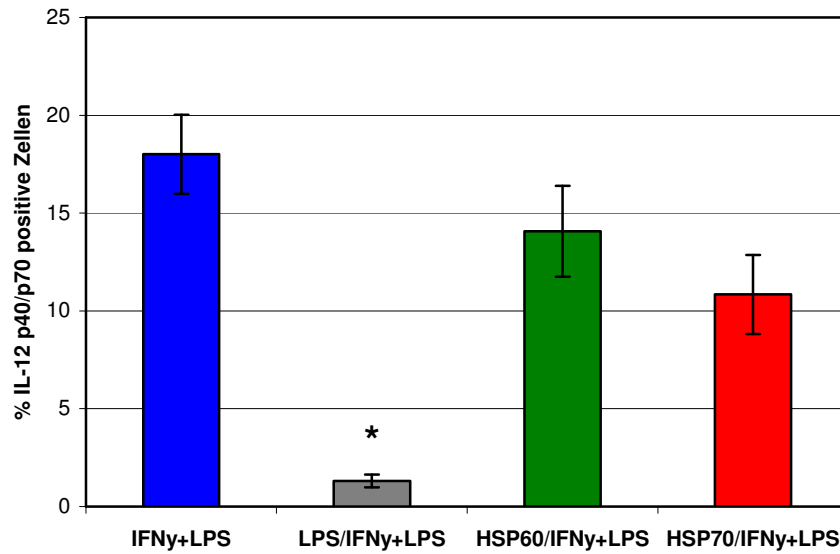
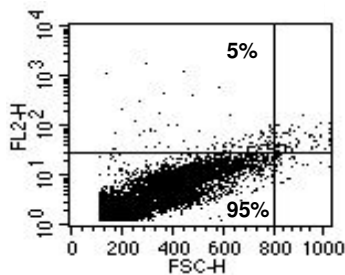


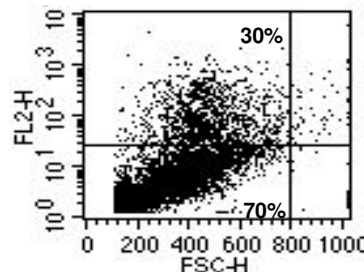
Abbildung 3: IL-12 Hemmung in Monozyten.

Die Monozyten wurden an Tag 1 aus Spenderblut isoliert. Es erfolgte die erste Stimulation mit LPS (50ng/ml) oder mit HSP60/70 (5 μ g/ml). An Tag 2 erfolgte die zweite Stimulation mit IFN γ (20ng/ml) und LPS (50ng/ml). Am dritten Tag wurde eine intrazelluläre IL-12 Färbung durchgeführt und durchflusszytometrisch gemessen. Als positiv wurden Ereignisse im „Upper Left“-Viertel der Quadrantendarstellung angesehen (siehe Abb 4). Dargestellt sind die Mittelwerte +/- SEM. n=8.

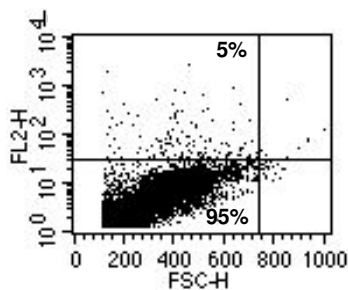
* p=0,010 im Vergleich zu IFN γ +LPS im t-test.



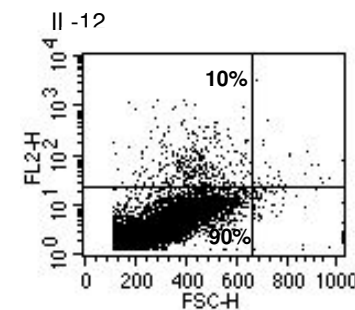
Medium: kaum Anstieg von IL-12



IFN γ +LPS: starker Anstieg von intrazellulärem



LPS; 24 Std. später: IFN γ +LPS: Hemmung des intrazellulären IL-12 Anstiegs



HSP70; 24 Std. später: IFN γ +LPS: Hemmung des intrazellulären IL-12 Anstiegs

Abbildung 4: Hemmung der IL-12 Expression in Monozyten.

Durchflusszytometrische Darstellung eines Beispielversuchs (vgl. Abb 3).

In einem Beispielversuch wurde der Einfluss von HSP27 auf die IL-12 Produktion in Monozyten untersucht. Die Versuchsbedingungen waren identisch mit denen bei den Versuchen mit HSP60 und HSP70. Es zeigte sich ebenfalls eine Stimulation der IL-12-Produktion durch HSP27. Eine starke Hemmung war nicht zu beobachten. Weitere Versuche sind notwendig, um eine Konstanz dieses Effektes zeigen zu können.

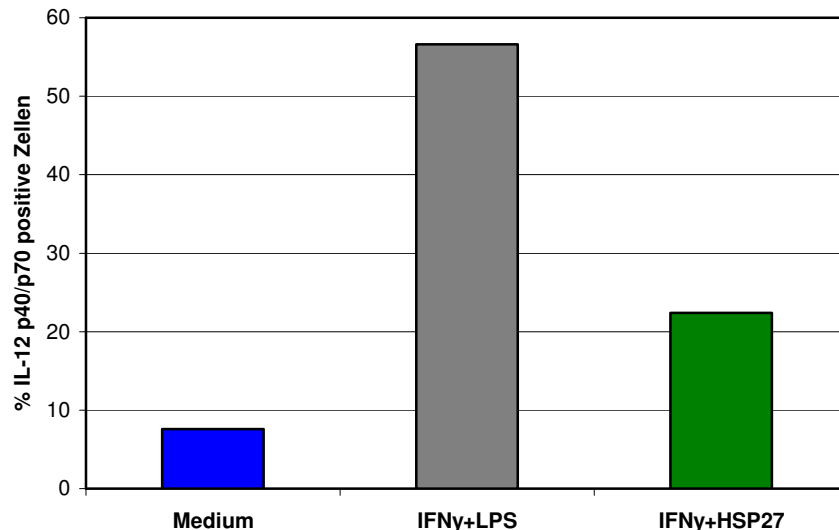


Abbildung 5: IL-12 Induktion durch HSP27 in Monozyten.

Die Zellen wurden an Tag 1 aus Spenderblut isoliert. Nach 2 Tagen erfolgte die Stimulation und am 3. Tag die intrazelluläre Messung von IL-12. Die Quadranten wurden anhand der Isotypenkontrolle „gesetzt“. Als positiv angefärbt wurden die Zellen im oberen linken Quadranten angesehen (siehe Abb. 4). Konzentrationen: IFN γ : 20ng/ml, HSP27: 5 μ g/ml, LPS: 50ng/ml. n=1.

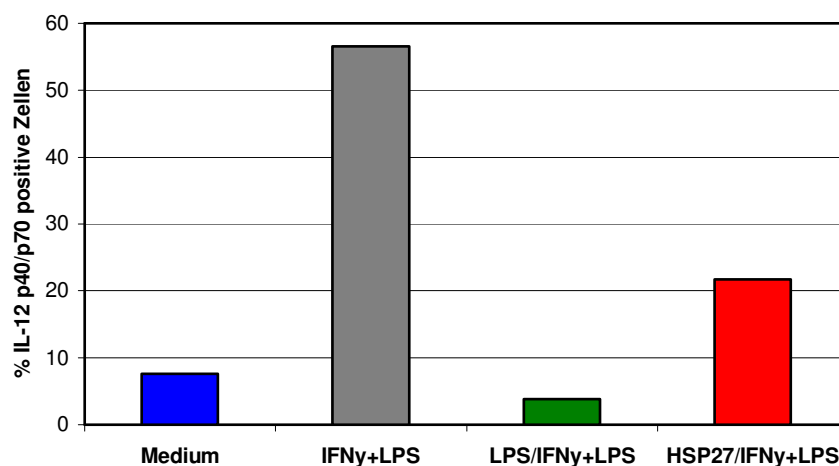


Abbildung 6: IL-12 Hemmung durch HSP27 in Monozyten.

Die Monozyten wurden an Tag 1 aus Spenderblut isoliert. Es erfolgte die Stimulation mit LPS oder HSP27. An Tag 2 erfolgte die zweite Stimulation mit IFN γ und LPS. Konzentrationen: siehe Abbildung 5. Am dritten Tag wurde eine intrazelluläre IL-12 Färbung durchgeführt und durchflusszytometrisch gemessen. Als positiv wurden Ereignisse im „Upper Left“-Viertel der Quadrantendarstellung angesehen (siehe Abb 4). n=1.

3.3. Beeinflussung der IL-12-Produktion in Keratinozyten durch HSP

Primäre humane Keratinozyten zeigten unter verschiedensten Stimulationsbedingungen (IFN γ +LPS, IFN γ +TNF- α , Typ I Interferone, TNF- α oder LPS, IL-18 alleine oder in Kombination mit IFN γ keinerlei messbare IL-12 Expression (intrazelluläre Färbung) oder Produktion (ELISA-Messung). HSP70, HSP60 oder HSP27 alleine oder in Kombination mit Interferonen zeigten ebenfalls keine Induktion (Ergebnisse hier nicht dargestellt).

3.4. Einfluss von HSP auf die Oberflächenexpression bei Monozyten

Verschiedene HSP können immunologisch wichtige Oberflächenmoleküle von Abwehrzellen beeinflussen (siehe Kapitel 1). In den durchgeführten Versuchen wurde das Hauptaugenmerk auf CD40 und CD54 (ICAM-1), sowie auf das MHC-Klasse-II-Molekül gelegt.

In den Versuchen wurden Monozyten mit HSP27 und HSP70, sowie mit LPS stimuliert und MHC-Klasse-II angefärbt. Die durchfluss-zytometrischen Messungen ergaben für keine dieser Stimulation einen signifikanten Unterschied zu unstimulierten Zellen. Außerdem wurde lediglich für die LPS-Stimulation ein etwas deutlicherer Anstieg der MHC-II-Expression beobachtet. Dazu kam, dass die Stimulation mit „gekochtem“ HSP27 keine signifikant geringere Expression von MHC-II-Molekülen zur Folge hatte. Durch eine vor der Stimulation durchgeführte 20 minütige Erhitzung dieser HSP-Probe auf ca.95°C wurde eine Denaturierung der Proteine erreicht, so dass der beobachtete Effekt mit dieser „gekochten“ Probe nur auf die LPS-Kontamination zurückzuführen ist. Einen Einfluss der HSP27 und 70 auf die MHC-II-Expression von Monozyten ließ sich also nicht nachweisen.

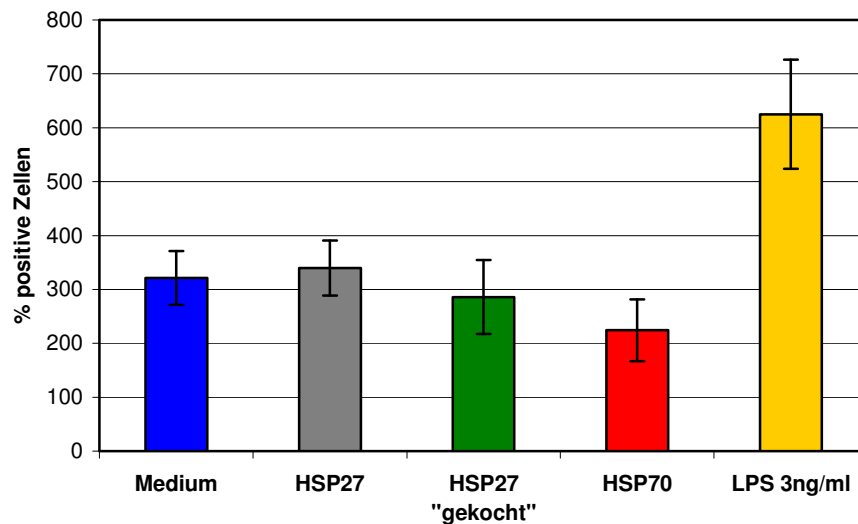


Abbildung 7: Oberflächenexpression von MHC-Klasse-II auf Monozyten.

Die Zellen wurden an Tag 1 aus Spenderblut isoliert und stimuliert. Konzentrationen: HSP27: 5µg/ml, HSP70: 5µg/ml, LPS: 3ng/ml. An Tag 2 wurden die Färbung und die durchflusszytometrische Messung durchgeführt. Als positiv wurden alle Zellen angesehen, die im „Upper Right“-Viertel der Quadrantendarstellung angezeigt wurden. Dargestellt sind die Mittelwerte +/- SEM. n=10.

Auch bei der Expression von CD54 (ICAM-1) und von CD40 (Rezeptor für kostimulierende Signale) ließ sich kein signifikanter Effekt durch Stimulation mit HSP beobachten.

Bei der CD54-Expression war ein relativ hoher Anstieg bei Stimulation mit HSP70 und ein sichtbarer aber nicht signifikanter Unterschied zwischen „gekochtem“ und „nicht gekochtem“ HSP27 zu sehen. Es war wieder ein deutlicher LPS-Effekt nachweisbar.

Im Endeffekt wurde weder eine pro- noch eine anti-inflammatorische Wirkung der Hitzeschockproteine bei der Oberflächenexpression auf Monozyten beobachtet.

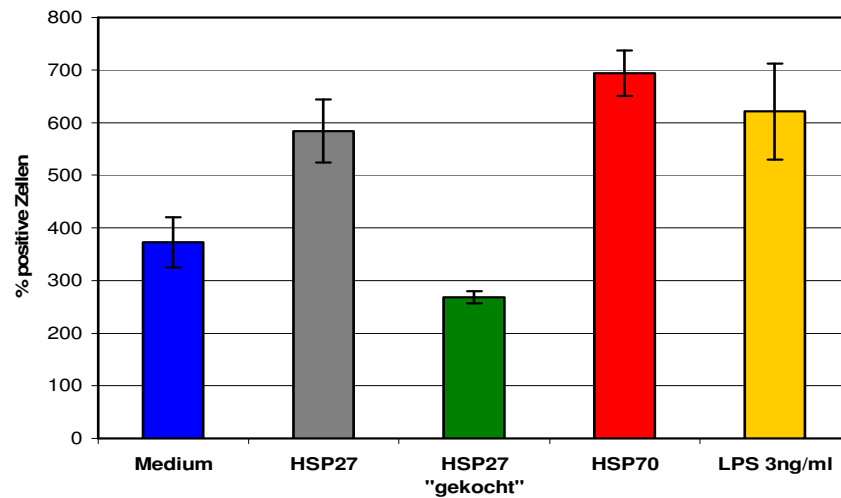


Abbildung 8: Oberflächenexpression von CD54 auf Monozyten.

Die Zellen wurden an Tag 1 aus Spenderblut isoliert und stimuliert. Konzentrationen: HSP27: 5µg/ml, HSP70: 5µg/ml, LPS: 3ng/ml. An Tag 2 wurden die Färbung und die durchflusszytometrische Messung durchgeführt. Als positiv wurden alle Zellen angesehen, die im „Upper Right“-Viertel der Quadrantendarstellung angezeigt wurden. Dargestellt sind die Mittelwerte +/- SEM. n=4.

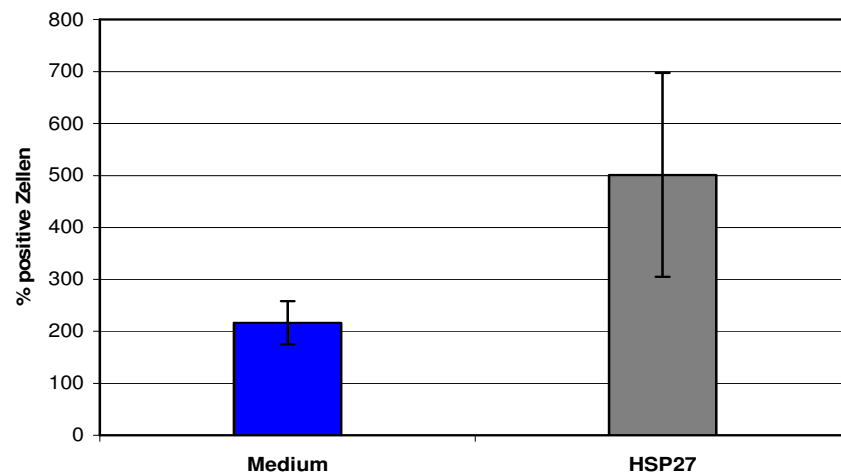


Abbildung 9: Oberflächenexpression von CD40 auf Monozyten.

Die Zellen wurden an Tag 1 aus Spenderblut isoliert und stimuliert. Konzentration: HSP27: 5µg/ml. An Tag 2 wurden die Färbung und die durchflusszytometrische Messung durchgeführt. Als positiv wurden alle Zellen angesehen, die im „Upper Right“-Viertel der Quadrantendarstellung angezeigt wurden. Dargestellt sind die Mittelwerte +/- SEM. n=4.

3.5. Einfluss von HSP27 auf die Oberflächenexpression von HaCat-Zellen

In einigen Beispierversuchen wurden die MHC-II- und CD54-Expression auf HaCat-Zellen untersucht.

Dabei fiel der deutliche Anstieg bei IFN γ Stimulation und die mögliche Hemmung dieser MHC-II-Expressionssteigerung durch HSP27 auf. Allerdings war wieder ein LPS-Effekt im Hinblick auf die Hemmung der Expressionsteigerung vorhanden.

3.6. Untersuchung des Einflusses von HSP27 auf die Antigenwirkung

Bei diesen Versuchen ist eine CFSE-Färbung durchgeführt worden, um die Proliferation von PBMCs (periphere mononukleäre Zellen) zu beobachten.

In den acht unabhängigen Versuchen mit zwei unterschiedlichen Antigenen (Candida albicans-Extrakt und Tetanustoxoid) wurde eine signifikant erhöhte Proliferation der Zellen beobachtet, die zusätzlich zu dem Antigen mit HSP27 stimuliert wurden. Der Einfluss von LPS, das sich in der verwendeten HSP27-Charge befand, wurde durch Zugabe von Polymyxin B weitestgehend ausgeschlossen.

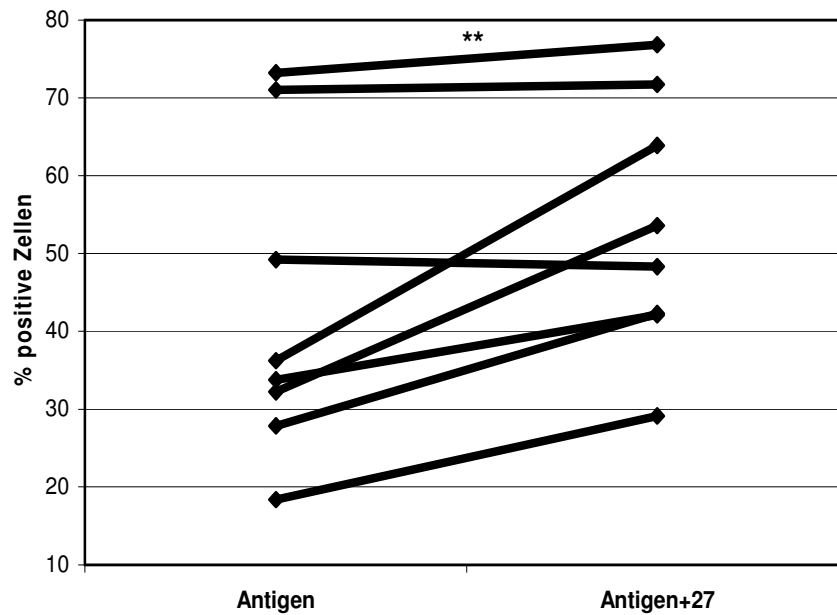
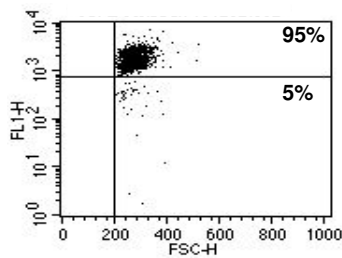


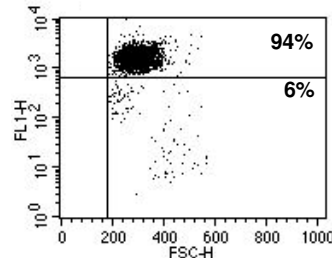
Abbildung 10: CFSE Färbung bei PBMC.

Die Zellen wurden aus Vollblut isoliert, mit dem Celltracer CFSE gelabelt und stimuliert. Stimulantien: Antigene: Tetanustoxoid (Konzentration: 10µg/ml) und Candida albicans (Konzentration 5µg/ml), HSP27 (Konzentration: 5µg/ml). Nach einer Woche Inkubation wurde eine durchflusszytometrische Messung durchgeführt. Als proliferiert wurden Zellen angesehen, die in der Quadrantendarstellung im „Lower Right“-Viertel zur Darstellung kamen.

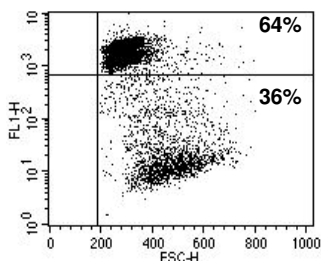
** Antigen+27 mit $p=0,021$ im Vergleich zur alleinigen Antigenstimulation im paired t-test.
 n(Tetanustox.)=4; n(Candida alb.)=4



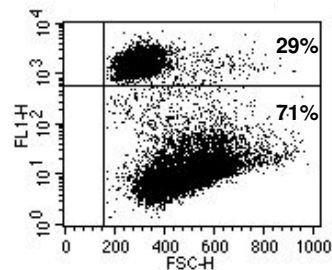
Medium: kaum proliferierte Zellen im „Lower Right“-Quadranten



HSP 27: ebenfalls kaum proliferierte Zellen im „Lower Right“-Quadranten



Tetanustoxoid: hohe Anzahl an proliferierten Zellen



Tetanustoxoid+HSP 27: stärkste Proliferation

Abbildung 11: Vermehrte Proliferation von PBMCs unter HSP Stimulation. Durchflusszytometrische Darstellung eines Beispielversuchs.

3.7. Einfluss auf die intrazelluläre HSP27-Konzentration

Wenn HSP27, wie gezeigt, Einfluss nimmt auf verschiedene zelluläre Prozesse, ist es auch von Interesse, ob umgekehrt verschiedene Proteine (oder sogar HSP27 selbst) die intrazelluläre Konzentration dieses Hitzeschockproteins verändern.

Versuche dazu wurden zunächst mit Monozyten durchgeführt. Auffallend war der starke intrazelluläre HSP27-Konzentrationsanstieg bei Stimulation eben mit diesem Hitzeschockprotein. Dieser Effekt zeigte eine Dosisabhängigkeit.

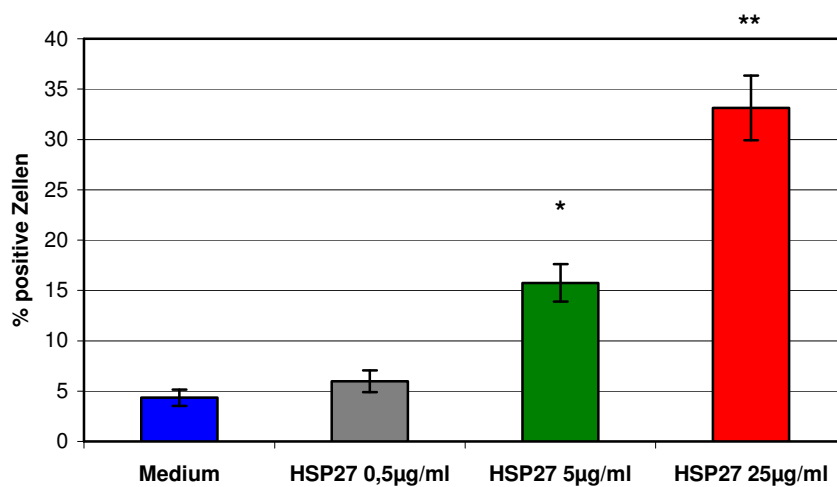


Abbildung 12: Intrazelluläre HSP27-Färbung bei Monozyten 1.

Die Zellen wurden an Tag 1 aus Spenderblut isoliert und stimuliert. An Tag 2 wurden die Färbung und die durchflusszytometrische Messung durchgeführt. Als positiv wurden alle Zellen angesehen, die im „Upper Right“-Viertel der Quadrantendarstellung angezeigt wurden. Dargestellt sind die Mittelwerte +/- SEM.

* $p=0,011$ im Vergleich zum Medium im t-test.

** $p<0,001$ im Vergleich zum Medium im t-test. $n=4$.

Einen vergleichbaren Effekt gab es bei der Stimulation mit LPS oder HSP70 nicht zu beobachten.

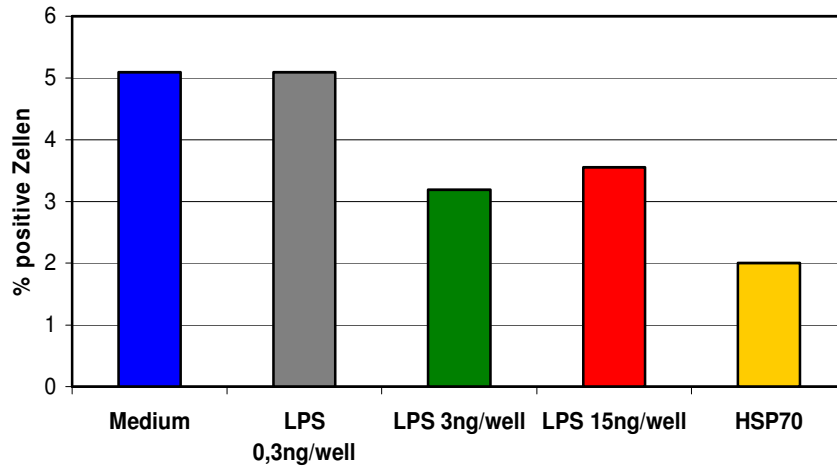


Abbildung 13: Intrazelluläre HSP27-Färbung bei Monozyten 2.

Die Zellen wurden an Tag 1 aus Spenderblut isoliert und stimuliert. HSP70-Konzentration: 5µg/ml. An Tag 2 wurden die Färbung und die durchflusszytometrische Messung durchgeführt. Als positiv wurden alle Zellen angesehen, die im „Upper Right“-Viertel der Quadrantendarstellung angezeigt wurden. Dargestellt sind die Mittelwerte +/- SEM. n=4.

Auch bei Kostimulation von IFN γ mit HSP27 zeigte sich ein signifikanter Anstieg der intrazellulären Konzentration. Wieder stellt sich die Frage, wie dieser Effekt zu deuten ist. Dazu gab es auch eine Konzentrationsvermehrung bei den Stimulationen IFN γ zusammen mit HSP70 oder zusammen mit LPS. Dies war jedoch in beiden Fällen statistisch nicht signifikant.

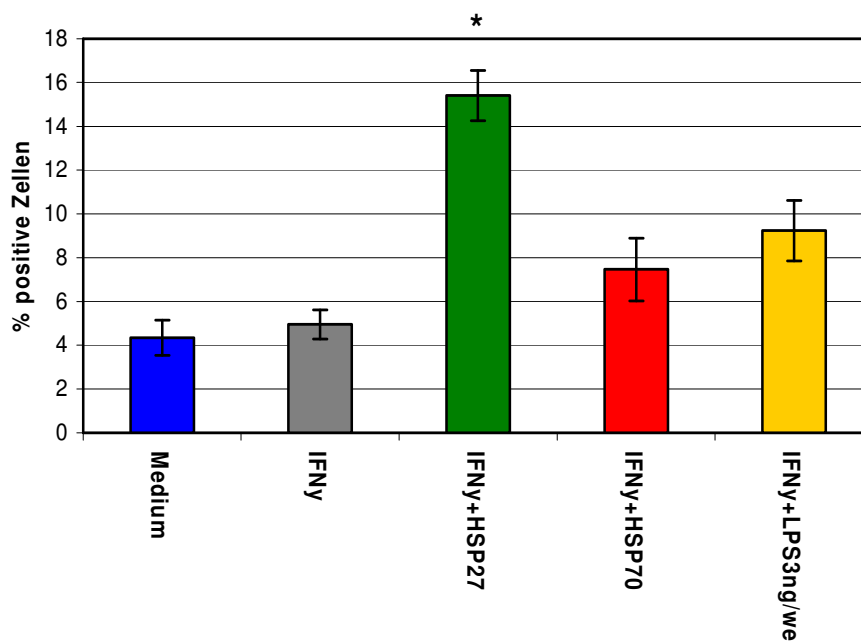


Abbildung 14: Intrazelluläre HSP27-Färbung bei Monozyten 3.

Die Zellen wurden an Tag 1 aus Spenderblut isoliert und stimuliert. Konzentration: HSP70: 5µg/ml, IFN γ : 20ng/ml, HSP27: 5µg/ml. An Tag 2 wurden die Färbung und die durchflusszytometrische Messung durchgeführt. Als positiv wurden alle Zellen angesehen, die im „Upper Right“-Viertel der Quadrantendarstellung am FACScanner angezeigt wurden. Dargestellt sind die Mittelwerte +/- SEM.

*p=0,002 im Vergleich zum Medium im t-test, sowie p=0,002 im Vergleich zu IFN γ im t-test. n=4

Um zu klären, ob HSP27 von den Monozyten aufgenommen wird, oder ob es seine eigene Expression stimuliert, wurden PCR-Messungen durchgeführt, die keine erhöhte HSP27 Expression ergaben. Dies spricht eher für eine Aufnahme von HSP27. Es wurden im Rahmen dieser Arbeit keine weiteren Versuche zur Identifizierung des Rezeptors durchgeführt.

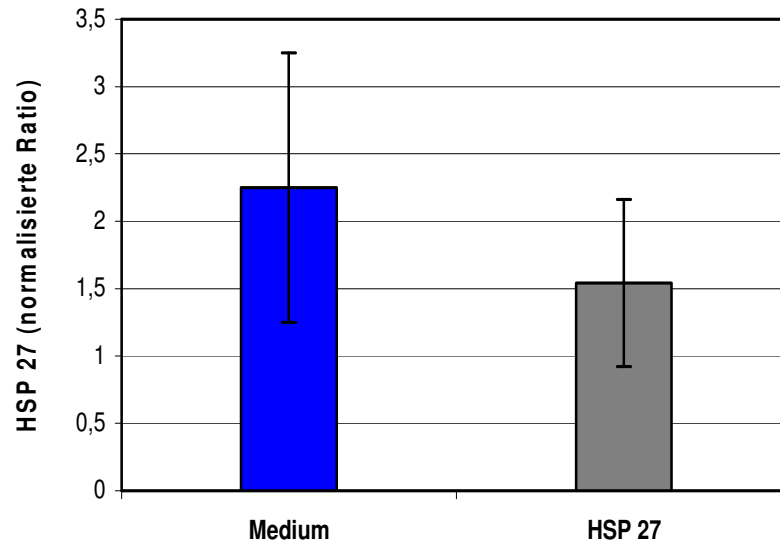
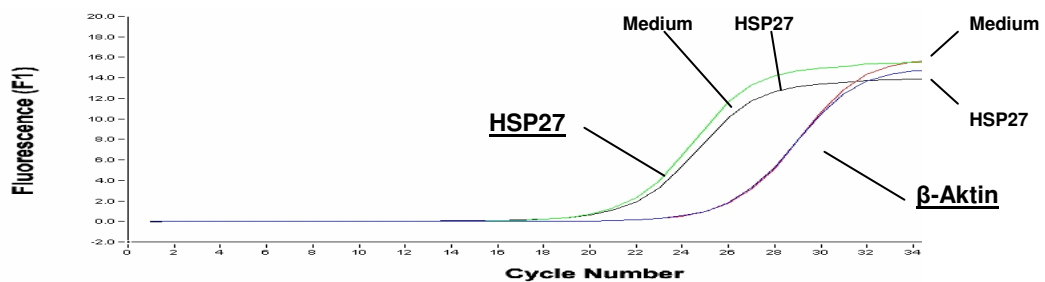
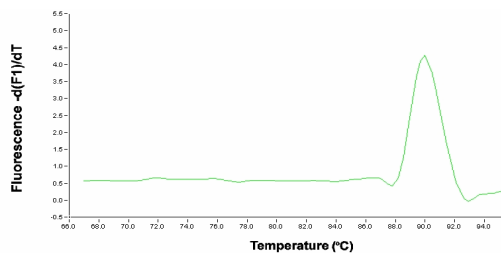


Abbildung 15: Quantitative Real-Time PCR der HSP27 Expression bei Monozyten.

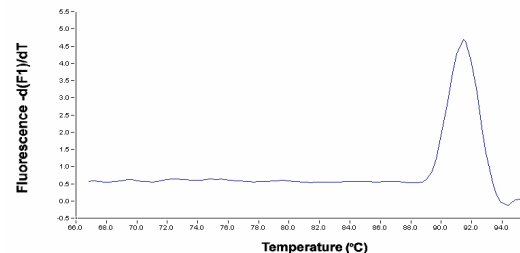
Die Zellen wurden an Tag 1 aus Spenderblut isoliert und stimuliert. Konzentration: HSP27 5µg/ml. An Tag 2 wurde die Real-Time PCR durchgeführt. Dargestellt sind die Mittelwerte +/- SEM. n=5.



Amplifikation in Monozyten: links: HSP27-Amplifikation, rechts: β -Aktin-Amplifikation



Schmelzkurve für β -Aktin



Schmelzkurve für HSP27

Abbildung 16: Quantitative Real-Time PCR von HSP27 an Monozyten.

Darstellung einer Beispielmessung.

Weitere Versuche wurden an Keratinozyten durchgeführt.

Bei TNF- α Stimulation zeigte sich tatsächlich ein signifikanter intrazellulärer HSP27-Konzentrationsabfall. Auch bei Kostimulation mit IL-4 war dieser Effekt zu beobachten.

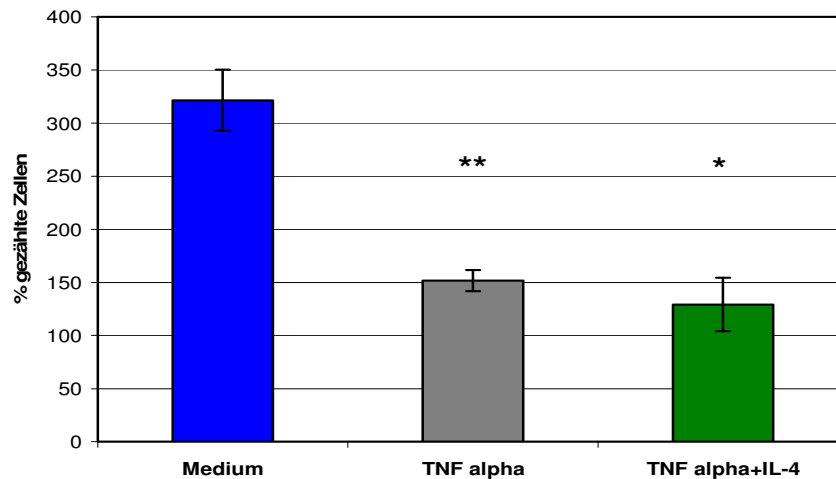


Abbildung 17: Intrazelluläre HSP27-Färbung bei Keratinozyten 1.

Subkonfluente primär humane Keratinozyten in Passage 2-4 wurden stimuliert. Konzentration TNF- α : 200U/ml, IL-4 20ng/ml. An Tag 2 wurden die Färbung und die durchflusszytometrische Messung durchgeführt. Als positiv wurden alle Zellen angesehen, die im „Upper Right“-Viertel der Quadrantendarstellung angezeigt wurden. Dargestellt sind die Mittelwerte +/- SEM.

** p=0,028 im Vergleich zum Medium im t-test.

* p=0,045 im Vergleich zum Medium im t-test. n=5.

Zusätzlich dazu wurden Keratinozyten mit IL-4 und IFN γ stimuliert. Auffallend war die Tendenz einer Hemmung der intrazellulären HSP27 Expression durch IL-4. Die geringe Versuchsanzahl (n=6) bei hohen interexperimentellen Schwankungen „verhinderten“ jedoch eine statistische Signifikanz. IFN γ zeigte keinen Effekt auf die HSP27 Konzentration in den Zellen.

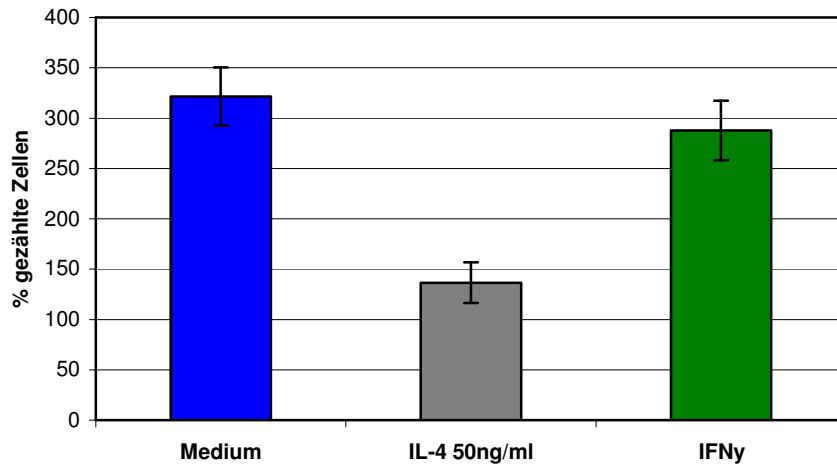


Abbildung 18: HSP27-Expression in humanen Keratinozyten 2.

Subkonfluente Zellen wurden an Tag 1 stimuliert. Konzentration IFN γ : 20ng/ml. An Tag 2 wurden die Färbung und die durchflusszytometrische Messung durchgeführt. Als positiv wurden alle Zellen angesehen, die im „Upper Right“-Viertel der Quadrantendarstellung angezeigt wurden. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM. n=6.

3.8. Schutzfunktion von HSP27 beim Sterbeverhalten in Monozyten

Das intrazelluläre HSP im Hinblick auf den programmierten Zelltod (Apoptose) einen Einfluss haben, wurde in Kapitel 1 näher beschrieben. Für die Wirkung von extrazellulärem HSP (in diesem Fall HSP27) liegen keinerlei Daten vor.

Das Sterbeverhalten von Monozyten als wichtige professionelle APC ist dabei näher beobachtet worden. Die Zellen wurden durch eine zweitägige serumfreie Kultur „gestresst“. Nach Zugabe von HSP27 am Anfang dieser Inkubation, unterlagen signifikant weniger Zellen einem Zelltod (Abb. 14). Dieser Effekt ließ sich in dieser Form nach Zugabe von HSP70 nicht wiederholen (hier nicht dargestellt).

Die Zellen wurden mit Annexin V-FITC (Apoptose) und Propidium Iodid (Nekrose) angefärbt, um diese zwei Arten des Zelltodes zu unterscheiden.

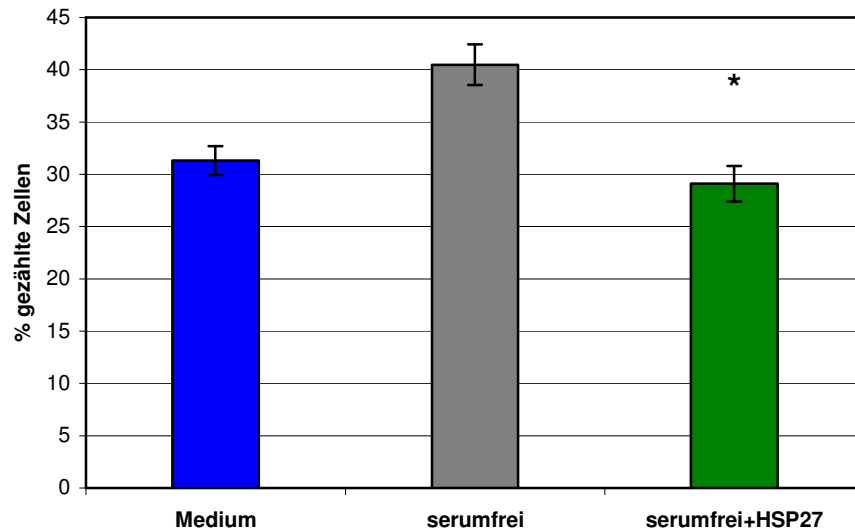
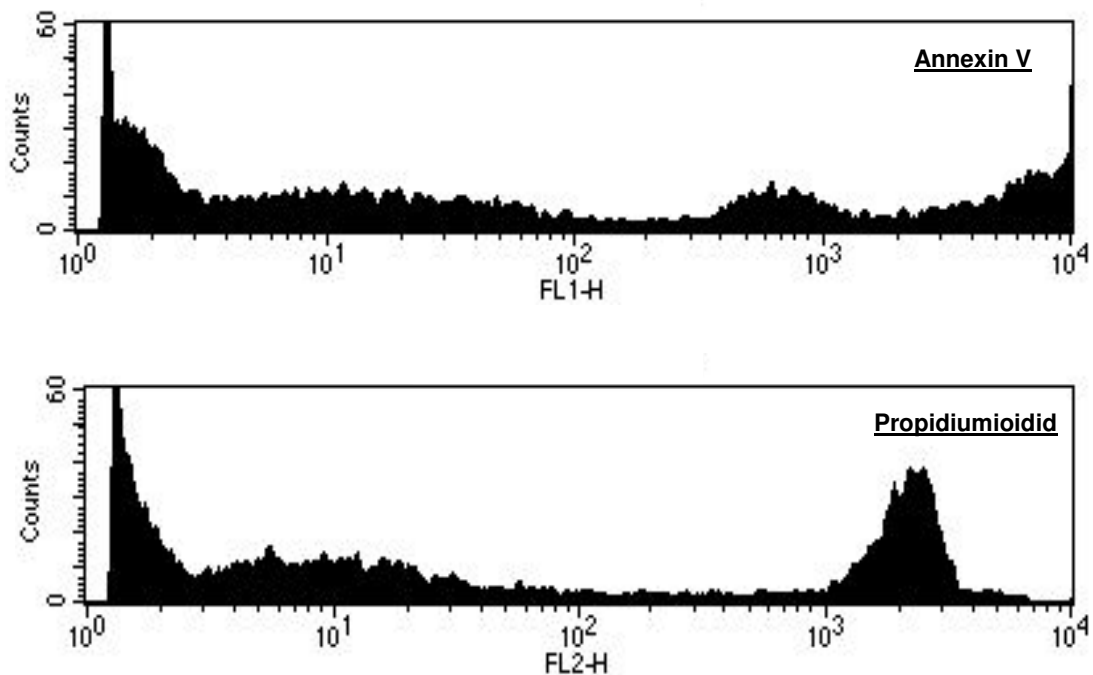


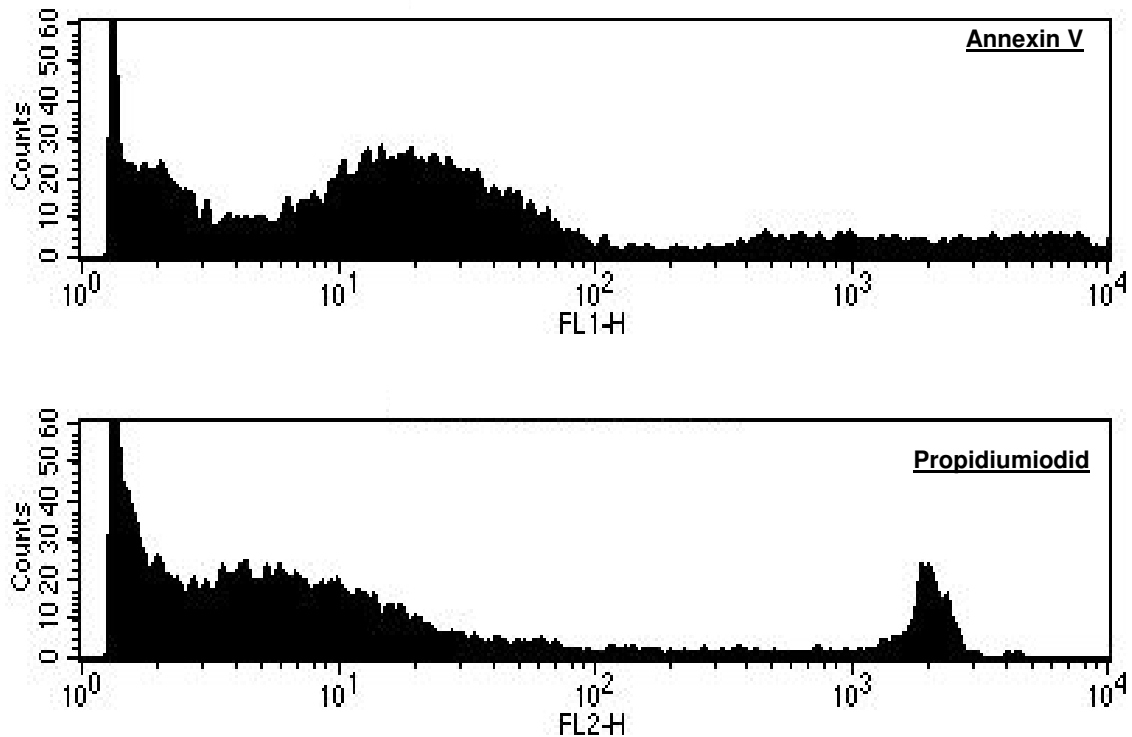
Abbildung 19: Schutzfunktion von HSP27 auf Monozyten.

Die Zellen wurden an Tag 1 aus Spenderblut isoliert, in IAB (4%) bzw. serumfreien Medium kultiviert und stimuliert. Konzentrationen: HSP27:5 μ g/ml, LPS: 3ng/well. Nach zwei Tagen Inkubation erfolgte die Annexin V/PI-Färbung und die durchflusszytometrische Messung. Dabei wurden die doppelpositiven Zellen im „Upper Right“-Viertel als apoptotisch und/oder nekrotisch angesehen (in der Quadrantendarstellung). Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM.

* $p=0,039$ im Vergleich zu serumfrei im t-test. $n=10$.



Kultivierung in serumfreiem Medium: viele Zellen im apoptotischen (FL-1) und nekrotischen Bereich (FL-2)



Kultivierung in serumfreiem Medium + HSP27 (5µg/ml): deutlich weniger Zellen im apoptotischen (FL-1) und nekrotischen Bereich (FL-2)

Abbildung 20: Schutzfunktion von HSP27 für Monozyten.

Exemplarische Darstellung eines repräsentativen Versuchs. Durch Serumentzug gestresste Zellen, die einem apoptotischen Vorgang unterliegen, werden in der verwendeten Annexin V Färbung im FL-1-Kanal dargestellt (FITC), nekrotische Zellen im FL-2-Kanal (PE).

In weiteren Versuchsreihen wurde versucht, den Zelltod nicht nur mit serumfreiem Medium herbei zu führen, sondern es wurde auch der Einfluss von Kortikosteroiden (Dexamethason) und ultravioletten Strahlen (UV-B, 20mJ) auf die Zellen beobachtet (siehe dazu: Schmidt et al., 1999 und 2001; La Sala et al., 2000). Durch die Stimulation mit Dexamethason ließ sich überraschenderweise eine gewisse Schutzfunktion nachweisen, die sich allerdings unter Zugabe von HSP27 nicht signifikant verstärkte. Bei der Bestrahlung war eine Schutztendenz vor dem Zelltod durch HSP27 zu beobachten. Statistisch signifikant war dies jedoch nicht.

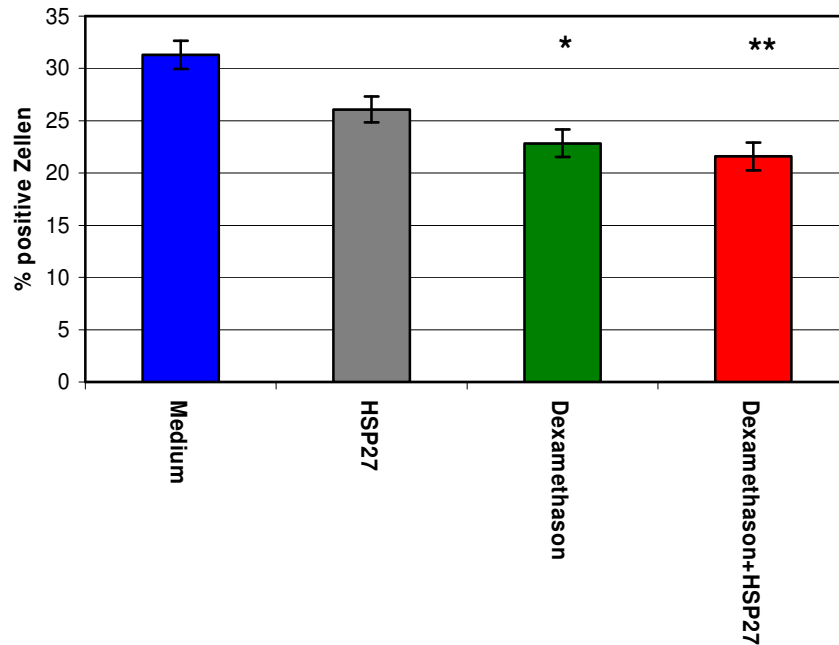


Abbildung 21: Einfluss von Steroiden auf das Sterbeverhalten von Monozyten.

Die Monozyten wurden an Tag 1 isoliert und stimuliert. Konzentrationen: HSP27: 5µg/ml, Dexamethason: 10⁻⁵M. An Tag 2 wurde eine Annexin V/PI-Färbung durchgeführt und durchflusszytometrisch gemessen. Dabei wurden die Zellen im „Upper Right“-Viertel der Quadrantendarstellung als apoptotisch und/oder nekrotisch angesehen. Dargestellt sind Mittelwerte +/- SEM.

* p=0,047 im Vergleich zum Medium im t-test (Dexamethason).

* p=0,041 im Vergleich zum Medium im t-test (Dexamethason+HSP27). n=8.

Kein statistische signifikanter Unterschied zwischen der alleinigen Dexamethason Stimulation zur Stimulation mit Dexamethason + HSP27

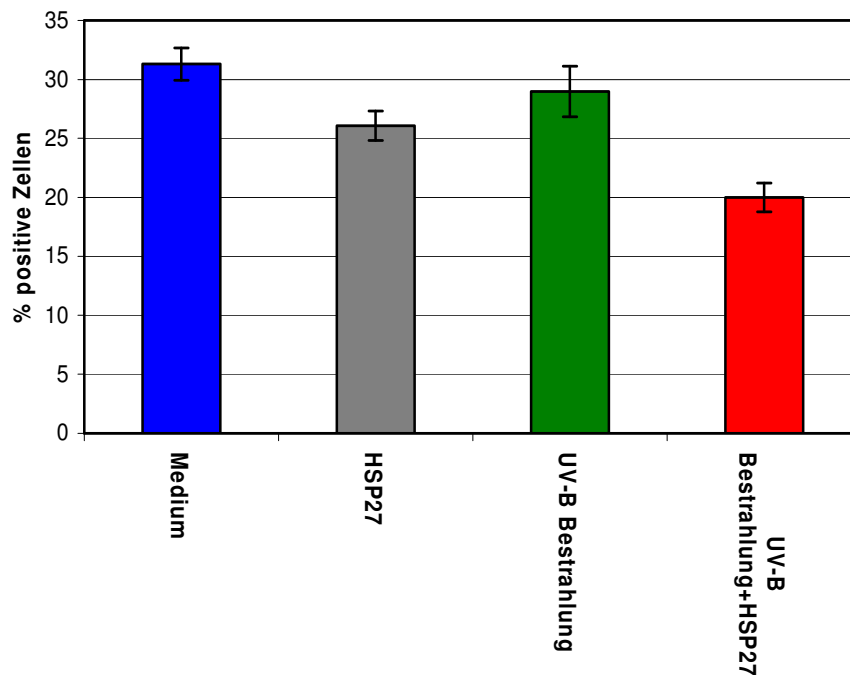


Abbildung 22: Einfluss von UV-B Strahlen auf das Sterbeverhalten von Monozyten.

Die Monozyten wurden an Tag 1 isoliert und stimuliert. Konzentrationen: HSP27: 5µg/ml. Bestrahlung mit 20 mJ UV-B Strahlen. An Tag 2 wurde eine Annexin V/PI-Färbung durchgeführt und durchflusszytometrisch gemessen. Dabei wurden die Zellen im „Upper Right“-Viertel der Quadrantendarstellung als apoptotisch und/oder nekrotisch angesehen. Dargestellt sind Mittelwerte +/- SEM.

Schließlich wurde auch der Einfluss der Zytokine IL-4 und IFN γ alleine oder zusammen mit HSP27 bzw. HSP70 auf das Sterbeverhalten der Monozyten experimentell untersucht. Hierbei ergab sich jedoch kein statistisch signifikanter Effekt.

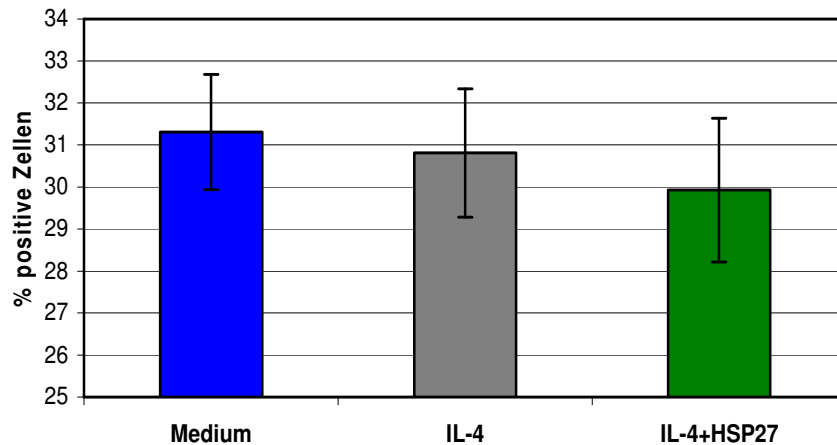


Abbildung 23: Einfluss von IL-4 auf das Sterbeverhalten von Monozyten.

Die Monozyten wurden an Tag 1 isoliert und stimuliert. Konzentrationen: IL-4: 20ng/ml, IFN γ : 20ng/ml, HSP27: 5 μ g/ml. An Tag 2 wurde eine Annexin V/PI-Färbung durchgeführt und durchflusszytometrisch gemessen. Dabei wurden die Zellen im „Upper Right“-Viertel der Quadrantendarstellung als apoptotisch und/oder nekrotisch angesehen. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM. n=9.

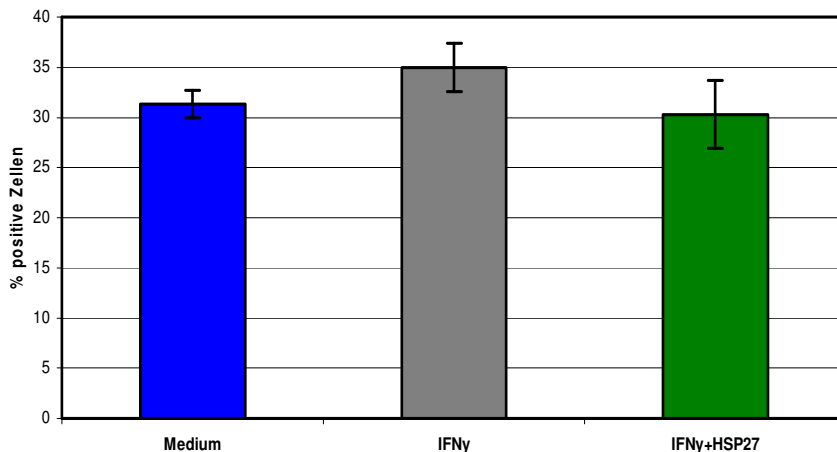


Abbildung 24: Einfluss von IFN γ auf das Sterbeverhalten von Monozyten.

Die Monozyten wurden an Tag 1 isoliert und stimuliert. Konzentrationen: IFN γ : 20ng/ml, HSP27: 5 μ g/ml. An Tag 2 wurde eine Annexin V/PI-Färbung durchgeführt und durchflusszytometrisch gemessen. Dabei wurden die Zellen im „Upper Right“-Viertel der Quadrantendarstellung als apoptotisch und/oder nekrotisch angesehen. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM. n=4.

3.9. Schutzfunktion von HSP27 beim Apoptosevorgang bei HaCat-Zellen

Die bei den Monozyten beobachteten Schutzeffekte wurden auch bei den HaCat-Zellen untersucht. Das Hauptaugenmerk wurde dabei auf die Stimulation mit Dexamethason und die Bestrahlung mit UV-B gelegt. Der Versuchsablauf war der gleiche wie bei den Monozyten. Ein signifikanter Effekt wurde allerdings nicht beobachtet. Dies könnte vor allem an dem veränderten Apoptoseverhalten dieser Tumorzelllinie liegen, das höchstwahrscheinlich durch Unterschiede im NF- κ B-Signalweg begründet werden kann. Eine Tendenz ist jedoch beim Vergleich Dexamethason zu Dexamethason+HSP27 zu erkennen.

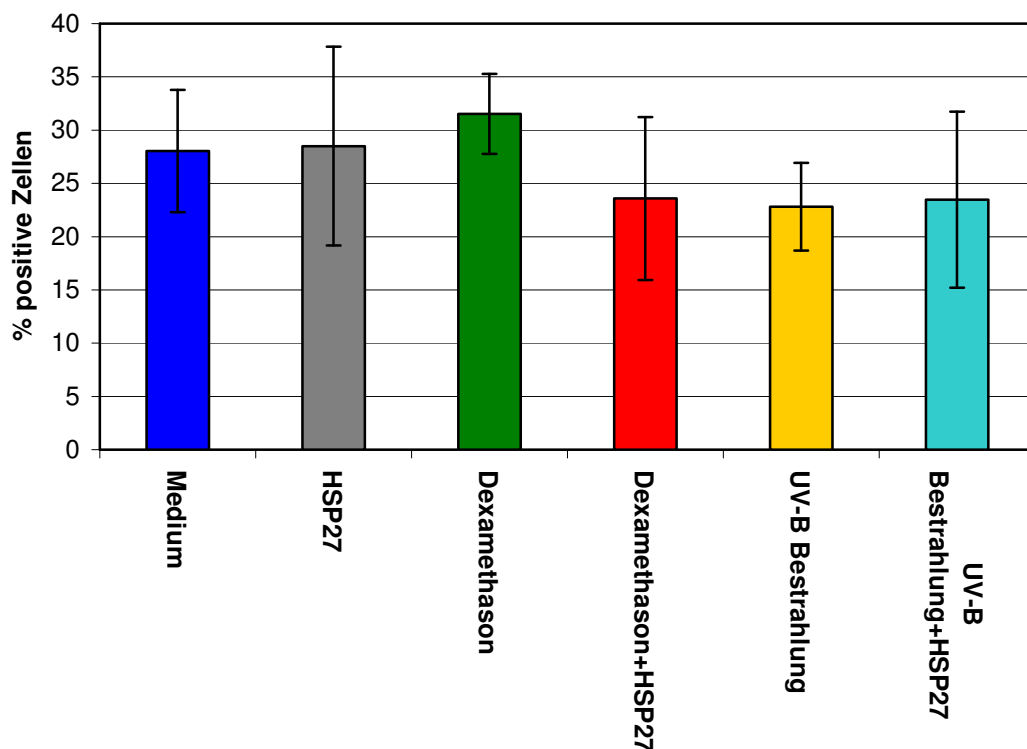


Abbildung 25: Schutzfunktion von HSP27 auf HaCat-Zellen.

Subkonfluente HaCat-Zellen wurden an Tag 1 stimuliert. Konzentrationen: HSP27: 5 μ g/ml, Dexamethason: 10⁻⁵M. Die Zellen wurden mit 20mJ UV-B bestrahlt. An Tag 2 wurde eine Annexin V/PI-Färbung durchgeführt und durchflusszytometrisch gemessen. Dabei wurden die Ereignisse im „UpperRight“-Viertel der Quadrantendarstellung als apoptotisch und/oder nekrotisch angesehen. Dargestellt sind Mittelwerte +/- SEM. n=3.

3.10. Schutzfunktion von HSP27 beim Apoptosevorgang bei Keratinozyten

Der Schutz vor der Apoptose wurde schließlich auch bei primär humanen Keratinozyten untersucht. Insbesondere nach Zugabe von IFN γ und TNF war ein statistisch signifikanter Schutz der Zellen mit HSP27 zu erkennen. Aber auch im Medium ist eine Tendenz zum Schutz durch das HSP zu beobachten. Der Versuchsaufbau war mit dem bei den HaCat-Zellen vergleichbar.

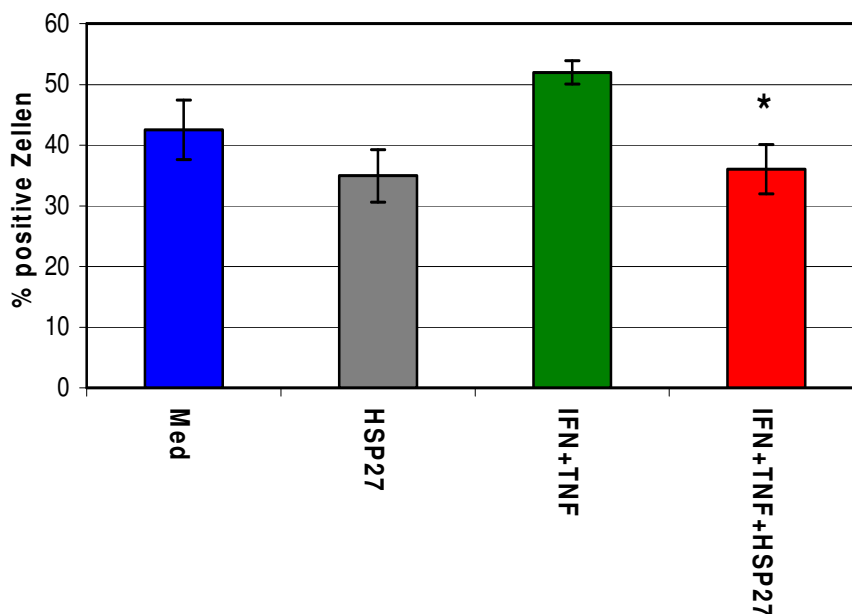
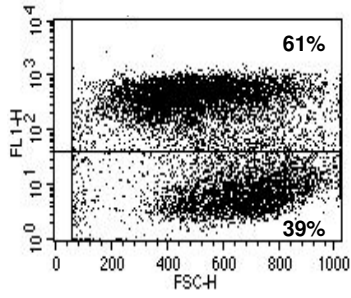


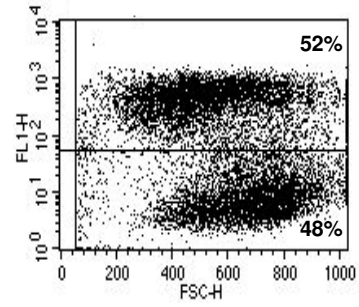
Abbildung 26: Schutzfunktion von HSP27 auf Keratinozyten.

Subkonfluente Keratinozyten wurden an Tag 1 stimuliert. Konzentrationen: HSP27: 5 μ g/ml, IFN γ : 20ng/ml, TNF- α : 200U/ml. An Tag 2 wurde eine Annexin V/PI-Färbung durchgeführt und durchflusszytometrisch gemessen. Dabei wurden die Ereignisse im „UpperRight“-Viertel der Quadrantendarstellung als apoptotisch und/oder nekrotisch angesehen. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM. n=3.

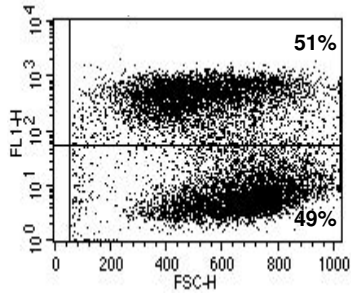
*p=0,06 im Vergleich zu IFN+TNF im paired t-test



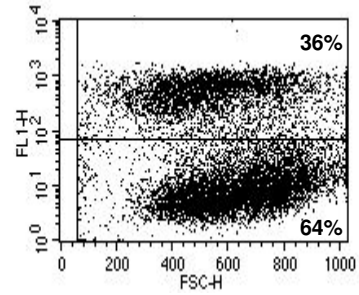
Medium: viele apoptotische Zellen



HSP27: kaum Schutz erkennbar



IFN+TNF: kaum eine Veränderung in der Zellverteilung



IFN+TNF+HSP27: deutlicher Schutz vor vor der Apoptose

Abbildung 27: Schutzfunktion von HSP27 bei Keratinozyten.
Durchflusszytometrische Darstellung eines Beispielversuches

4. Diskussion

Wie in der Einleitung näher dargestellt, spielen HSP sowohl bei der Entzündung und Antigenpräsentation, als auch im Rahmen der Apoptose von immunologisch relevanten Zellen eine wichtige Rolle.

Im Rahmen dieser Dissertation wurde das Hauptaugenmerk auf HSP70 und HSP27 gelegt. Zudem stand die Frage im Mittelpunkt, ob und inwieweit diese HSP beim Zustandekommen und bei der Aufrechterhaltung von entzündlichen Hauterkrankungen eine Rolle spielen könnten. Dies konnte ansatzweise beantwortet werden.

Bei allen durchgeführten Versuchen steht, wie jedes Mal, wenn HSP untersucht werden, die Frage im Raum, inwiefern die beobachteten Effekte auf eine LPS-Kontamination der Proben zurück zu führen ist. Da in jedem Versuch eine ausreichende Menge an Polymyxin B zugeführt, LPS-Kontrollen durchgeführt und teilweise HSP-Proben mit kaum mehr nachweisbaren LPS-Kontaminationen (sogenannten „low-endotoxin HSP“) verwendet wurden, ist von tatsächlich vorhandenen HSP-Effekten auszugehen. Dies wird in einem zusammenhängenden Abschnitt am Schluss der Diskussion näher beleuchtet.

4.1. Beurteilung des Einflusses von HSP auf die IL-12-Produktion

Extrazellulär (im Sinne von „danger signal“) exprimierte HSP besitzen, wie schon in der Einleitung erwähnt, einen Einfluss auf die Zytokinproduktion von immunologisch wichtigen Zellen. Genauer betrachtet wurde in dieser Dissertation der Einfluss auf die IL-12-Produktion, da dieses Zytokin eine wichtige Rolle in der Bildung der Th1-Antwort spielt (Adorini, 1999). Diese Th1-Antwort prägt die chronischen Läsionen der atopischen Dermatitis (Werfel et al., 1996), im Gegensatz zur Th2-Antwort in akuten Läsionen. Als wichtigstes Effektorzytokin der Th1-Antwort ist IFN γ anzusehen, das maßgeblich an der Chronifizierung des Ekzems beteiligt ist.

Da IL-12 vor allem in APC gebildet wird, wurden Monozyten aus Vollblut isoliert. Diese Zellen wurden mit IFN γ als erstem Signal aktiviert. Anschließend erfolgte als zweites Signal die Zugabe von LPS, HSP60 oder HSP70. Hierbei ergab sich eine signifikante Erhöhung der IL-12-Produktion durch LPS und HSP70, jedoch nicht nach Zugabe von HSP60. Die Erhöhung der Produktion durch Zugabe von LPS ist keine Überraschung, da LPS Monozyten zur Bildung fast aller Zytokine anregen kann. Diese Stimulation mit LPS wurde als „Positivkontrolle“ mitgeführt, um zu zeigen, dass die Monozyten überhaupt IL-12 produzieren.

Für HSP70 wurde eine IL-12-Produktionssteigerung in mononukleären Zellen im Mausmodell bereits beschrieben (Wang et al., 2002; Millar et al., 2003; Wan et al., 2004). Allerdings wurden die Zellen in diesen Studien nicht vorher mit IFN γ aktiviert. In den im Rahmen dieser Dissertation durchgeführten Versuchen zeigte sich, dass ohne IFN γ als erstem Signal keine Steigerung der IL-12 Sezernierung in humanen Zellen zu beobachten war. Dies kann mit der Tatsache begründet werden, dass humane Zellen im Gegensatz zu Mauszellen immer ein 2. Signal zur IL-12 Produktionsteigerung benötigen (Wittmann et al., 1999).

Um auch eine mögliche Hemmung der IL-12-Produktion durch HSP nachzuweisen, wurden in einer weiteren Versuchsreihe die Monozyten zunächst mit LPS, HSP60 oder HSP70 vorinkubiert. Am darauf folgenden Tag wurde als zweites Signal IFN γ und LPS zugegeben, was in den zuvor durchgeführten Versuchen eine signifikante Erhöhung der IL-12-Produktion nach sich zog. Dabei führte nur die Vorinkubation mit LPS zu einer deutlichen Hemmung der Produktion. Dieser Effekt wurde bereits beschrieben (Wittmann et al., 1999; Karp et al., 1998) und als Endotoxintoleranz bezeichnet. Dagegen waren weder HSP60 noch HSP70 dazu in der Lage, die IL-12-Produktion in ähnlicher Weise zu beeinflussen, wobei HSP70 eine sichtbare (aber nicht signifikante) Hemmung bewirkte. Für HSP70 wurde bereits eine inhibierende Wirkung auf die IL-12-Produktion nachgewiesen, allerdings mit LPS als erstem Signal (Ding et al., 2001; Wang et al., 2001). Die Tatsache, dass die HSP Vorinkubation keine deutliche Hemmung der IL-12-Produktion nach sich zieht, spricht gegen einen relevanten LPS-Effekt im untersuchten System. Rückschließend kann die HSP70 induzierte IL-12-Produktion „validiert“ werden.

Dabei bleibt aber anzumerken, dass es sich bei Wang et al. (2001) um Beobachtungen am Mausmodell handelt und bei Ding et al. (2001) um eine Überexpression von HSP70.

Hinsichtlich der durchgeführten Versuche kann postuliert werden, dass HSP60 weder einen hemmenden noch einen anregenden Einfluss auf die IL-12-Produktion in humanen Monozyten besitzt.

Ob dies der Wirklichkeit entspricht, wird in der Literatur kontrovers diskutiert. Vieles sprach dafür, dass HSP60 einen großen Einfluss auf das Immunsystem hat, in dem es beispielsweise die Bildung verschiedener Zytokine (u.a. IL-12) anregt oder die Reifung von dendritischen Zellen beeinflusst. (Chen et al., 1999; Flohé et al., 2003). Allerdings wurden diese Beobachtungen *in vitro*, teilweise an Mauszellen und mit LPS-kontaminierten HSP60 Proben durchgeführt. Gao et al. (2003) führten daraufhin Versuche mit endotoxin-freiem HSP60 durch und die damit stimulierten Zellen bildeten kein TNF- α . Daraus folgerten sie, dass möglicherweise alle vorherigen Beobachtungen über den Einfluss von HSP60 auf das Immunsystem mit LPS-Kontamination zu begründen sind.

Da Costa et al. (2004) zeigten schließlich bei *in vivo* Versuchen an Mäusen, dass hochgereinigtes HSP60 (von *Chlamydia pneumoniae*) durchaus eine Steigerung der IL-12 Produktion bewirkt, allerdings nur bei i.v. oder intraperitonealer Injektion einer hohen Dosis dieses HSP. Ob dieses Protein unter physiologischen Bedingungen wirklich in der Lage ist, eine Zytokinproduktionssteigerung hervor zu rufen, ohne dass eine bakterielle Kontamination eine Rolle spielt, erscheint also fraglich.

HSP70 dagegen steigert die Produktion des Botenstoffs (nach vorheriger Aktivierung mit IFN γ) signifikant. Diese Steigerung könnte sich klinisch beispielsweise in einer Verstärkung der Chronifizierung des atopischen Ekzems durch HSP70 widerspiegeln, da dieses Hitzeschockprotein in einem Th-1-Milieu (IFN γ ist das Hauptzytokin der Th-1-Antwort) die Polarisierung anderer T-Zellen in Richtung einer Th1-Antwort unterstützt und die IFN γ Produktion deutlich steigert.

Der Trend einer Hemmung der IL-12-Produktion in ruhenden Monozyten durch extrazelluläres HSP70 könnte bei einer höheren Anzahl von Versuchen signifi-

kant werden. Möglicherweise könnte dies durch die Aufnahme des HSP nach intrazellulär durch Bindung an CD40, CD91, LOX-1 oder andere Rezeptoren erklärt werden, wobei Thériault et al. (2005) nachwies, dass extrazelluläres HSP70 nur an LOX-1 bindet. Ob diese Aufnahme dann eher zu einer Steigerung oder Hemmung der IL-12-Produktion beiträgt, lässt sich nicht mit letzter Sicherheit sagen. Möglicherweise ist der bei uns beobachtete Trend hin zu einer Hemmung nur ein Kurzeffekt, der bei einem Beobachtungszeitraum größer als 24 Stunden nicht mehr nachzuweisen ist. Dass intrazelluläres HSP70 eine hemmende Wirkung auf intrazelluläre Signalwege und damit auf die Zytokinproduktion besitzt, habe Chen et al. (2004) bereits gezeigt.

Auch bei der Zugabe von HSP27 (nach Aktivierung der Zellen mit IFN γ) zeigte sich in einem Beispielversuch eine Zunahme der IL-12-Produktion in hohem Maße. Eine Hemmung der Produktion war, ähnlich wie beim HSP60, nicht zu beobachten.

Zur Beurteilung der Gesamtsituation im Ekzem und die mögliche Rolle der HSP dabei, kann folgendes Modell angenommen werden:

Beteiligt sind freigesetzte (also extrazelluläre), aber auch vermehrt exprimierte intrazelluläre HSP. Zusätzlich dazu spielen eingewanderte Entzündungszellen und eine mögliche bakterielle Superinfektion eine wichtige Rolle. In der initialen Th2 Situation erfolgt eher kein „Priming“ der ortständigen APC, da kein IFN γ vorhanden ist. Daher sind sie in dieser Situation refraktär auf zweite Signale, so dass wahrscheinlich weder HSP noch LPS eine ausgeprägte IL-12 Produktionssteigerung bewirken können. Anders könnte es bei einer Th1 Situation, also einer eher chronischen Entzündung, aussehen. Hier sind zugewanderte APC zu finden, die „empfindlicher“ sind für ein Priming und ein 2. Signal. Es könnte also, nach einem Priming mit IFN γ durch HSP (oder auch LPS), eine IL-12 Produktionsaktivierung stattfinden.

Weitere Versuche wurden mit primären humanen Keratinozyten durchgeführt. Dabei zeigte sich jedoch unter Stimulation mit IFN γ +LPS, IFN γ +TNF- α , Typ I Interferon+ TNF- α oder LPS, IL-18 alleine oder in Kombination mit Interferonen keine messbare IL-12 Expression-/Produktion-Steigerung. Auch HSP27, HSP60

oder HSP70 alleine oder in Kombination mit Interferonen zeigten ebenfalls keine Induktion in unseren Versuchen.

Dabei fällt auf, dass unterschiedliche Arbeitsgruppen die IL-12-Expression durch Keratinozyten unter ähnlichen Stimulationen nachgewiesen haben (Yawalkar et al., 1996; Schwarz, 1996; Aragane et al., 1994). Die Ursache für diese unterschiedlichen Ergebnisse könnte in der geringeren Sensitivität unserer Messmethode liegen. Außerdem sind die Versuche von Yawalkar et al. *ex vivo* (=immunhistochemisch) und die von Aragane et al. hauptsächlich mit epidermalen Zelllinien und Keratinozyten-Zelllinien, aber nicht mit primären humanen Keratinozyten durchgeführt worden. Letztlich ist anzuführen, dass sich die Kulturmedien in den verschiedenen Forschungsgruppen unterscheiden, worin ebenfalls der Grund für diese unterschiedlichen Resultate liegen kann.

4.2. Beurteilung des Einflusses von HSP auf die Oberflächenexpression

Professionelle und nicht-professionelle APC tragen zur Unterstützung ihrer immunologischen Funktionen verschiedene Moleküle auf ihrer Oberfläche, die unter anderem die Interaktion und Kommunikation zwischen diesen Zellen ermöglichen. Verschiedene Stimuli, wie zum Beispiel IFN γ , sind nun in der Lage die Expression dieser Oberflächenmoleküle zu regulieren. Aber auch HSP scheinen dies zu können. So beobachteten Basu et al. (2000), dass gp96 die MHC II-Molekül- und CD86-Expression auf professionellen APC induziert. Aber auch HSP70 scheint einen Einfluss auf die CD86-Expression zu besitzen.

Im Rahmen dieser Dissertation wurde das Hauptaugenmerk zunächst auf die Expression von MHC II, CD54 (ICAM-1) und CD40 auf Monozyten gelegt (zur Rolle dieser Moleküle in der Immunantwort: siehe Einleitung). Die Zellen wurden an einem Tag aus Vollblutspenden isoliert und stimuliert. Am nächsten Tag erfolgte dann eine Oberflächenfärbung auf die jeweiligen Moleküle.

Bei der Expression der MHC II-Moleküle ergab sich lediglich eine sichtbare Induktion bei Stimulation mit LPS. Dieser Anstieg war jedoch nicht signifikant. Dagegen scheinen weder HSP27 noch HSP70 unter unseren Versuchsbedin-

gungen einen Einfluss auf diese Expression zu besitzen. Auffallend bei diesen Versuchen war die deutliche Streuung der Mediumwerte, was sich in der weiten Spanne des „standard error of the mean“ (SEM) widerspiegelt. Diese Unterschiede erklären sich in den unterschiedlichen Spendern der Monozyten, die nicht mit IFN γ vorstimuliert wurden.

Auch bei den Versuchen zu der CD54-Expression gab es kein signifikantes Ergebnis. Jedoch zeigte sich eine Tendenz hin zu einer Induktion durch Stimulation mit HSP70 und mit LPS. Auch HSP27 schien zunächst eine Erhöhung der Oberflächenexpression zu bewirken. Nach Stimulation mit „gekochtem“ HSP27 zeigte sich aber, dass dieser Effekt am ehesten auf eine LPS-Kontaminierung der verwendeten HSP27-Proben zurück zu führen ist.

In weiteren Versuchen wurde der Einfluss von HSP27 auf die CD40-Expression beobachtet. Es ergab sich eine sichtbare, jedoch nicht signifikante Induktion dieses Oberflächenmoleküls.

Nebenbei ist auffallend, dass weder bei den Versuchen zur CD54-Expression, noch bei den zur CD40-Expression, eine derartige Streuung der Mediumwerte wie bei den Untersuchungen zur MHC II-Expression zu beobachten war.

Zusammenfassend kann postuliert werden, dass weder HSP27 noch HSP70 einen signifikanten Einfluss auf die beobachteten Moleküle auf der Oberfläche professioneller APC besitzen. Lediglich HSP70 könnte möglicherweise in der CD54-Expression eine untergeordnete Rolle spielen.

In exemplarischen Versuchen wurde auch der Einfluss von HSP27 auf die Oberflächenexpression von nicht-professionellen APC am Beispiel der HaCat-Zellen beobachtet. Dabei fiel auf, dass nur IFN γ eine Induktion von MHC II-Molekülen und CD54 nach sich zog. Diese Steigerung ist nicht überraschend, da dies für Keratinozyten bereits in der Literatur beschrieben wurde (MHC II: z.B. Albanesi et al., 1998; CD54: z.B. Griffiths et al., 1989).

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass HSP27 in den Versuchsreihen keinen Einfluss auf die Oberflächenexpression der betrachteten Molekü-

le auf professionellen und nicht-professionellen APC hatte. Auf diesem Wege scheint dieses HSP also keine Rolle in der immunologischen Abwehr zu spielen, wofür es in der Literatur auch keinen Hinweis gibt.

Für HSP70 war auch kein signifikanter Einfluss messbar. Lediglich eine Tendenz hinsichtlich der CD54-Expression auf Monozyten war zu erkennen, die aber weitere Abklärung bedarf. Da es in der Literatur pro-kostimulatorische Hinweise bezüglich HSP70 gibt (Kang et al., 2004; Wang et al., 2002), müssen die dargestellten Versuche kritisch betrachtet werden. Allerdings bleibt anzumerken, dass Kang et al. (2004) ihre Beobachtungen mit aus Toxoplasmen gewonnenen HSP durchgeführt haben.

Wang et al. (2002) dagegen wiesen die Hochregulation von ko-stimulatorischen Molekülen und MHC-II an humanen Monozyten mit gentechnisch hergestellten HSP70 nach. Dies allerdings nur bei Verwendung eines bestimmten Teils des gesamten HSP70 Proteins (dem peptide binding fragment). In dieser Dissertation wurde mit dem gesamten Protein stimuliert. Dies könnte den fehlenden signifikanten Anstieg bei den MHC-II Molekülen jedenfalls teilweise erklären.

4.3. Beurteilung des Einflusses von HSP27 auf die Antigenwirkung

Wie in der Einleitung beschrieben, können HSP die Antigenwirkung und -präsentation beeinflussen. Dabei wurde vor allem gp96 und HSP70 untersucht, und bei beiden das Phänomen des „cross-priming“ nachgewiesen (Blachere et al., 1997; Arnold et al., 1995; Breloer et al., 1998; Wells et al., 1998; Gantress et al., 2002; Milani et al., 2002; MacAry et al., 2004). Durch „cross-priming“ ist HSP70 in der Lage sowohl CD8 positive T-Zellen via MHC I zu stimulieren (Srivastava, 2002) als auch durch MHC II CD4 positive T-Zellen zur Proliferation anzuregen (Haug et al., 2005). Für HSP27 gab es bisher keine Untersuchungen, die darauf hin deuteten, dass auch dieses Polypeptid eine Rolle in der Antigenpräsentation spielen könnte.

Bei den durchgeführten Experimenten wurde die Proliferation von T-Zellen unter dem alleinigen Einfluss von Antigenen (Tetanustoxoid bzw. Candida albicans-Extrakt) und unter dem Einfluss dieser Antigene zusammen mit HSP27

beobachtet. Dabei kam die CFSE-Färbung zum Einsatz, die einen gut zu beurteilenden Rückschluss auf das veränderte Proliferationsverhalten von Zellen zulässt, und in dieser Arbeitsgruppe bereits häufig verwendet wurde. Bei dieser Methode wird eine Zellpopulation mit einem Farbstoff versetzt. Bei der Zellteilung wird der Farbstoff nur auf eine der beiden Tochterzellen verteilt, wodurch eine Abnahme der Fluoreszenz um die Hälfte im Facsscanner beobachtet werden kann.

Schon bei alleiniger Stimulation der PBMCs mit den Antigenen wurde eine stark erhöhte Proliferation nach einer Woche Inkubationszeit beobachtet. Dieser Effekt steigerte sich signifikant unter Zugabe von HSP27.

Diese Beobachtung führt zu der Spekulation, dass auch HSP27 mithilfe seiner Chaperoneigenschaft Antigene bindet und dadurch eine verbesserte Aufnahme dieser Proteine in APC bewirken könnte bzw. hier nicht näher untersuchte kostimulatorische Moleküle beeinflusst. Die signifikant erhöhte Proliferation der PBMCs, deutet möglicherweise auf eine verbesserte oder auch veränderte Präsentation der Antigene durch die APC hin. Ob cross-priming eine Rolle spielt, wurde hier nicht näher untersucht. In weiterführenden Versuchen wäre eine Untersuchung der Frage, ob es sich bei den proliferierenden Zelle um CD4- oder CD8-positive T-Zellen handelt, interessant.

Durch diese Versuche wird zum ersten Mal die Vermutung bestätigt, dass HSP27 einen signifikant nachweisbaren Einfluss auf die antigenspezifische Proliferation besitzt. Ein ähnlicher Effekt wurde von Fokken et al. (2003) und Haug et al. (2005) bereits für HSP70 beobachtet. Somit könnte auch HSP27 ein durch stress-induzierbarer positiver Faktor in der Abwehr von bakteriellen Infekten sein, was für HSP70 schon nachgewiesen wurde (Campisi et al., 2003). Die Potenz der verschiedenen HSP bezüglich dieses Einflusses bliebe noch zu diskutieren.

4.4. Beurteilung der Beeinflussung der intrazelluläre HSP27-Konzentration

Wenn, wie in der Einleitung beschrieben, intrazelluläres HSP27 Einfluss nimmt auf verschiedene Zellfunktionen, wie zum Beispiel die Apoptose, ist es natürlich

von Interesse, ob die intrazelluläre HSP27-Konzentration ebenfalls beeinflusst werden kann. Dass verschiedene Reize (Hitze, Hypoxie, zelltoxische Substanzen etc.) eine Induktion der HSP-Expression bewirken können, ist hinlänglich bekannt. In den im Folgenden diskutierten Versuchen wurde jedoch der Einfluss von verschiedenen Zytokinen, HSP und sogar HSP27 selbst auf die intrazelluläre HSP27-Konzentration beobachtet.

Zunächst wurden Versuche an Monozyten durchgeführt. Dabei wurde ein deutlicher Anstieg der intrazellulären HSP27-Konzentration bei Stimulation mit HSP27 beobachtet. Dieser Effekt zeigte auch eine Dosisabhängigkeit. Dagegen wurde kein Einfluss von LPS (in verschiedenen Konzentrationen) oder HSP70 auf die intrazelluläre HSP27-Konzentration beobachtet.

Es existieren drei Erklärungen für diesen Effekt.

Einmal könnten bei diesen Versuchen nur die HSP27-Proteine gemessen worden sein, die an der äußeren Zelloberfläche der Monozyten nach der Stimulation „kleben“ geblieben sind. Dies würde bedeuten, dass fälschlicherweise die hinzu gegebenen Proteine als intrazellulär gebildet angesehen worden sind. Gegen diese Erklärung spricht, dass die Zellen vor dem Messvorgang mehrmals gewaschen und eine Stunde auf Eis inkubiert werden (siehe Kapitel 2), und so ein „Kleben“ von HSP27 an der Zelloberfläche unwahrscheinlich erscheint.

Als zweites könnte eine so genannte Autostimulation diesen Effekt erklären. Extrazelluläres HSP27 würde also die intrazelluläre Bildung von HSP27 induzieren.

Schließlich als dritte und einfachste Erklärung könnte das HSP27 durch die Monozyten aufgenommen worden sein. Da Monozyten/Makrophagen zu den professionellen APC gehören und über eine große Vielfalt an Rezeptoren (u.a. auch für HSP) verfügen, ist eine Aufnahme der HSP durch diese Zellen nicht unwahrscheinlich. Tatsächlich weist die durchgeführte quantitative Real-Time-PCR auf diese letzte Möglichkeit hin. Dieser Vorgang könnte bei den durchgeführten Experimenten zu dem intrazellulären Konzentrationsanstieg von HSP27 geführt haben. Weiterführende Untersuchungen zur Identifizierung eines möglichen „Aufnahme-Rezeptors“ für HSP27 sind noch durchzuführen.

Weitere Versuche an den Monozyten wurden mit IFN γ alleine, oder in Ko-Stimulation mit HSP27, HSP70 oder LPS durchgeführt. Bei Ko-Stimulation mit HSP27 war ein statistisch signifikanter Anstieg der intrazellulären HSP27-Konzentration zu beobachten. Dieser Effekt lässt sich am wahrscheinlichsten wie oben gezeigt mit einer Aufnahme des HSP begründen; ist also nicht auf eine Wirkung des IFN γ , sondern von HSP27 zurück zu führen.

Bei Kostimulation mit HSP70 und LPS ist zwar eine Tendenz hin zu einem Anstieg der intrazellulären HSP27-Konzentration zu erkennen. Dieser Effekt zeigt aber keine statistische Signifikanz.

Weitere Versuche wurden an Keratinozyten durchgeführt. Auffallend war vor allem die signifikante Hemmung der intrazellulären HSP27-Konzentration durch TNF- α . Dieses hauptsächlich von Makrophagen, Natürlichen-Killerzellen aber auch von Keratinozyten selbst gebildete Zytokin spielt in der lokalen Entzündung und der Endothelaktivierung eine wichtige Rolle. Dabei induziert es vor allem die Entzündungsreaktion, so dass TNF- α -Knock-out-Mäuse beispielsweise eine weitgehende Resistenz gegenüber dem septischen Schock besitzen.

In den durchgeführten Versuchen war in den mit TNF- α stimulierten Keratinozyten weniger HSP27 intrazellulär nachweisbar.

Die hier durchgeführten Versuche lassen keine Aussage zu, ob dieser Abfall durch eine Expressionshemmung, eine Umverteilung in andere Zellkompartimente oder durch eine Phosphorylierung des HSP zu erklären ist.

Da zusätzlich bekannt ist, dass TNF- α in nicht näher bekannter Weise proapoptotisch wirkt, ließe sich vermuten, dass es diese Wirkung über die Hemmung von intrazellulärem HSP27 entfaltet. Auf jeden Fall könnte über eine Signalkette von TNF- α -Bildung, daraus folgender HSP27-Hemmung und schließlich eine Erhöhung der Apoptoserate (von Immunzellen, aber vielleicht auch von infizierten oder bakteriellen Zellen) in der Entzündung spekuliert werden.

Möglicherweise erklärt sich der intrazelluläre Abfall von HSP27 durch TNF- α allerdings damit, dass dieses Zytokin über den MAPKinase-Signalweg eine Phosphorylierung und damit eine Maskierung des HSP für den Antikörper bei der Messung am FACS verursachen könnte (siehe dazu: Butt et al., 2001). Allerdings ergab eine Nachfrage beim Hersteller des verwendeten HSP27-

Antikörpers, dass dieser sowohl an phosphorylierte als auch unphosphoryliertes HSP27 bindet, weswegen diese Erklärung eher nicht zutreffend ist.

Ein LPS Einfluss auf die HSP-27-Konzentration war nicht zu beobachten.

Dagegen führte in weiteren Versuchen die Stimulation mit dem Th-2-Zytokin IL-4 und dem Th-1-Zytokin IFN γ zu einem sichtbaren, aber nicht signifikanten, intrazellulären HSP27-Konzentrationsabfall. Auffallend war vor allem der Effekt von IL-4. Um eine mögliche Sezernierung von HSP27 in den Extrazellularraum nachzuweisen, wurden Keratinozyten mit der Zugabe von GolgiPlug daran gehindert Proteine nach extrazellulär abzugeben. In diesen nicht dargestellten Versuchen konnte eine Sezernierung nicht nachgewiesen werden.

Dass IL-4 (genauso wie IFN γ) einen Effekt auf die intrazelluläre HSP27-Konzentration bzw. -Verteilung hat, kann durch diese Versuche angenommen werden. Wie genau dieser Abfall in den Messungen zu erklären ist, bleibt ähnlich wie bei den Versuchen mit TNF- α unklar.

Es kann also zusammenfassend postuliert werden, dass verschiedene Zytokine (TNF- α sicher, IL-4 und IFN γ höchstwahrscheinlich) einen Einfluss auf die intrazelluläre HSP27-Expression in humanen Keratinozyten haben. Dieser Einfluss ist jedoch als eher schwach und möglicherweise biologisch unbedeutend anzusehen.

Wenn nun diese Erkenntnisse auf das Beipielsszenario Ekzem übertragen wird, könnte folgendes angenommen werden:

Zu Beginn der Entzündung wird TNF- α von Entzündungszellen gebildet. Dies führt zu einer Abnahme der intrazellulären HSP27 Konzentration. Dadurch wird eine erhöhte Apoptoserate der an der Entzündung beteiligten Zellen hervorgerufen werden. Daraus ergibt sich eine erhöhte Abgabe von HSP an den extrazellulären Raum, was hemmend auf die Apoptose wirkt und möglicherweise die Entzündung durch die erhöhte Überlebenszeit von Entzündungszellen verlängert.

Insbesondere bei der atopischen Dermatitis könnte auch IL-4/IL-13 über die Einflussnahme auf die intrazelluläre HSP27 Konzentration eine Rolle spielen. Dieser Effekt ist jedoch möglicherweise zu schwach ausgeprägt, um wirklich die Entzündung zu beeinflussen.

In diesem Zusammenhang wäre die Untersuchung von Unterschieden im Verhalten von Keratinozyten von Patienten mit atopischer Dermatitis zu Keratinozyten von gesunden Probanden interessant. Zudem stellt sich die Frage, ob es bei Patienten mit chronischen Ekzemen Veränderungen in der HSP Antwort gibt oder eine Gegenregulation auftritt.

4.5. Beurteilung des Einflusses von HSP auf die Apoptose

Wie in der Einleitung bereits beschrieben, scheinen sowohl HSP70 (Lang et al., 2002) als auch HSP27 (Concannon et al., 2003) einen wichtigen Einfluss auf die Apoptose von Zellen zu besitzen. Das Hauptaugenmerk der bisherigen Forschungen wurde aber auf die intrazellulär vorkommenden HSP gelegt. In dieser Dissertation sollten nun extrazelluläres HSP27 und HSP70 beobachtet werden. Dass diese Proteine extrazellulär vorkommen, wurde in der Einleitung mithilfe der bekannten Literatur belegt.

Um die apoptotische Zellen von nekrotischen unterscheiden zu können, wurde eine Annexin V-FITC (markiert apoptotische Zellen) und Propidium Iodid (färbt nekrotische Zellen) Doppelfärbung durchgeführt. Diese Methode wurde schon in einigen anderen Arbeitsgruppen verwendet (z.B.: La Sala et al., 2000; Schmidt et al., 1999 und 2001).

Zunächst wurden Monozyten untersucht, die durch eine zweitägige Kultivierung in serumfreien Medium in den Zelltod getrieben wurden. Für die auf diesem Wege gestressten Zellen ergab sich ein signifikanter Schutz vor dem Zelltod durch Zugabe von HSP27. Diese Schutzfunktion durch HSP27 ist bei nicht gestressten Zellen nicht zu beobachten. Der Unterschied könnte durch die Fähigkeit von HSP27 erklärt werden, dass das Protein zusätzlich zur Apoptoseverhinderung (Interaktion mit Caspase, Glutathionbildung), auch Zellfunktionen unter Stress unterstützt (Chaperoneffekt, Schutz des Cytoskeletts) (siehe Einleitung).

Dagegen zeigten weder HSP70 noch LPS einen signifikanten Schutz vor dem Zelltod, wobei beim LPS eine eindeutige Tendenz zu beobachten ist.

Insgesamt muss angemerkt werden, dass bei diesen Versuchen die Auslösung des Zelltodes ein großes Problem darstellte. Zwei Tage Inkubation der Monozyten in serumfreiem Medium führte nicht zu einer signifikant erhöhten Anzahl an sterbenden Zellen. Dies lag vor allem daran, dass schon bei den im Vollmedium kultivierten Monozyten eine relativ hohe „Sterberate“ zu verzeichnen war. Dies könnte an der Gewinnung der Monozyten aus den Blutspenden durch die Adhärenzmethode liegen, da dabei die Zellen vom Plastik der Kulturschale mechanisch gelöst werden müssen.

Die Folge bestand darin, dass die Zellen mindestens zwei Tage in serumfreiem Medium kultiviert werden mussten, um eine erhöhte Anzahl an untergegangenen Zellen zu erreichen. Das Problem hierbei war, dass nach der oben beschriebenen Annexin V/PI-Färbung ein Hauptteil der Zellen zweifarbig fluoreszierte. Dies lässt sich damit begründen, dass die Monozyten bereits die Apoptose durchlaufen hatten und sich zusätzlich mit dem Nekrose-Farbstoff anfärbten (PI färbt auch Zellen im Endstadium der Apoptose). Deswegen kann hier nur allgemein vom Schutz vor dem Zelluntergang durch HSP27 gesprochen werden. Eine Differenzierung zwischen Schutz vor Apoptose oder Schutz vor Nekrose ist anhand der vorliegenden Ergebnisse nicht sicher möglich.

In weiteren Versuchen wurde nun versucht, mit anderen Methoden eine Apoptose in den Monozyten auszulösen. Doch weder mit Glukokortikoiden (siehe Schmidt et al., 1999 und 2001) noch mit UV-B-Bestrahlung (siehe La Sala et al., 2000) der Zellen ließ sich dies erreichen, obwohl die in der Literatur beschriebenen Methoden exakt nachgestellt wurden. Im Gegensatz dazu wurde sogar eine paradox erscheinende Schutzfunktion durch Glukokortikoide beobachtet, die sich durch HSP27 aber nicht verstärken ließ.

Dagegen war bei der UV-B-Bestrahlung eine gewisse Tendenz hin zu einer Schutzfunktion durch HSP27 zu beobachten. Eine statistische Signifikanz lag hier nicht vor.

Als letztes wurde der Einfluss des Th-1-Zytokins IFN γ und des Th-2-Zytokins IL-4 beobachtet. Beide führten nicht zu einem signifikanten Unterschied im Sterbeverhalten. Eine sichtbare Tendenz wiederum hin zu einer Schutzfunktion war

jedoch bei der Stimulation von IFN γ und HSP27 im Vergleich zur alleinigen Stimulation mit IFN γ zu erkennen.

Zusammenfassend kann trotz allem postuliert werden, dass auch extrazelluläres HSP27, im Gegensatz zu HSP70, einen Schutz vor dem Zelltod für Monozyten darstellt. Dies wird bei Stimulation zusammen mit IFN γ und bei der UV-B-Bestrahlung sichtbar und erreicht bei Kultivierung der Zellen in serumfreien Medium Signifikanz. Dieser Einfluss kann klinisch als eher negativ angesehen werden, da die längere Überlebenszeit der professionellen APC im Entzündungsgeschehen zu einer Chronifizierung führen kann.

Ob HSP27 die Apoptose oder die Nekrose der Zelle verzögert, ließ sich mit der verwendeten Methode nicht genau differenzieren. Die Vermutung liegt aber nahe, dass es eher ein Schutz vor Apoptose ist, da dies schon für intrazelluläres HSP27 nachgewiesen wurde. Außerdem erscheint ein Schutz vor einem nicht „natürlichen“ und unprogrammierten Tod durch ein HSP eher als unwahrscheinlich. In der Literatur finden sich dazu meines Wissens auch keine Erkenntnisse.

Nachdem der Einfluss der HSP auf die Apoptose von professionellen APC untersucht wurde, sollten auch nicht-professionelle APC in Form von Keratinozyten beobachtet werden. Dies ist auf der einen Seite wichtig, da diese Zellen immunologisch relevante Funktionen, ähnlich den der professionellen APC, übernehmen können (siehe Einleitung). Auf der anderen Seite postulierten Trautmann et al. (2000), dass die Keratinozyten-Apoptose ein Schlüsselereignis in der Pathogenese der atopischen Dermatitis darstellt. Also könnten HSP27 (oder HSP70) durch einen möglichen Schutz, ähnlich dem durch HSP27 bei den Monozyten, einen positiven Einfluss auf den Krankheitsverlauf der atopischen Dermatitis besitzen.

Als erstes wurde die Tumorzelllinie der HaCat-Zellen beobachtet. Sie sind den Keratinozyten ähnlich, lassen sich aber leichter anzüchten und kultivieren. Um einen Zelltod auszulösen wurden diese Zellen entweder mit Glukokortikoiden stimuliert oder mit UV-B-Strahlen bestrahlt. Ein signifikanter Schutz vor dem Zelltod durch HSP27 war allerdings nicht zu erkennen. Lediglich bei der Glukokortikoid-Stimulation ist eine Tendenz zu beobachten, die auf einen leichten Schutz durch HSP27 hindeutet.

Problematisch bei diesen Versuchen war wiederum, dass bei der verwendeten Methode nicht genug Zellen in die Apoptose getrieben wurden. Möglicherweise liegt der Grund hierfür in der Gewinnung der Zellen, die lange kultiviert werden müssen und dann aus der Kulturflasche nur mit potentiell zelltoxischen Substanzen (Trypsin) abgelöst werden können. Zusätzlich dazu ist anzunehmen, dass eine Tumorzelllinie ein gegenüber den Ursprungszellen verändertes Apoptoseverhalten besitzt.

Als letztes wurden Versuche an Keratinozyten durchgeführt. Dabei bestätigte sich die bei den Monozyten schon beobachtete Schutzfunktion von extrazellulärem HSP27. Ein Schutz vor der Apoptose ist bereits im Medium erkennbar jedoch statistisch nicht signifikant. Unter gleichzeitiger Stimulation mit den proapoptotischen Zytokinen IFN γ und TNF- α stellt sich diese Signifikanz jedoch ein. HSP27 schützt also auch Keratinozyten vor der Apoptose. Insofern ist also anzunehmen, dass dieses Protein eine wichtige Rolle im Hinblick auf die immunologischen Funktionen dieser Zellen spielt (siehe oben). Außerdem könnten sie somit direkt beteiligt sein in der Pathogenese der atopischen Dermatitis.

4.6. Beurteilung des Einflusses von LPS in den durchgeführten Versuchen

Seitdem Forschung mit HSP betrieben wird, gibt es immer wieder Hinweise, dass die beobachteten Effekte dieser Proteine auf eine Kontamination mit LPS zurück zu führen sind. Dabei geht es nicht um die Chaperonfunktion der HSP, die angezweifelt wird. Vielmehr werden die Einflüsse, die diese Proteine im Immunsystem besitzen sollen (vor allem der Zytokineffekt), in Frage gestellt. Dieser Zytokineffekt besitzt nämlich auch LPS und andere bakterielle Lipoproteine. Unterstützt werden diese Zweifel durch die Tatsache, dass rekombinante bakterielle und humane HSP, die auch in dieser Dissertation verwendet wurden (siehe Kapitel 2), in E.coli exprimiert werden. Die endgültige Präparation der Proteine könnten also durch bakterielle Produkte kontaminiert sein.

Um die Möglichkeit dieser Ergebnisverfälschung auszuschließen, werden meist drei Methoden verwandt: Einmal werden die HSP-Proben erhitzt, da LPS hitzestabiler als die HSP sein soll. Im Vergleich zwischen der Stimulation mit erhitz-

ter und nicht erhitzter HSP-Probe lässt sich dadurch ein möglicher LPS-Effekt herausfiltern. Als zweites können LPS-Effekte durch Polymyxin B unterdrückt werden (Beispiel für die Verwendung dieser Verfahren in der Literatur: Asea et al., 2000; Chen et al., 1999; Dybdahl et al., 2002; Kol et al., 2000; Pope et al., 1992; Retzlaff et al., 1994 und 1996; Wang et al., 2002). In dieser Dissertation wurden zu jeder HSP-Stimulation Polymyxin B hinzugefügt und bei den Versuchen zur Oberflächenexpression die HSP27-Probe erhitzt. Zudem wurden in einigen Fällen zusätzliche Stimulationen mit exakt der Menge an LPS durchgeführt, die der Konzentration an LPS in der jeweiligen HSP-Probe entsprach (gemessen im Endotoxin-Test, siehe Kapitel 2). Als drittes sind HSP-Proben mit durch neuartige Aufreinigungsmethoden extrem niedrig gehaltenen LPS-Kontaminationen auf dem Markt erhältlich. Effekte, die unter Verwendung solcher einer Probe beobachtet wurden, können also als reine HSP-Effekte angesehen werden. Eine LPS-Beeinflussung ist weitestgehend auszuschließen.

Weitere weniger häufig verwendete Methoden sind die Zugabe von anti-HSP-Antikörper oder LPS-Inhibitoren, wie Lipid IVa oder Lipid A produziert von *Rhodopseudomonas spheroides*.

Nun kamen trotz dieser Möglichkeiten der Inhibition des LPS-Einflusses Zweifel gerade an der Zytokinfunktion von HSP auf. So beobachteten Wallin et al. (2002), dass hochkonzentriertes HSP70 aus Leberzellen keine Zytokineffekt, selbst bei sehr hohen Konzentrationen, besitzt. Dagegen waren LPS-kontaminierte HSP70-Proben mit geringeren Konzentrationen an HSP70 in der Lage Zytokinfunktionen auszuführen, wobei diese Effekte hitzesensibel (also verringerten sich bei Erwärmung) und nicht durch Polymyxin B zu inhibieren waren. Weitere Studien führten zu ähnlichen Ergebnissen oder zeigte, dass LPS doch hitzesensibel ist (Bausinger et al., 2002; Gao und Tsan, 2003a und B; Reed et al., 2003). Anzumerken bleibt, dass die in diesen Forschungsgruppen verwendeten, von LPS gereinigten HSP-Proben, die keine Zytokinfunktion mehr besaßen, weiterhin als Chaperone funktionierten, so dass eine Beschädigung der Proteine durch den Reinigungsprozess ausgeschlossen werden konnte.

Zusätzlich dazu stellten Gao und Tsan (2003) fest, dass in einer herkömmlichen HSP60-Probe zusätzlich zu LPS auch andere kontaminierende bakterielle Produkte enthalten waren, die für 50% der TNF- α -Induktion verantwortlich und nicht durch Polymyxin B zu inhibieren waren (siehe ebenfalls dazu: oben). Auch

Hartley et al. (2004) postulierten, dass die Beobachtungen bezüglich der Schutzfunktion von HSP60 gegenüber bakteriellen Krankheiten möglicherweise auf eine Verunreinigung der HSP-Proben eben mit bakteriellen Produkten zurück zu führen ist und nicht durch das Protein selbst erklärt werden kann.

Es zeigt sich also, dass viele der früher durchgeführten Studien zur Rolle von HSP im Immunsystem wahrscheinlich LPS-Effekte oder Einflüsse LPS-assoziierter Moleküle waren. Um dies zu umgehen, müssen nun hochgereinigte HSP-Proben (s.o.) verwendet werden, um diese Fehler in Zukunft zu vermeiden.

Im Zusammenhang mit dieser Dissertation muss folgendes beachtet werden: Es wurden in jedem Versuch Polymyxin B zur HSP-Probe hinzugefügt, um einen möglichen LPS-Effekt zu unterbinden. Außerdem liefen immer Kontrolluntersuchungen mit reiner LPS-Stimulation (ohne Polymyxin B) mit. Als letztes wurden in einigen Versuchen hochgereinigte nahezu LPS-freie HSP-Proben verwendet. Somit wurden die maximal möglichen „Sicherheitsmaßnahmen“ unternommen, um einen Begleiteffekt zu unterbinden.

Bei Beleuchtung der prägnantesten Ergebnisse lässt sich nun folgendes feststellen:

Dass die Schutzfunktion von HSP27 auf die Apoptose durch Kontamination beeinflusst wurde, erscheint weniger wahrscheinlich, da ein ähnlicher Effekt nicht mit LPS zu erzielen war. Außerdem wurden LPS-Stimulationen durchgeführt, die keine signifikante Hemmung oder Induktion des Zelltodes zur Folge hatten. Zusätzlich dazu konnten Versuche mit hochgereinigtem HSP27 (Endotoxin-frei) die Ergebnisse bestätigen.

Und auch bei den Untersuchungen bezüglich der intrazellulären Konzentration von HSP27 liefen zahlreiche Kontrollen mit unterschiedlichen LPS-Konzentrationen mit, die keinerlei Effekt, weder bei den Monozyten, noch bei den Keratinozyten und HaCat-Zellen, zeigten.

Lediglich die Versuche zur IL-12-Produktion und zur Oberflächenexpression möglicherweise durch eine mögliche Kontamination der HSP-Proben in einem anderen Licht erscheinen. Jedoch wurden auch in diesen Untersuchungen die oben beschriebenen drei Maßnahmen zur Reduzierung eines möglichen LPS-Effektes durchgeführt.

Insofern lässt sich zusammenfassend postulieren, dass in dieser Dissertation mit verschiedenen, wissenschaftlich standardisierten und häufig verwendeten Methoden versucht wurde, einen mögliche Begleiteffekt durch Verunreinigung der HSP-Probe auszuschließen. Die beobachteten Effekte können somit als nahezu sichere HSP-Effekt angesehen werden.

5. Zusammenfassung

HSP27 und HSP70 spielen eine Rolle in der chronischen Entzündungsantwort. Auch bei entzündlichen Hauterkrankungen wird eine pathophysiologische Relevanz von HSP vermutet. Zu Beginn dieser Arbeit war sowohl wenig über den Einfluss von HSP27/HSP70 auf die Keratinozyten, als auch über die Regulation dieser Chaperone in den Keratinozyten bekannt. Die durchgeführten Experimente sollten die Frage beantworten, ob extrazelluläres HSP27 oder HSP70 einen funktionellen Einfluss auf humane Keratinozyten zeigt. Zum Vergleich wurden auch Monozyten des peripheren Blutes bzw. PBMC analysiert. Methodisch kamen durchflusszytometrische Untersuchungen, PCR und ELISA zum Einsatz.

Zunächst konnte bestätigt werden, dass extrazelluläres HSP70 (aber nicht HSP27) in der Lage ist, die Produktion des immunregulatorisch wichtigen IL-12 in Monozyten zu fördern. Im Vergleich dazu war weder HSP27 noch HSP70 in der Lage, IL-12 in primären humanen Keratinozyten zu induzieren. Auch konnte für keines der beiden HSP ein Einfluss auf die Oberflächenexpression von kostimulatorischen Rezeptoren oder MHC Klasse II auf Monozyten oder Keratinozyten beobachtet werden. Dagegen konnte erstmals mithilfe der CFSE-Färbung gezeigt werden, dass extrazelluläres HSP27 die antigen-spezifische T-Zell Proliferation verstärkt. Für HSP70 war dieser Effekt bereits bei früheren Untersuchungen gezeigt worden. In dieser Arbeit konnten Hinweise dafür geliefert werden, dass extrazelluläres HSP27 von Monozyten aufgenommen wird und nachfolgend vermehrt intrazellulär zu detektieren ist. Es konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht überprüft werden, ob und wie das aufgenommene HSP27 die Antigenpräsentation beeinflusst.

Von besonderem Interesse war die Frage, ob extrazelluläre HSP einen Einfluss auf Apoptose/Überleben von humanen Monozyten und Keratinozyten besitzen. Die erhobenen Ergebnisse zeigen unter Serumentzug bzw. Stimulation mit Dexamethason eine eindeutige Schutzfunktion von HSP27 auf Monozyten. Bei

Keratinocyten kann eine Schutzfunktion von HSP27 unter der Stimulation mit IFN γ und TNF α beobachtet werden.

Zusammenfassend sind diese Beobachtungen als Basis zu weiteren Untersuchungen im Bereich chronische Hautentzündung anzusehen. Es zeigte sich, dass die untersuchten HSP auf verschiedene Weise Einfluss nehmen auf immunologische Reaktionen und das Sterbeverhalten von Zellen. Dies könnte für das Verständnis der Interaktion zwischen eingewanderten Lymphozyten und den residenten Zellen der Epidermis, den Keratinocyten, in entzündlichen Hautreaktionen relevant sein.

6. Literaturverzeichnis

- Adams JM, Corry S.** 1998. The Bcl-2 protein family: Arbiters of cell survival. *Science* 281: 1322-26
- Adarem A, Ulevitch RJ.** 2000. Toll-like receptors in the induction of the innate immune response. *Nature* 406: 782-787
- Adorini L.** 1999. Interleukin-12, a key cytokine in Th1-mediated autoimmune diseases. *Cell Mol Life Sci* 55: 10-25
- Agren LC, Ekman L, Lowenadler B et al.** 1997. Genetically engineered nontoxic vaccine adjuvant that combines B cell targeting with immunomodulation by cholera toxin A1 subunit. *J Immunol* 158: 3936-46
- Ahlers A, Belka C, Gaestel M et al.** 1994. Interleukin-1-induced intracellular signalling pathways converge in the activation of mitogen-activated protein kinase and mitogen-activated protein kinase-activated protein kinase 2 and the subsequent phosphorylation of the 27-kilodalton heat shock protein in monocytic cells. *Mol. Pharmacol.* 46: 1077-83
- Akdis M, Simon HU, Weigl L et al.** 1999. Skin homing (cutaneous lymphocyte-associated antigen-positive) CD8+ T cells respond to superantigen and contribute to eosinophilia and IgE production in atopic dermatitis. *J Immunol* 163: 466-75
- Akdis M, Trautmann A, Blaser K et al.** 2000. Life span of skin homing T cells in atopic dermatitis: Survival in skin, activation induced apoptosis in peripheral blood. *J Allergy Clin Immunol* 105: 167-70
- Albanesi C, Cavani A, Girolomoni G.** 1998. Interferon gamma stimulated human keratinocytes express the genes necessary for the production of peptide loaded MHC class II molecules. *J Invest Dermatol* 11: 138-42
- Albanesi C, Scarponi C, Sebastiani S et al.** 2001. A cytokine-to-chemokine axis between T lymphocytes and keratinocytes can favor Th1 cell accumulation in chronic inflammatory skin diseases. *J Leukoc Biol* 70: 617-23
- Albanesi C, Scarponi C, Giustizieri ML et al.** 2005. Keratinocytes in inflammatory skin diseases. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy* 4: 329-34
- Alnemri ES, Livingston DJ, Nicholson DW et al.** 1996. Human ICE/CED-3 protease nomenclature. *Cell* 87: 171
- Amberger A, Hala M, Saurwein-Teissl M et al.** 1999. Suppressive effects of anti-inflammatory agents on human endothelial cell activation and induction of heat shock proteins. *Mol Med* 5: 117-28
- Anderson KV.** 2000. Toll signalling pathways in the innate immune response. *Curr Opin Immunol* 12: 13-19
- Anderton SM, van der Zee MR, Goodacre JA.** 1993. Inflammation activates self hsp60-specific T cells. *Eur J Immunol* 23: 33-8
- Aragane Y, Riamcum H, Bhadwai RS et al.** 1994. IL-12 is expressed and released by human keratinocytes and epidermoid carcinoma cell lines. *J Immunol* 153: 5366-72
- Armitage RJ, Fanslow WC, Strockbine L et al.** 1992. Molecular and biological characterization of a murine ligand for CD40. *Nature* 357: 80-82
- Arnold D, Faath S, Rammensee H et al.** 1995. Cross-priming of minor histocompatibility antigen-specific cytotoxic T cells upon immunization with heat shock protein gp96. *J Exp Med* 182: 885
- Arnold-Schild D, Hanau D, Spehner D et al.** 1999. Cutting edge: receptor-mediated endocytosis of heat shock proteins by professional antigen-presenting cells. *J Immunol* 162: 3757-60
- Arrigo AP, Firdaus WJ, Mellier G et al.** 2005. Cytotoxic effects induced by oxidative stress in cultured mammalian cells and protection provided by HSP27 expression. *Methods* 35: 126-38

- Asea A, Kabingu E, Stevenson MA et al.** 2000a. Hsp70 peptidebearing and peptide-negative preparations act as chaperokines. *Cell Stress Chaperones* 5: 425-31
- Asea A, Kraeft SK, Kurt-Jones EA et al.** 2000b. HSP70 stimulates cytokine production through a CD14-dependant pathway, demonstrating its dual role as a chaperone and cytokine. *Nat Med* 6: 435-42
- Asea A, Rehli M, Kabingu E et al.** 2002. Novel signal transduction pathway utilized by extracellular hsp70. *J Bio Chem* 277: 15028-34
- Asea A.** 2003. Chaperonike-induced signal transduction pathways. *Exerc Immunol Rev* 9: 25-33
- Ashkenazi A, Dixit VM.** 1998. Death receptors: Signalling and modulation. *Science* 281: 1305-8
- Bal V, McIndoe A, Denton G et al.** 1990. Antigen presentation by keratinocytes induces tolerance in human T lymphocytes. *Eur J Immunol* 20: 1893-7
- Banchereau J, De Paoli P, Valle A et al.** 1991. Long term human B cell lines dependent on interleukin 4 and anti-CD40. *Science* 251:70-2
- Banerjee G, Damodaran A, Devi N et al.** 2004. Role of keratinocytes in antigen presentation and polarization of human T lymphocytes. *Scan J Immunol* 59: 385-94
- Barker JN, Sarma V, Mitra RS et al.** 1990a. Marked synergism between tumor necrosis factor- α and interferon- γ in regulation of keratinocyte-derived adhesion molecules and chemotactic factors. *J Clin Invest* 85: 605-8
- Barker JN, Allen MH, MacDonald DM.** 1990b. Alterations induced in normal human skin by in vivo interferon- γ . *Br J Dermatol* 122: 451-8
- Barker JN, Mitra RS, Griffiths CE et al.** 1991. Keratinocytes as initiators of inflammation. *Lancet* 337: 211-4
- Barker JN, MacDonald DM.** 1992. Cutaneous lymphocyte trafficking in the inflammatory dermatoses. *Br J Dermatol* 126: 211-5
- Basu S, Binder RJ, Suto R et al.** 2000. Necrotic but not apoptotic cell death releases heat shock proteins, which deliver a partial maturation signal to dendritic cells and activate the NF- κ B pathway. *Int Immun* 12: 1539-1546
- Basu S, Binder RJ, Ramalingam T et al.** 2001. CD91 is a common receptor for heat shock proteins gp96, hsp90, hsp70, and calreticulin. *Immunity* 14: 303-13
- Bausinger H, Lipsker D, Ziylan U et al.** 2002. Endotoxin-free heat shock protein 70 fail to induce APC activation. *Eur J Immunol* 32: 3708-13
- Becker T, Hartl FU, Wieland F.** 2002. CD40, an extracellular receptor for binding and uptake of hsp70-peptid complexes. *J Cell Biol* 158: 1277-85
- Beckmann RP, Lovett M, Welch WJ.** 1992. Examining the function and regulation of HSP70 in cells subjected to metabolic stress. *J Cell Biol* 117:1137-50
- Beere HM, Wolf BB, Cain K et al.** 2000. Heat shock protein 70 inhibits apoptosis by preventing recruitment of procaspase-9 to the Apaf-1 apoptosome. *Nat Cell Biol* 2: 469-475
- Beissinger M, Buchner J.** 1998. How chaperones fold proteins. *Biol Chem* 379: 245-259
- Bellmann K, Jaattela M, Wissing D et al.** 1996. Heat shock protein hsp70 overexpression confers resistance against nitric oxide. *FEBS Lett* 391: 185-8
- Bertorelli G, Bocchino V, Zhuo X et al.** 1998. Heat shock protein 70 up regulation is related to HLA-DR expression in bronchial asthma. Effects of inhaled glucocorticoids. *Clin Exp Allergy* 28: 551-60
- Binder RJ, Harris ML, Menoret A et al.** 2000. Saturation, competition and specificity in interaction of heat shock protein (hsp) gp96, hsp90, and hsp70 with CD11b+ cells. *J Immunol* 164: 2582-87
- Binder RJ, Han DK, Srivastava PK.** 2000. CD91: a receptor for heat shock protein gp96. *Nat Immunol* 1: 151-5

- Binder RJ, Kumar SK, Srivastava PK.** 2002. Naturally formed or artificially reconstituted non-covalent alpha2-macroglobulin-peptide complexes elicit CD91-dependent cellular immunity. *Cancer Immunol* 2: 16
- Binder RJ, Srivastava PK.** 2004. Essential role of CD91 in re-presentation of gp96-chaperoned peptides. *Proc Natl Acad Sci USA* 101: 6128-33
- Bito T, Roy S, Sen CK et al.** 2000. Pine bark extract pycnogenol downregulates IFN-gamma-induced adhesion of T cells to human keratinocytes by inhibition of inducible ICAM-1 expression. *Free Radic Biol Med* 28: 219-27
- Blachere NE, Li Z, Chandawarkar RY et al.** 1997. Heat shock protein-peptide complexes, reconstituted in vitro, elicit peptide-specific cytotoxic T lymphocyte response and tumor immunity. *J Exp Med* 186: 1315-22
- Bornmann L, Polla BS, Lotz BP et al.** 1995. Expression of heat shock proteins in muscle from Duchenne muscular dystrophy patients. *Muscle & Nerve* 18: 23-31
- Boyd AW, Wawryk SO, Burns GF et al.** 1988. Intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) has a general role in cell-cell contact-mediated immune mechanisms. *Proc Natl Acad Sci USA* 85: 3095-9
- Breloer M, Marti T, Fleischer B et al.** 1998. Isolation of processed, H-2Kb-binding ovalbumin-derived peptides associated with the stress proteins hsp70 and gp96. *Eur J Immunol* 28: 1016-21
- Bruey JM, Ducasse C, Bonniaud P et al.** 2000. HSP27 negatively regulates cell death by interacting with cytochrome c. *Nat Cell Biol* 2: 645-652
- Buchman TG, Abello PA, Smith EH et al.** 1993. Induction of heat shock response leads to apoptosis in endothelial cells previously exposed to endotoxin. *Am J Physiol* 265: 165-70
- Buendia B, Santa Maria A, Courvalin.** 1999. Caspase-dependent proteolysis of integral and peripheral proteins of nuclear membranes and nuclear pore complex proteins during apoptosis. *J Cell Sci.* 112: 1743-1753
- Butt E, Immler D, Meyer HE et al.** 2001. Heat shock protein 27 is a substrate of cGMP-dependent protein kinase in intact human platelets: phosphorylation-induced actin polymerization caused by hsp27 mutants. *J Bio Chem* 276: 7108-7113
- Campisi J, Fleshner M.** 2003. Role of extracellular hsp72 in acute stress-induced potentiation of innate immunity in active rats. *J Appl Physiol* 94: 43-52
- Carbone FR, Kurts C, Bennett SR et al.** 1998. Cross-presentation: a general mechanism for CTL immunity and tolerance. *Immunol Today* 19: 368-73
- Carper SW, Rocheleau TA, Cimino D et al.** 1997. Heat shock protein 27 stimulates recovery of RNA and protein synthesis following a heat shock. *J Cell Biochem* 66: 153-164
- Carroll JM, Crompton T, Seery JP et al.** 1997. Transgenic mice expressing IFN γ in the epidermis have eczema, hair hypopigmentation and hair loss. *J Invest Dermatol* 108: 412-22
- Castellino S, Boucher PE, Eichelberg K et al.** 2000. Receptor-mediated uptake of antigen-heat shock protein complexes results in major histocompatibility complex class I antigen presentation via two distinct processing pathways. *J Exp Med* 191: 1957-64
- Charette SJ, Lavoie JN, Lambert H et al.** 2000. Inhibition of Daxx-mediated apoptosis by heat shock protein 27. *Mol Cell Biol* 20: 7602-12
- Chen W, Syldath U, Bellmann K et al.** 1999. Human 60-kDa heat-shock protein: a danger signal to the innate immune system. *J Immunol* 162: 3212-9
- Chen Y, Arrigo AP, Currie RW.** 2004. Heat shock treatment suppresses angiotensin II-induced activation of NF-(kappa) B pathway and heart inflammation: role for IKK depletion by heat shock? *Am J Heart Circ Physiol* 287:H1104-14
- Concannon CG, Orrenius S, Samali A.** 2001. HSP27 inhibits cytochrome c-mediated caspase activation by sequestering both pro-caspase-3 and cytochrome c. *Gene Expr* 9: 195-201
- Concannon CG, Gorman AM, Samali A.** 2003. On the role of HSP27 in regulating apoptosis. *Apoptosis* 8: 61-70

- Cuesta R, Laroia G, Schneider RJ.** 2000. Chaperone HSP27 inhibits translation during heat shock by binding eIF4G and facilitating dissociation of cap-initiation complexes. *Genes Dev* 14: 1460-70
- Cunningham AL, Noble JR.** 1989. Role of keratinocytes in human recurrent herpetic lesions: ability to present herpes simplex virus antigen and act as a target for T lymphocyte cytotoxicity in vitro. *J Clin Invest* 83: 490-6
- Curry AJ, Porting I, Goodall JC et al.** 2000. T lymphocyte lines isolated from atheromatous plaque contain cells capable of responding to Chlamydia antigens. *Clin Exp Immunol.* 121: 261-269
- Curry JL, Qin JZ, Bonish B et al.** 2003. Innate immune-related receptors in normal and psoriatic skin. *Arch Pathol Lab Med* 127: 178-86
- Da Costa CU, Wantia N, Kirschning CJ et al.** 2004. Heat shock protein 60 from *Chlamydia pneumoniae* elicits an unusual set of inflammatory responses via Toll-like receptor 2 and 4 in vivo. *Eur J Immunol* 34: 2874-2884
- De Bueger M, Bakker A, Goulmy E.** 1993. Human keratinocytes activated prime major and minor histocompatibility antigen specific Th cells in vitro. *Transpl Immunol* 1: 52-9
- Delneste Y, Magistrelli G, Gauchat JF et al.** 2002. Involvement of LOX-1 in dendritic cell-mediated antigen cross-presentation. *Immunity* 17: 353-362.
- DeMeester SL, Buchman TG, Cobb JP.** 2001. The heat shock paradox: does NF- κ B determine cell fate? *FASEB* 15: 270-4
- Denfeld RW, Hollenbaugh D, Fehrenbach A et al.** 1996. CD40 is functionally expressed on human keratinocytes. *Eur J Immunol* 26: 2329-34
- De Panfilis G, Manara GC, Ferrari C et al.** 1992. Adhesion molecules on the plasma membrane of epidermal cells. IV. Immunolocalization of the intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1, CD54) on the cell surface of a small subpopulation of keratinocytes freshly isolated from normal human epidermis. *Reg Immunol* 4:119-29
- Dustin ML, Singer KH, Tuck DT et al.** 1988. Adhesion of T lymphoblast to epidermal keratinocytes is regulated by interferon γ and is mediated by intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1). *J Exp Med* 167: 1323-40
- Ding XZ, FernandezPrada CM, Bhattacharjee AK et al.** 2001. Over-expression of hsp-70 inhibits bacterial lipopolysaccharid induced production of cytokines in human monocyte-derived macrophages. *Cytokine.* 16: 210-9
- Dustin MI, Olive D, Springer TA.** 1989. Correlation of CD2 binding and functional properties of multimeric and monomeric lymphocyte function associated antigen-3. *J Exp Med* 169: 503-17
- Dybdahl B, Wahba A, Lien E et al.** 2002. In amatory response after open heart surgery : release of heat-shock protein 70 and signalling through Toll-like receptor-4. *Circulation* 105: 685-90
- Enari M, Sakahira H, Yokoyama H et al.** 1998 A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD. *Nature* 391: 43-50
- Engel K, Ahlers A, Brach MA et al.** 1995. MAPKAP Kinase 2 is activated by heat shock and TNF- α : in vivo phosphorylation of small heat shock protein results from stimulation of the MAP Kinase cascade. *J Cell Biochem* 57: 321-30
- Ethridge RT, Ehlers RA, Hellmich MR et al.** 2000. Acute pancreatitis results in induction of heat shock proteins 70 and 27 and heat shock factor-1. *Pancreas.* 21:248-56
- Fan L, Busser BW, Lifsted TQ et al.** 2003. Antigen presentation by keratinocytes directs autoimmune skin disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 100: 3386-91
- Fajac I, Roisman GL, Lacronique J et al.** 1997. Bronchial $\gamma\delta$ T-lymphocytes and expression of heat shock proteins in mild asthma. *Eur Respir J* 10: 633-8
- Fehrenbach E, Northoff H.** 2001. Free radicals, exercise, apoptosis, and heat shock proteins. *Exerc Immunol Rev* 7:66-89

- Feige U, van Eden W.** 1996. Infection, autoimmunity and autoimmune diseases. *EXS* 77: 359-73
- Fleming TE, Mirando WS, Trefzer U et al.** 1993. In situ expression of a B7-like adhesion molecule on keratinocytes from human epidermis. *Invest Dermatol* 101: 754-58
- Flohé SB, Brüggemann J, Lendemans et al.** 2003. Human heat shock protein 60 induces maturation of dendritic cells versus a Th1-promoting phenotype. *J Immunol* 170: 2340-8
- Fokken N, Kapp A, Werfel T et al.** 2003. Atopiker und Nicht-Atopiker unterscheiden sich in ihrer Antwort auf immunmodulierende Effekte von Hitzeschockproteinen. *Allergo J* 12: 55
- Fracella F, Rensing L.** 1995. Stressproteine: Ihre wachsende Bedeutung in der Medizin. *Naturwissenschaften* 82: 303-9
- Freedman AS, Freeman GJ, Rhyhart K et al.** 1991. Selective induction of B7/BB-1 on interferon-gamma stimulated monocytes: a potential mechanism for amplification of T cell activation through the CD28 pathway. *Cell Immunol* 137: 429-37
- Fuller BW, Nishimura T, Noelle RJ.** 2002. The selective triggering of CD40 on keratinocytes *in vivo* enhances cell-mediated immunity. *Eur J Immunol* 32: 895-902
- Gao B, Tsan MF.** 2003. Endotoxin contamination in recombinant human HSP70 preparation is responsible for the induction of TNF- α release by murine macrophages. *J Biol Chem* 278: 174-9
- Gao B, Tsan MF.** 2003. Recombinant heat shock protein 60 does not induce the release of tumor necrosis factor α from murine macrophages. *J Biol Chem* 278: 22523-9
- Garioch JJ, Mackie RM, Campbell I et al.** 1991. Keratinocyte expression of intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) correlated with infiltration of lymphocyte function associated antigen 1 (LFA-1) positive cells in evolving allergic contact dermatitis reactions. *Histopathology* 19: 351-4
- Garrido C, Bruey JM, Fromentin A et al.** 1999. HSP27 inhibits cytochrome c- dependent activation of procaspase-9. *FASEB J* 13: 2061-2070
- Gaspari AA, Jenkins MK, Katz SI.** 1988. Class II MHC-bearing keratinocytes induce antigen-specific unresponsiveness in hapten-specific Th1 clones. *J Immunol* 141: 2216-20
- Gaspari AA, Sempowski GD, Chess P et al.** 1996. Human epidermal keratinocytes are induced to secrete interleukin-6 stimulate T lymphocyte proliferation by a CD40-dependent mechanism. *Eur J Immunol* 26: 1371-7
- Georgopoulos C, Welch WJ.** 1993. Role of the major heat shock proteins as molecular chaperons. *Annu Rev Cell Bio.* 9: 601-34
- Ghosh S, May MJ, Kropp EB.** 1998. NF-kappa B and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune response. *Annu Rev Immunol* 16: 225-60
- Gimmi CD, Freeman GJ, Gribben JG et al.** 1991. B-cell surface antigen B7 provides a costimulatory signal that induces T cell to proliferate and secrete interleukin-2. *Proc Natl Acad Sci USA* 88: 6575-9
- Goodman RE, Nestle F, Naidu YM et al.** 1994. Keratinocyte derived T cell Kostimulation induces preferential production of IL-2 and IL-4 but not IFN γ . *J Immunol* 152: 5189-98
- Gonzales-Gay MJ, Nabozny GH, Bull MJ et al.** 1994. Protective role of major histocompatibility complex class II Ebd transgene on collagen induced arthritis. *J Exp Med* 180: 1559-64
- Green DR, Reed JC.** 1998. Mitochondria and apoptosis. *Science* 281: 1309-1312
- Grewal IS, Xu J, Flavell RA.** 1995. Impairment of antigen-specific T-cell priming in mice lacking CD40 ligand. *Nature* 378: 617-20
- Grewe M, Bruijnzeel-Koomen CA, Schopf E et al.** 1998. A role for Th1 and Th2 cells in the immunopathogenesis of atopic dermatitis. *Immunol Today* 19: 359
- Griffith CEM, Esmann J, Fisher GJ et al.** 1990. Differential modulation of keratinocyte intercellular adhesion molecule-1 expression by gamma interferon and phorbol ester: evidence for involvement of protein kinase C signal transduction. *Br J Dermatol* 122: 333-42
- Gross C, Hansch D, Gastpar R et al.** 2003. Interaction of heat shock protein 70 peptide with NK cells involves the NK receptor CD94. *Biol Chem* 384: 267-79

- Grousson J, Concha M, Schmitt D et al.** 1998. Effects of CD40 ligation on human keratinocyte accessory function. *Arch Dermatol Res* 290: 325-30
- Guay J, Lambert H, Gingras-Breton G et al.** 1997. Regulation of actin filament dynamics by p38 map kinase-mediated phosphorylation of heat shock protein 27. *J Cell Sci* 110: 357-368
- Haug M, Dannecker L, Schepp CP et al.** 2005. The heat shock protein hsp70 enhances antigen-specific proliferation of human CD4+ memory cells. *Eur J Immunol* 35: 1-10
- Hartley MG, Green M, Choules G et al.** 2004. Protection afforded by heat shock protein 60 from *Francisella tularensis* is due to copurified lipopolysaccharide. *Infect Immun* 72: 4109-13
- Hengartner MO.** 2000. The biochemistry of apoptosis. *Nature* 407: 770-76
- Höllander GA, Castigli E, Kulbacki R et al.** 1996. Induction of alloantigen-specific tolerance by B cells from CD40-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 4994-8
- Hoshino K, Takeuchi O, Kawai T et al.** 1999. Cutting edge: Toll-like receptor 4 (TLR4)-deficient mice are hyporesponsive to lipopolysaccharide: evidence for TLR4 as the LPS gene or product. *J Immunol* 162: 3749-3752
- Huot J, Lambert H, Lavoie JN et al.** 1995. Characterization of 45-kDa/54-kDa Hsp27 kinase, a stress-sensitive kinase which may activate the phosphorylation-dependent protective function of mammalian 27-kDa heat shock protein Hsp27. *Eur J Biochem* 227: 416-427
- Jackson LA, Campbell LA, Kuo CC et al.** 1997. Isolation of Chlamydia pneumoniae from a carotid endarterectomy specimen. *J Infect Dis.* 176: 292-295
- Jacquier-Sarlin MR, Fuller K, Dinh-Xuan AT et al.** 1994. Protective effects of HSP70 in inflammation. *Experientia* 50: 1031-8
- Jacquier-Sarlin MR, Jornot L, Polla BS.** 1995. Differential expression and regulation of HSP70 and hsp 90 by phorbol esters and heat shock. *J Biol Chem* 270: 14094-9
- Jakob U, Gaestel M, Engel K et al.** 1993. Small heat shock proteins are molecular chaperones. *J Biol Chem* 268: 1517-1520
- Janeway CA.** 1999. Lipoproteins take their toll on the host. *Curr Biol* 9: 879-882
- June CH, Ledbetter JA, Linsley PS et al.** 1990. Role of the CD28 receptor in T cell activation. *Immunol Today* 11: 211-6
- Kampinga HH, Brunsting JF, Stege GJ et al.** 1994. Cells overexpressing HSP27 show accelerated recovery from heat-induced nuclear protein aggregation. *Biochem Biophys Res Commun* 204: 1170-7
- Kang HK, Lee HY, Jo EJ et al.** 2004. Toxoplasma gondii-derived heat shock protein 70 stimulates the maturation of human monocyte-derived dendritic cells. *Biochem Biophys Res Commun* 322: 899-904
- Karp CL, Wysocka M, Ma X et al.** 1998. Potent suppression of IL-12 production from monocytes and dendritic cells during endotoxin tolerance. *Eur J Immunol.* 28: 3128-36
- Kennedy MK, Mohler KM, Shanebeck KD et al.** 1994. Induction of B cell costimulatory function recombinant murine CD40 ligand. *Eur J Immunol* 24: 116-23
- Kerr LA, Navsaria HA, Barker JN et al.** 1990. Interferon gamma activates co-ordinate transcription of HLA-DR, DQ and DP genes in cultured keratinocytes and require de novo protein synthesis. *J Invest Dermatol* 95: 653-6
- Kiehl P, Kapp A.** 1998. Tissue eosinophilia and local deposition of eosinophil-specific granule proteins. Regulation and significance for inflammatory response in atopic dermatitis and other inflammatory dermatoses. *Hautarzt* 49: 176
- Kishimoto TK, Larson RS, Corbi AL et al.** 1989. The leukocyte integrins. *Adv Immunol* 46: 149-82
- Kohn G, Wong HR, Bshesh K et al.** 2002 Heat shock inhibits tnf-induced ICAM-1 expression in human endothelial cells via I kappa kinase inhibition. *Shock.* 17: 91-7

- Kol A, Sukhova GK, Lichtman AH et al.** 1998. Chlamydial heat shock protein 60 localizes in human atheroma and regulates macrophage tumor necrosis factor- α and matrix metalloproteinase expression. *Circulation* 98: 300-307
- Kol A, Lichtman AH, Finberg RW et al.** 2000. Cutting edge: heat shock protein (hsp) 60 activates the innate immune response: CD14 is an essential receptor for hsp60 activation of mononuclear cells. *J Immunol* 164: 13-17
- Kopp EB, Medzhitov R.** 1999. The toll-receptor family and control of innate immunity. *Curr Opin Immunol* 11: 13-18
- Kothakota S, Azuma T, Reinhard C et al.** 1997. Caspase-3-generated fragment of gelsolin: effector of morphological change in apoptosis. *Science* 278: 294-8
- Kremer IB, Hilkens CM, Sylva-Steenland RM et al.** 1996. Reduced IL-12 production by monocytes upon ultraviolet-B irradiation selectively limits activation of T helper-1 cells. *J Immunol* 157: 1913-1918
- Krueger JG, Krane JF, Carter M et al.** 1990. Role of growth factors, cytokines and their receptors in the pathogenesis of Psoriasis. *J Invest Dermatol* 94: 135-140
- Kuo CC, Shor A, Campbell LA et al.** 1993. Demonstration of Chlamydia pneumoniae in atherosclerotic lesions of coronary arteries. *J Infect Dis.* 167: 841-849
- Lang A, Dohle F, Terstesse M et al.** 2002. Down-regulation of monocyte apoptosis by phagocytosis of platelets: Involvement of a caspase-9, caspase-3, and heat shock protein 70-dependent pathway. *Journal of Immunology* 168: 6152-8
- Laning JC, Isaacs CM, Hardin-Young J.** 1997. Normal human keratinocytes inhibit the proliferation of unprimed T cells by TGF β and PGE $_2$, but not IL-10. *Cell Immunol* 175: 16-24
- La Sala A, Corinti S, Federici M et al.** 2000. Ligand activation of nerve growth factor receptor TrkA protects monocytes from apoptosis. *J Leucocyte Bio* 68: 104-110.
- Lavoie JN, Hickey E, Weber LA et al.** 1993. Modulation of actin microfilament dynamics and fluid phase pinocytosis by phosphorylation of heat shock protein 27. *J Biol Chem* 268: 24210-24214
- Li GC, Hahn GM.** 1980. A proposed operational model of thermotolerance based on effects of nutrients and initial treatment temperature. *Cancer Res.* 40: 4501-8
- Li GC, Werb Z.** 1982. Correlation between synthesis of heat shock proteins and development of thermotolerance in Chinese hamster fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci USA* 79: 3218-22
- Li P, Nijhawan D, Budihardjo I et al.** 1997 Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell* 91: 479-89
- Lidington EA, McCormack AM, Yacoub MH et al.** 1998. The effects of monocytes on transendothelial migration of lymphocytes. *Immunology* 94: 221-7
- Lindquist S, Craig EA.** 1988. The heat-shock proteins. *Annu Rev Genet* 22: 631-677
- Linington C.** 1995. Heat shock proteins and the immunopathogenesis of multiple sclerosis. *Neuropathol Appl Neurobiol* 21: 483-6
- Linsley PS, Clark EA, Ledbetter JA.** 1990. The T-cell antigen, CD28, mediates adhesion with B cells by interacting with the activation antigen B7/BB-1. *Proc Natl Acad Sci USA* 87: 5031-35
- Linsley PS, Brady W, Grosmaire L et al.** 1991a. Binding of the B cell activation antigen B7 to CD28 costimulates T cell proliferation and interleukin-2 accumulation. *J Exp Med* 173: 721-30
- Linsley PS, Brady W, Urnes M et al.** 1991b. CTLA-4 is a second receptor for the B cell activation antigen B7/BB-1. *J Exp Med* 174: 561-9
- Liu Y, Jones Y, Aruffo A et al.** 1992. Heat-stable antigen is a costimulatory molecule for CD4 T cell growth. *J Exp Med* 175: 437-445.
- Liu X, Kim CN, Yang J et al.** 1996. Induction of apoptotic program in cell-free extracts: Requirement for dATP and cytochrome c. *Cell* 86: 147-157
- Liu X, Zou H, Slaughter C et al.** 1997. DFF, a heterodimeric protein that functions downstreams of caspase-3 to trigger DNA fragmentation during apoptosis. *Cell* 89: 175-184

- Lonati A, Mommaas MA, Pasolini G et al.** 1996. Keratinocytes resident in normal human skin constitutively express, at low levels, the intracellular adhesion molecule-1. An in situ immunoelectronmicroscopy study. *Br J Dermatol* 135: 32-5
- Lorenzo HK, Susin SA, Penniger J et al.** 1999. Apoptosis inducing factor (AIF): A phylogenetically old, caspase-independent effector of cell death. *Cell Death Differ* 6: 516-524
- MacAry PA, Javid B, Floto RA et al.** 2004. HSP70 Peptide binding mutants separate antigen delivery from dendritic cell stimulation. *Immunity* 20: 95-106
- Malago JJ, Koninkx JF, van Dijk JE.** 2002. The heat shock response and cytoprotection of intestinal epithelium. *Cell Stress Chaperons* 7: 191-9
- Malhorta V, Wong HR.** 2002. Interactions between the heat shock response and the nuclear factor-kappa B signaling pathway. *Crit Care Med* 30: 89-95
- Marlin SD, Springer TA.** 1987. Purified intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) is a ligand for lymphocyte function-associated antigen 1 (LFA-1). *Cell* 51: 813-9
- Martin CA, Carsons SE, Kowalewski R et al.** 2003. Aberrant extracellular and dendritic cell (dc) surface expression of heat shock protein (hsp)70 in the rheumatoid joint: possible mechanisms of hsp/dc-mediated cross-priming. *J Immunol* 171: 5736-42
- Matzinger P.** 1998. An innate sense of danger. *Semin Immunol* 10: 399-415
- Medzhitov R, Preston-Hurlburt P, Janeway CA.** 1997. A human homologue of Drosophila Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature* 388: 394-97
- Mehlen P, Preville X, Chareyron P et al.** 1995. Constitutive expression of human HSP27, Drosophila HSP27, or human alpha B-crystallin confers resistance to TNF- and oxidative stress-induced cytotoxicity in stably transfected murine L929 fibroblasts. *J Immunol* 154: 363-374
- Mehlen P, Kretz-Remy C, Preville X et al.** 1996. Human HSP27, Drosophila HSP27, or human alpha B-crystallin expression-mediated increase in glutathione is essential for the protective activity of these proteins against TNFalpha-induced cell death. *EMBO J* 15: 2695-2706
- Middleton MH, Norris DA.** 1995. Cytokine-induced ICAM-1 expression in human keratinocytes is highly variable in keratinocyte strains from different donors. *J Invest Dermatol* 104: 489-96.
- Milani B, Noessner E, Ghose S et al.** 2002. Heat shock protein 70: role in antigen presentation and immune stimulation. *Int J Hyperthermia* 18: 563-75
- Millar DG, Garza KM, Odermatt B et al.** 2003. HSP70 promotes antigen-presenting cell function and converts T-cell tolerance to autoimmunity in vivo. *Nat Med* 9: 1469-76
- Minota S, Cameron B, Welch WJ et al.** 1988. Autoantibodies to the constitutive 73-kD member of the hsp70 family to heat shock proteins in systemic lupus erythematosus. *J Exp Med* 168: 1475-80.
- Minowada G, Welch WJ.** 1995. Clinical implications of the stress response. *J Clin Invest* 95: 3-12
- Miyake K.** 2003. Innate recognition of lipopolysaccharide by CD14 and toll-like receptor 4-MD-2: unique roles for MD-2. *Int Immunopharmacol* 3:119-28
- Mohamadzadeh M, Muller M, Hultsch T et al.** 1994. Enhanced expression of IL-8 in normal human keratinocytes and human keratinocyte cell line HaCaT in vitro after stimulation with contact sensitizers, tolerogens and irritants. *Exp Dermatol* 3: 298-303
- Morimoto RI.** 1993. Cells in stress: transcriptional activation of heat shock gens. *Science* 259:1409-10
- Morimoto RI, Kline MP, Bimstone DN et al.** 1997. The heat-shock response: regulation and function of heat-shock proteins and molecular chaperons. *Essays Biochem* 32: 17-29
- Morimoto RI, Santoro MG.** 1998. Stress-inducible responses and heat shock proteins: new pharmacologic targets for cytoprotection. *Nat Biotechnol* 16: 833-8
- Moroi Y, Mayhew M, Trcka J et al.** 2000. Induction of cellular immunity by immunization with novel hybrid peptides complexes to heat shock protein 70. *Proc Natl Acad Sci USA* 97: 3485-90

- Mueller DL, Jenkins MK, Schwarz RH.** 1989. Clonal expansion versus functional clonal inactivation: a costimulatory signalling pathway determines the outcome of T-cell antigen receptor occupancy. *Annu Rev Immunol* 7: 445-80
- Multhoff G.** 2002. Activation of natural killer cells by heat shock protein 70. *Int J Hyperthermia* 18: 576-85
- Mutis T, De Bueger M, Bakker A et al.** 1993. HLA class II+ human keratinocytes present Mycobacterium leprae antigens to CD4+ Th1-like cells. *Scan J Immunol* 37: 43-51
- Nagata S.** 2000. Apoptotic DNA fragmentation. *Exp Cell Res* 256: 12-18
- Nakano Y.** 1998. Antigen presenting cell function of epidermal cells activated by hapten application. *Br J Dermatol* 138: 786
- Nasir A, Ferbel B, Gaspari AA.** 1995. Human keratinocytes regulate their expression of B7/BB-1 antigen by a unique, calcium-dependent mechanisms. *J Invest Dermatol* 104: 763-67
- Neuhaus-Steinmetz U, Rensing L.** 1997. Heat shock protein induction by certain chemical stressors is correlated with their cytotoxicity, lipophilicity and protein-denaturing capacity. *Toxicology*. 123: 185-95
- Nickoloff BJ.** 1988. Role of interferon- γ in cutaneous trafficking of lymphocytes with emphasis on molecular and cellular adhesion events. *Arch Dermatol* 124: 1836-43
- Nickoloff BJ, Mitra RS, Grenn J et al.** 1993a. Accessory cell function of keratinocytes for superantigens. *J Immunol* 150: 2148-59
- Nickoloff BJ, Mitra RS, Lee K et al.** 1993b. Discordant expression of CD28 ligands, BB-1, and B7 on keratinocytes in vitro and psoriatic cells in vivo. *Am J Pathol* 142: 1029-40
- Nickoloff BJ, Turka LA.** 1994. Immunological functions of non-professional antigen-presenting cells: new insights from studies of T-cell interactions with keratinocytes. *Immunol Today* 15: 464-9
- Noelle RJ, Ledbetter JA, Aruffo A.** 1992. CD40 and its ligand, an essential ligand-receptor pair for thymus-dependent B-cell activation. *Immunol Today* 12: 431-3
- Ohashi K, Burkhart V, Flohe S et al.** 2000. Cutting edge: heat shock protein 60 is a putative endogenous ligand of toll-like receptor-4 complex. *J Immunol* 164: 558-61
- Pandey P, Saleh A, Nakazawa A et al.** 2000a. Negative regulation of cytochrome c-mediated oligomerization of Apaf-1 and activation of procaspase-9 by heat shock protein 90. *EMBO J* 2: 4310-4322
- Pandey P, Farber R, Nakazawa A et al.** 2000b. HSP27 functions as a negative regulator of cytochrome c-dependent activation of procaspase-3. *Oncogen* 19: 1975-1981
- Parsell DA, Lindquist S.** 1993. The function of heat shock proteins in stress tolerance: Degradation and reactivation of damaged proteins. *Annu Rev Genet* 27: 437-496
- Pastore S, Fanales-Belasio E, Albanesi C et al.** 1997. Granulocyte macrophage colony-stimulating factor is overproduced by keratinocytes in atopic dermatitis. Implications for sustained dendritic cell activation in the skin. *J Clin Invest* 99: 3009-17
- Péguet-Navarro J, Dalbiez-Gauthier C, Rattis FM et al.** 1995. Functional expression of CD40 antigen on human epidermal Langerhans cells. *J Immunol* 155: 4241-7
- Péguet-Navarro J, Dalbiez-Gauthier C, Moulon C et al.** 1997. CD40 ligation of human keratinocytes inhibits their proliferation and induces their differentiation. *J Immunol* 158: 144-152
- Plumier J-CL, Ross BM, Currie RW et al.** 1995. Transgenic mice expressing the human heat shock protein 70 have improved post-ischemic myocardial recovery. *J Clin Invest* 95: 1854-60
- Pockley AG, Shepherd J, Corton JM.** 1998. Detection of heat shock protein 70 (hsp70) and anti-HSP70 antibodies in the serum of normal individuals. *Immunol Invest* 27: 367-77
- Pockley AG.** 2002. Heat shock proteins, inflammation, and cardiovascular disease. *Circulation* 105: 1012-7
- Polla BS.** 1990. Heat (shock) and the skin. *Dermatologica*. 180: 113-7

- Polla BS, Bachelet M, Dall'ava J et al.** 1998. Heat shock proteins in inflammation and asthma: Dr Jekyll or Mr Hyde? *Clin Exp Allergy* 28: 527-9
- Poltorak A, He X, Smirnova I et al.** 1998. Defective LPS signalling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene. *Science* 282: 2085-2088
- Purwar R, Werfel T, Wittmann M.** 2006. IL-13-stimulated human keratinocytes preferentially attract CD4⁺CCR4⁺ T cells: Possible role in atopic dermatitis. *J Invest Dermatol* 126: 1043-51
- Ranheim EA, Kipps TJ.** 1993. Tumor necrosis factor-alpha facilitates induction of CD80 (B7-1) and CD54 on human B-cells by activated T-cells: complex regulation by IL-4, IL-10 and CD40L. *Cell Immunol* 161: 226-35
- Rao L, Perez D, White E.** 1996. Lamin proteolysis facilitates nuclear events during apoptosis. *J Cell Biol* 135: 1441-1455
- Reed RC, Berwin B, Baker JP et al.** 2003. GRP94/gp96 elicits ERK activation in murine macrophages: a role for endotoxin contamination in NFκB activation and nitric oxide production. *J Biol Chem* 278: 31853-60
- Retzlaff C, Yamaoto Y, Hoffman PS et al.** 1994. Bacterial heat shock proteins directly induce cytokine mRNA and interleukin-1 secretion in macrophage cultures. *Infect Immun* 62: 5689-93
- Retzlaff C, Yamaoto Y, Okubo S et al.** 1996. Legionella pneumophila heat-shock protein-induced increase of interleukin-1β mRNA involves protein kinase C signalling in macrophages. *Immunology* 89: 281-8
- Robert J, Gantress J, Rau L et al.** 2002. Minor histocompatibility antigen-specific MHC-restricted CD8⁺ T cell response elicited by heat shock proteins. *J Immunol* 168: 1697-703
- Rock FL, Hardiman G, Timans JC et al.** 1998. A family of human receptors structurally related to Drosophila toll. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 588-93
- Rossi A, Elia G, Santoro MG.** 1998. Activation of the heat shock factor 1 by serin protease inhibitors. An effect associated with nuclear factor kappaB inhibition. *J Biol Chem* 273: 1644-6
- Ritossa F.** 1962. A new puffing pattern induced by temperature shock and DNP in Drosophila. *Experientia* 18: 571-3
- Sakahira H, Enari M, Nagata S.** 1998. Cleavage of CAD inhibitor in CAD activation and DNA degradation during apoptosis. *Nature* 391: 96-99
- Saleh A, Srinivasula SM, Balkir L et al.** 2000. Negative regulation of the Apaf-1 apoptosome by HSP70. *Nat Cell Biol* 2: 476-483
- Samali A, Gorman AM, Cotter TG.** 1996. Apoptosis- The story so far... *Experientia* 52: 933-941
- Samali A, Orrenius S.** 1998. Heat shock proteins: Regulators of stress response and apoptosis. *Cell Stress and Chaperons* 3: 228-236
- Samali A, Cai J, Zhivotovsky B et al.** 1999. Presence of a pre-apoptotic complex of pro-caspase-3, Hsp 60 and Hsp 10 in the mitochondrial fraction of jurkat cells. *EMBO J* 18: 2040-8
- Samali A, Robertson JD, Peterson E et al.** 2001. HSP27 protects mitochondria of thermotolerant cells against apoptotic stimuli. *Cell Stress and Chaperons* 6: 49-58
- Sargent CA, Dunham I, Trowsdale J et al.** 1989. Human major histocompatibility complex contains genes for the major heat shock protein hsp70. *Proc Natl Acad Sci USA* 86: 1968
- Schmidt M, Pauels HG, Lügering N et al.** 1999. Glucocorticoids induce apoptosis in human monocytes: potential role of IL-1β. *J Immunol* 163: 3484-90
- Schmidt M, Lügering N, Lügering A et al.** 2001. Role of the CD95/CD96 ligand system in glucocorticoid-induced monocyte apoptosis. *J Immunol* 166: 1344-51
- Schroder M, Kaufman RJ.** 2005. ER stress and the unfolded protein response. *Mutat Res.* 569:29-63
- Schwarz T.** 1996. Production of interleukin-12 by keratinocytes and its role in contact hypersensitivity. *Ann NY Acad Sci* 795: 82-7

- Schwarz A, Stander S, Berneburg M et al.** 2002. Interleukin-12 suppresses ultraviolet radiation-induced apoptosis by inducing DNA repair. *Nat Cell Bio* 4: 26-31
- Sicherer SH, Leung DY.** 2004. Advances in allergic skin disease, anaphylaxis, and hypersensitivity reactions to foods, drugs, and insect stings. *J Allergy Clin Immunol* 114: 118-24
- Simmons DL.** 1995. The role of ICAM expression in immunity and disease. *Cancer Surv* 24: 141-55
- Simon JC, Dietrich D, Mielke V et al.** 1994. Expression of the B7/BB1 activation antigen and its ligand CD28 in T-cell-mediated skin diseases: *J Invest Dermatol* 103: 539-43
- Soldatenkov VA, Dritschilo A.** 1997. Apoptosis of Ewing's sarcoma cells is accompanied by accumulation of ubiquitinated proteins. *Cancer Res* 57: 3881-85
- Somersan S, Larsson M, Fonteneau JF et al.** 2001. Primacy tumor tissue lysates are enriched in heat shock proteins and induce the maturation of human dendritic cells. *J Immunol* 167: 4844-52
- Srivastava PK, Udono H, Blachere NE et al.** 1994. Heat shock proteins transfer peptides during antigen processing and CTL Priming. *Immunogenetics* 39: 93
- Srivastava PK.** 2002. Roles of heat-shock proteins in innate and adaptive immunity. *Nat Rev Immunol* 2: 185-94
- Srivastava PK.** 2002 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.
- Stebbing J, Gazzard B, Portsmouth S et al.** 2003. Disease-associated dendritic cells respond to disease-specific antigens through the common heat shock receptor. *Blood* 102: 1806-14
- Stebbing J, Savage P, Patterson S et al.** 2004. All for CD91 and CD91 for all. *J Antimicrobial Chemotherapy* 53: 1-3
- Stokoe D, Engel K, Campbell DG et al.** 1992. Identification of MAPKAP kinase 2 as a major enzyme responsible for the phosphorylation of the small mammalian heat shock proteins. *FEBS Lett* 313: 307-313
- Strange P, Cooper KD, Hansen ER et al.** 1993. T-lymphocyte clones initiated from lesional psoriatic skin release growth factors that induce keratinocyte proliferation. *J Invest Dermatol* 101: 659-700
- Strange P, Skov L, Baadsgaard O.** 1994. Interferon gamma-treated keratinocytes activate T cells in the presence of superantigens: involvement of major histocompatibility complex class II molecules. *J Invest Dermatol* 102:150-4
- Stroh C, Schulze-Osthoff K.** 1998. Death by a thousand cuts: An ever increasing list of caspase substrates. *Cell Death Differ* 5: 997-1000
- Suto R, Srivastava PK.** 1995. A mechanism for the specific immunogenicity of heat shock protein-chaperoned peptides. *Science* 269: 1585-8
- Thériault JR, Mambula SS, Sawamura T et al.** 2005. Extracellular hsp70 binding to surface receptors present on antigen presenting cells and endothelial/epithelial cells. *FEBS Letters* 579: 1951-1960.
- Thompson CB, Lindsten T, Ledbetter JA et al.** 1989. CD28 activation pathway regulates the production of multiple T-cell-derived lymphokines/cytokines. *Proc Natl Acad Sci USA* 86: 1333-7
- Thornberry NA, Lazebnik Y.** 1998. Caspase: Enemies within. *Science* 281: 1312-6
- Turner M, Ramoner R, Gastl G et al.** 1997. Bacillus-Calmette-Guerin mycobacteria stimulate human blood dendritic cells. *Int J Can* 70: 128-34
- Tissières A, Mitchell HK, Tracy UM.** 1974. Protein synthesis in salivary glands of *Drosophila melanogaster*: Relation to chromosom puffs. *Journal of Molecular Biology.* 389-398
- Tobian AA, Canaday DH, Boom WH et al.** 2004. Bacterial heat shock proteins promote CD91-dependent class I MHC cross-presentation of chaperoned peptide to CD8+ T cells by cytosolic mechanism in dendritic cells versus vacuolar mechanisms in macrophages. *J Immunol* 172: 5277-86

- Trautmann A, Akdis M, Kleeman D et al.** 2000. T cell-mediated Fas-induced keratinocyte apoptosis plays a key pathogenetic role in eczematous dermatitis. *J Clin Invest* 106: 25-35
- Trautmann A, Akdis M, Klunker S et al.** 2001. Role of apoptosis in atopic dermatitis. *Int Arch Allergy Immunol* 124: 230-2
- Trautmann A, Akdis M, Schmidt-Grendelmeier P et al.** 2001. Targeting keratinocyte apoptosis in the treatment of atopic dermatitis and allergic contact dermatitis. *J Allergy Clin Immunol* 108: 839-46
- Udono H, Srivastava PK.** 1993. Heat shock protein 70-associated peptides elicit specific cancer immunity. *J Exp Med* 178: 1391
- Udono H, Levey DL, Srivastava PK.** 1994. Cellular requirements for tumor-specific immunity elicited heat shock proteins: tumor rejection antigen gp96 primes CD8+ T cells in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 3077-81
- Ueda G, Tamura Y, Hirai I et al.** 2004. Tumor-derived heat shock protein 70-pulsed dendritic cells elicit tumor-specific cytotoxic T lymphocytes (CTLs) and tumor immunity. *Cancer Sci* 95: 248-53
- Vabulas RM, Ahmad-Nejad P, da Costa C et al.** 2001. Endozytosed hsp60 use toll-like receptor 2 (TLR2) and TLR4 to activate the toll/interleukin-1 receptor signalling pathway in innate immune cells. *J Bio Chem* 276 : 31332-9
- Vabulas RM, Ahmad-Nejad P, Ghose S et al.** 2002a. Hsp70 as endogenous stimulus of the toll/Interleukin-1 Receptor signal pathway. *J Bio Chem* 277: 15107-12
- Vabulas RM, Wagner H, Schild H.** 2002b. Heat shock proteins as ligands of toll-like receptors. *Curr Top Microbiol Immunol* 270: 169-84
- Vandenbergh P, Delabie J, de Boer M et al.** 1993. In situ expression of B7/BB1 on antigen-presenting cells and activated B cells : an immunohistochemical study. *Int J Immunol* 5: 317-21
- Van Eden I.** 2000. Stress Proteins as targets for anti-inflammatory therapies. *Drug Discov Today* 5:115-120
- Van Eden W.** 1991. Heat shock proteins as immunogenic bacterial antigens with potential to induce and regulate autoimmune arthritis. *Immunol Rev* 121: 5-28
- Van Eden W.** 1993. Possible role of bacterial heat shock proteins in autoimmune diseases. *Int J Zentralbl Bakteriologie* 278: 377-82
- Van Eden W, van der Zee MR, Paul AG et al.** 1998. Do heat shock proteins control the balance of T-cell regulation in inflammatory diseases? *Immunol Today* 19: 303-7
- Van Eden W, Wendling U, Paul L et al.** 2000. Arthritis protective regulatory potential of self-heat shock protein cross-reactive T cells. *Cell Stress Chaperons* 5 : 452-7
- Van Essen D, Kikutani H, Gray D.** 1995. CD40 ligand-transduced co-stimulation of T-cells in the development of helper function. *Nature* 378: 620-3
- Van Knooten C, Banchereau J.** 1996. CD40-CD40 ligand, a multifunctional receptor-ligand pair. *Adv Immunol* 6: 1-77.
- Van Noort JM.** 1996. Multiple sclerosis: an altered immune response or an altered stress response? *J Mol Med* 74: 285-96
- Van-Seventer GA, Shimizu Y, Hogan KJ et al.** 1990. The LFA-1 ligand ICAM-1 provides an important signal for T-cell receptor-mediated activation of resting T-cells. *J Immunol* 144: 4579-86.
- Vejlsgaard GL, Ralfkiaer E, Avnstorp C et al.** 1989. Kinetics and characterization of intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) expression on keratinocytes in various inflammatory skin lesions and malignant cutaneous lymphomas. *J Am Acad Dermatol* 20: 782-90
- Verhagen AM, Ekert PG, Pakusch M et al.** 2000. Identification of DIABOLO, a mammalian protein that promotes apoptosis by binding to and antagonizing IAB proteins. *Cell* 102: 43-53
- Wakem P, Gasperi AA.** 1999. Mechanisms of allergic and irritant contact dermatitis. In: Kydonieus AF, Wille JJ, eds. *Biochemical Modulation of Skin Reactions: Transdermal, Topicals, Cosmetics*. New York: CRC Press.

- Wakem P, Burns RP, Ramirez F et al.** 2000. Allergens and irritants transcriptionally upregulate CD80 gene expression in human keratinocytes. *J Invest Dermatol* 114: 1085-92
- Wallin RP, Lundqvist A, More SH et al.** 2002. Heat-shock proteins as activators of the innate immune system. *Trends Immunol* 23: 130-5.
- Wan T, Zhou X, Chen G et al.** 2004. Novel heat shock protein Hsp70L1 activates dendritic cells and acts as a Th1 polarizing adjuvant. *Blood* 103: 1747-54
- Wang X, Zou Y, Wang Y et al.** 2001. Differential regulation of interleukin-12 and interleukin-10 by heat shock response in murine peritoneal macrophages. *Biochem Biophys Res Commun* 287: 1041-1044
- Wang Y, Kelly CG, Singh M et al.** 2002. Stimulation of Th1-polarizing cytokines, C-C chemokines, maturation of dendritic cells, and adjuvant function by the peptid fragment of heat shock protein 70. *J Immunol* 169: 2422-9
- Wedi B, Raap U, Lewrick H et al.** 1998. IL-4-induced apoptosis in peripheral blood eosinophils. *Allergy Clin Immunol.* 102: 1013-20
- Wells AD, Rai SK, Salvato MS et al.** 1998. Hsp72-mediated augmentation of MHC class I surface expression and endogenous antigen presentation. *Int Immunol* 10: 609-17
- Wells AD, Malkovsky M.** 2000. Heat shock proteins, tumor immunogenicity and antigen presentation: an integrated view. *Immunol Today* 21: 129-32
- Wendling U, Bloemendal A, van der Zee R et al.** 1997. Antirheumatic E.coli extract OM-89 induces T cell responses to hsp 60 and 70. *Int J Immunopharmacol* 19: 565-8
- Werfel T, Morita A, Grewe M et al.** 1996. Allergen specificity of skin-infiltrating T cells is not restricted to a type-2 cytokine pattern in chronic skin lesions of atopic dermatitis. *J Invest Dermatol* 107: 871-6
- Werfel T, Kapp A.** 1998. Environmental and other major provocation factors in atopic dermatitis. *Allergy* 53: 731-9
- Werfel T, Reekers R, Busche M et al.** 1999. Evidence for a birch pollen specific coetaneous T-cell response in food-responsive atopic dermatitis. *Int Arch Allergol Immunol* 118: 230-1
- Wetzler LM, Ho Y, Reiser H.** 1996. Neisserial porins induce B lymphocytes to express costimulatory B7-2 molecules and to proliferate. *J Exp Med* 183: 1151-9
- Williams RS, Thomas JA, Fina A et al.** 1993. Human heat shock protein 70 (hsp70) protects murine cells from injury during metabolic stress. *J Clin Invest* 92: 503-8
- Williams IR, Kupper TS.** 1996. Immunity at the surface: Homeostatic mechanisms of the skin immune system. *Life Sci* 58: 1485-90
- Willis CM, Stephens CJ, Wilkinson JD.** 1991. Selective expression of immune-associated surface antigens by keratinocytes in irritant contact dermatitis. *J Invest Dermatol* 96: 505-11
- Wistokat-Wülfing A, Schmidt P, Darsow U et al.** 1999. Atopy patch test reactions are associated with T-lymphocyte mediated allergen-specific immune responses in atopic dermatitis. *Clin Exp Allergy* 29: 513-21
- Wittmann M, Larsson VA, Schmidt P et al.** 1999. Suppression of interleukin-12 production by human monocytes after preincubation with lipopolysaccharide. *Blood.* 94: 1717-26
- Wittmann M, Purwar R, Hartmann C et al.** 2005. Human keratinocytes respond to IL-18. Implication for the course of chronic inflammatory skin diseases. *J Invest Dermatol* 124: 1225-1233
- Wong HR, Ryan M, Wispe JR.** 1997 The heat shock response inhibits inducible nitric oxide synthase gene expression by blocking I kappa-B degradation and NF-kappa B nuclear translocation. *Biochem Biophys Res Commun* 231: 257-63
- Wright BH, Corton J, El-Nahas AM et al.** 2000. Elevated levels of circulating heat shock protein 70 (HSP70) in peripheral and renal vascular disease. *Heart Vessels.* 15: 18-22
- Wyllie AH.** 1980. Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation. *Nature* 284: 555-6

- Xu DZ, Lu Q, Swank GM et al.** 1996. Effect of heat shock and endotoxin stress on enterocyte viability apoptosis and function varies based on whether the cells are exposed to heat shock or endotoxin first. *Arch Surg* 131: 1222-8
- Yang X, Khosravi-Far R, Chang HY et al.** 1997. Daxx, a novel fas-binding protein that activates JNK and apoptosis. *Cell* 89: 1067-1076
- Yang RB, Mark MR, Gray A et al.** 1998. Toll-like receptor-2 mediates lipopolysaccharide-induced cellular signalling. *Nature* 395: 248-84
- Yawalkar N, Limat A, Brand CU et al.** 1996. Constitutive expression of both subunits of interleukin-12 in human keratinocytes. *J Invest Dermatol* 106: 80-3
- Yellon DM, Marber MS.** 1994. Hsp70 in myocardial ischemia. *Experientia* 50: 1075-84
- Yellin MJ, Winikoff S, Fortune SM et al.** 1995. Ligation of CD40 on fibroblasts induces CD54 (ICAM-1) and CD106 (VCAM-1) up-regulation and IL-6 production and proliferation. *J Leukoc Biol* 58: 209-16
- Young JW, Koulova L, Soergel SA et al.** 1992. The B7/BB-1 antigen provides one of several costimulatory signals for the activation of CD4+ T lymphocytes by human blood dendritic cells in vitro. *J Clin Invest* 90: 229-37
- Zhang G, Ghosh S.** 2001. Toll-like receptors mediated NF-kappa B activation: a phylogenetically conserved paradigm in innate immunity. *J Clin Invest* 107: 13-19
- Zou H, Li Y, Liu X et al.** 1999. An APAF-1 cytochrome c multimeric complex is a functional apoptosome that activates procaspase-9. *J Biol Chem* 274: 11549-56

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: IL-12 Induktion in Monozyten.....	47
Abbildung 2: Exemplarische Darstellung der IL-12-Expression.....	48
Abbildung 3: IL-12 Hemmung in Monozyten.....	49
Abbildung 4: Hemmung der IL-12 Expression in Monozyten.....	49
Abbildung 5: IL-12 Induktion durch HSP27 in Monozyten.	50
Abbildung 6: IL-12 Hemmung durch HSP27 in Monozyten.	50
Abbildung 7: Oberflächenexpression von MHC-Klasse-II auf Monozyten.....	52
Abbildung 8: Oberflächenexpression von CD54 auf Monozyten.	53
Abbildung 9: Oberflächenexpression von CD40 auf Monozyten.	53
Abbildung 10: CFSE Färbung bei PBMC.....	55
Abbildung 11: Vermehrte Proliferation von PBMCs unter HSP Stimulation.	55
Abbildung 12: Intrazelluläre HSP27-Färbung bei Monozyten 1.....	56
Abbildung 13: Intrazelluläre HSP27-Färbung bei Monozyten 2.....	57
Abbildung 14: Intrazelluläre HSP27-Färbung bei Monozyten 3.....	57
Abbildung 15: Quantitative Real-Time PCR der HSP27 Expression bei Monozyten.	58
Abbildung 16: Quantitative Real-Time PCR von HSP27 an Monozyten.....	58
Abbildung 17: Intrazelluläre HSP27-Färbung bei Keratinozyten 1.	59
Abbildung 18: HSP27-Expression in humanen Keratinozyten 2.....	60
Abbildung 19: Schutzfunktion von HSP27 auf Monozyten.	61
Abbildung 20: Schutzfunktion von HSP27 für Monozyten.	62
Abbildung 21: Einfluss von Steroiden auf das Sterbeverhalten von Monozyten.	63
Abbildung 22: Einfluss von UV-B Strahlen auf das Sterbeverhalten von Monozyten.....	63
Abbildung 23: Einfluss von IL-4 auf das Sterbeverhalten von Monozyten.....	64
Abbildung 24: Einfluss von IFN γ auf das Sterbeverhalten von Monozyten.	64
Abbildung 25: Schutzfunktion von HSP27 auf HaCat-Zellen.....	65
Abbildung 26: Schutzfunktion von HSP27 auf Keratinozyten.	66
Abbildung 27: Schutzfunktion von HSP27 bei Keratinozyten.	67

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: HSP70 extrazellulär in Hautproben.....	23
Tabelle 2: Verwendete Chemikalien und Reagenzien.....	42
Tabelle 3: Verwendete Zellkulturmedien.....	43
Tabelle 4: Verwendete Zytokine und Stimuli.....	43
Tabelle 5: Verwendete Antikörper.....	44
Tabelle 6: Verwendete Primer.....	44
Tabelle 7: Verwendete Geräte	45
Tabelle 8: Verwendete Kits	45

Lebenslauf

Ich wurde am 19.07.1978 als Sohn von Reinhard und Uta Wille in Oldenburg/Niedersachsen geboren. 1985 wurde ich in die Grundschule Staakenweg eingeschult. Nach der anschließenden Zeit auf der Orientierungsstufe Eversten von 1989-1991, besuchte ich das Gymnasium Eversten. Auf das Abitur im Jahre 1998 folgte die Zeit als Zivildienstleistender am Evangelischen Krankenhaus Oldenburg.

Hierauf folgte im Oktober 1999 der Beginn des Medizinstudiums in Hannover. Nach Ablegen der ärztlichen Vorprüfung im Herbst 2001 folgte im Herbst 2002 das Bestehen des ersten Staatsexamens. Ab Oktober 2002 forschte ich für meine Doktorarbeit an der Hautklinik Linden bei Frau Prof. Dr. med. Miriam Wittmann. Nach verschiedenen Famulaturen, unter anderem in Davos (Schweiz) und Prag (Tschechien), legte ich mein 2.Staatsexamen im März 2005 an Medizinischen Hochschule Hannover ab.

Zwischen Mai 2005 und April 2006 arbeitete ich im Rahmen des Praktischen Jahres in der Klinik für Pädiatrie des Inselspitals in Bern (Schweiz), in der Klinik für Innere Medizin der Medizinischen Hochschule Hannover und der Klinik für Chirurgie im Nordstadtkrankenhaus in Hannover. Im Juni 2006 folgte das Bestehen des 3. Staatsexamens und die Erteilung der Approbation als Arzt.

Seit dem 1.7.2006 bin ich als Assistenzarzt in der Klinik für Innere Medizin in Minden angestellt.

Erklärung nach § 2 Abs. 2 Nr. 5 und 6 PromO

Ich erkläre, dass ich die der Medizinische Hochschule Hannover zur Promotion eingereichte Dissertation mit dem Titel „Einfluss der Hitzeschockproteine 27 und 70 auf die Entzündungsreaktion der Haut“ in der Hautklinik Linden unter Betreuung von Frau Professorin Doktor med. Miriam Wittmann ohne sonstige Hilfe durchgeführt und bei der Abfassung der Dissertation keine anderen als die dort durchgeführten Hilfsmittel benutzt habe.

Ich habe diese Dissertation bisher an keiner in- oder ausländischen Hochschule zur Promotion eingereicht. Weiterhin versichere ich, dass ich den beantragten Titel bisher noch nicht erworben habe.

Hannover, den 10.7.2006