

Das Hsc/Hsp70 Co-Chaperon-  
Netzwerk kontrolliert die  
Antigenaggregation und -präsentation  
während der Immunzellreifung

Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.)

der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

vorgelegt von

Nadja Kettern

aus Wittlich

Bonn 2011

---

Angefertigt mit Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen  
Fakultät der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

1. Gutachter: Prof. Dr. Jörg Höfeld
2. Gutachter: Prof. Dr. Albert Haas

Tag der Promotion: 01.07.2011

Erscheinungsjahr: 2011

---

## Publikationen

Kettern, N., Rogon, C., Limmer, A. and Höhfeld, J. (2011). The Hsc/Hsp70 co-chaperone network controls antigen aggregation and presentation during maturation of professional antigen presenting cells. *PLoS One*, 6(1): e16398

Kettern, N., Dreiseidler, M., Tawo, R. and Höhfeld, J. (2010). Chaperone-assisted degradation: multiple paths to destruction. *Biol Chem*, 391(5): 481-489

## Poster und Vorträge

Kettern, N. and Höhfeld, J. (2009). Cooperation of molecular chaperones with the ubiquitin/proteasome system during antigen processing (Poster). SFB 704 Begutachtung, Bonn.

Kettern, N. and Höhfeld, J. (2009). Cooperation of molecular chaperones with the ubiquitin/proteasome system during antigen presentation (Poster). BFB (Bonner Forum Biomedizin) jährliches Meeting, Bad Breisig.

Kettern, N. and Höhfeld, J. (2007). Cooperation of molecular chaperones with the ubiquitin/proteasome system during antigen presentation (Vortrag). SFB 704 jährliches Meeting, Adenau.

Böhse, K., Arndt, V., Kettern, N., Esser, C. and Höhfeld, J. (2007). Extending the protein network at the folding/degradation interface using human proteome arrays (Poster). SFB 635 Begutachtung, Köln.

---

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>Einleitung</b>	<b>2</b>
2.1	Molekulare Chaperone in der Proteostase . . . . .	3
2.2	Co-Chaperone als Regulatoren der Chaperon-Aktivität . . . . .	5
2.2.1	Regulation der Substratfaltung durch Co-Chaperone . . . . .	6
2.2.2	<i>Chaperone-assisted proteasomal degradation (CAP)</i> . . . . .	6
2.2.3	<i>Chaperone-assisted selective autophagy (CASA)</i> . . . . .	8
2.3	Professionell Antigen-präsentierende Zellen . . . . .	10
2.3.1	Zelluläre Spezialisierung von APCs - Die Immunzellreifung . . . . .	11
2.3.2	Antigenpräsentation in professionellen APCs . . . . .	11
2.3.3	Die Rolle des Ubiquitin/Proteasom-Systems bei der Antigen- prozessierung . . . . .	13
2.3.4	<i>Dendritic Cell Aggresome-Like Induced Structures - DALIS</i> . . . . .	14
<b>3</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>17</b>
3.1	Material . . . . .	17
3.1.1	Chemikalien und Reagenzien . . . . .	17
3.1.2	Antikörper . . . . .	18
3.1.3	Plasmide . . . . .	19
3.1.4	Oligonukleotide . . . . .	20
3.2	Methoden im Umgang mit eukaryontischen Zellen . . . . .	21
3.2.1	RAW309 murine Makrophagen-Zelllinie . . . . .	21
3.2.2	Infektion von RAW309-Makrophagen mit Adenoviren . . . . .	22
3.2.3	Murine dendritische Zellen . . . . .	22
3.2.4	Murine T-Zellen aus Milzzellen . . . . .	25
3.3	Methoden im Umgang mit Mäusen . . . . .	26
3.3.1	<i>In-vivo</i> -Cytokintest . . . . .	26
3.4	Molekularbiologische Methoden . . . . .	27
3.4.1	Plasmidpräparation . . . . .	27
3.4.2	Bestimmung der Konzentration von Nukleinsäuren . . . . .	28
3.4.3	Verdau von DNA mittels Restriktionsendonukleasen . . . . .	28
3.4.4	DNA-Agarosegelelektrophorese . . . . .	28
3.4.5	Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen . . . . .	29
3.4.6	Ligation von DNA . . . . .	29
3.4.7	DNA-Sequenzanalyse . . . . .	29

3.5	Proteinbiochemische Techniken . . . . .	29
3.5.1	Herstellung von Proteinextrakten . . . . .	29
3.5.2	Bestimmung der Proteinkonzentration . . . . .	30
3.5.3	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) . . . . .	31
3.5.4	Färbung von Polyacrylamidgelen . . . . .	32
3.5.5	Western Blot . . . . .	32
3.5.6	<i>Filter trap</i> . . . . .	33
3.5.7	ELISA . . . . .	34
3.6	Zellbiologische Methoden . . . . .	34
3.6.1	Immunfärbung . . . . .	34
3.6.2	FACS . . . . .	35
<b>4</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>36</b>
4.1	Transiente Aggregation ubiquitinerter Proteine - DALIS . . . . .	36
4.2	Co-Chaperone der Hsc/Hsp70-Maschinerie und Komponenten der Abbauwege colokalisieren mit DALIS . . . . .	39
4.2.1	Virus-exprimierte Proteine colokalisieren mit DALIS . . . . .	39
4.3	Regulation der Hsc/Hsp70-Maschinerie während der Immunzellrei- fung . . . . .	41
4.4	Co-Chaperone regulieren die DALIS-Bildung . . . . .	43
4.4.1	CHIP und BAG-1 sind essentiell für die DALIS-Bildung . . . . .	46
4.4.2	HspBP1 kontrolliert die CHIP-Aktivität während der Aggregat- Bildung . . . . .	48
4.4.3	BAG-3 zeigt keinen Einfluss auf die DALIS-Formation . . . . .	50
4.5	Auswirkungen der regulierten DALIS-Prozessierung auf die Anti- genpräsentation . . . . .	51
<b>5</b>	<b>Diskussion</b>	<b>53</b>
5.1	CHIP ubiquitiniert die in DALIS akkumulierten Proteine . . . . .	53
5.2	Der CHIP-Inhibitor HspBP1 reguliert die DALIS-Formation . . . . .	56
5.3	Der Einfluss von BAG-1 auf die Formation von DALIS . . . . .	57
5.4	Die Rolle von BAG-3 beim autophagischem Abbau von DALIS . . . . .	59
5.4.1	Chaperon-vermittelte Autophagie - CMA ( <i>Chaperone-mediated autophagy</i> ) . . . . .	60
5.5	DALIS - ein Speicherkompartiment für Antigene? . . . . .	62
5.6	Co-Chaperone regulieren Antigenprozessierung und -präsentation auf MHCI-Molekülen . . . . .	64
5.7	Transiente Aggregat-Formation in Nicht-Immunzellen . . . . .	64
5.8	Ausblick . . . . .	65

# Abbildungsverzeichnis

2.1	Der ATP-Zyklus von Hsc/Hsp70 . . . . .	3
2.2	Chaperone und Co-Chaperone als Komponenten der Protein- Qualitätskontrolle . . . . .	4
2.3	Co-Chaperone regulieren die Chaperon-Aktivität in Richtung Protein- Faltung oder -Abbau . . . . .	5
2.4	Der Chaperon-vermittelte Abbau von Proteinen . . . . .	7
2.5	Die Regulation des proteasomalen Abbaus durch Co-Chaperone . . .	9
2.6	Chaperon-vermittelte selektive Autophagie . . . . .	10
2.7	Die Immunzellreifung . . . . .	12
2.8	Antigenprozessierung und -präsentation auf MHCI-Molekülen in pro- fessionellen APCs . . . . .	14
4.1	Aus Monozyten generierte humane DCs zeigen keine DALIS- Bildung nach LPS-Induktion . . . . .	37
4.2	Transiente Bildung von DALIS in Immunzellen . . . . .	38
4.3	Colokalisation von Komponenten der Proteostase mit DALIS . . . . .	40
4.4	Regulation der Abbau-Komponenten während der Immunzellreifung	42
4.5	Die Überexpression von CHIP, HspBP1, BAG-1 bzw. BAG-3 beein- flusst die Formation von DALIS in RAW309-Makrophagen . . . . .	44
4.6	Die Überexpression von CHIP, HspBP1, BAG-1 bzw. BAG-3 beein- flusst die DALIS-Menge . . . . .	45
4.7	Depletion von CHIP, HspBP1, bzw. BAG-1 beeinflusst die Formation von DALIS . . . . .	47
4.8	Regulation der DALIS-Menge nach Depletion von CHIP, HspBP1 bzw. BAG-1 . . . . .	48
4.9	BMDCs aus der <i>hspp1</i> <sup>-/-</sup> -Maus bilden verstärkt DALIS . . . . .	49
4.10	BAG-3 hat keinen Einfluss auf die Bildung von DALIS . . . . .	50
4.11	Das Hsc/Hsp70 Co-Chaperon-Netzwerk kontrolliert die Antigenprä- sentation . . . . .	52
5.1	Das Hsc/Hsp70 Co-Chaperon-Netzwerk kontrolliert die Antigenpro- zessierung und -präsentation während der Immunzellreifung . . . . .	55
5.2	Die Rolle von BAG-1 bei der DALIS-Bildung . . . . .	58
5.3	BAG-3 könnte am Abbau der DALIS beteiligt sein . . . . .	59
5.4	Die Co-Chaperone BAG-1 und BAG-3 könnten den Chaperon-ver- mittelten selektiven Abbau regulieren . . . . .	61

5.5 Durch die Speicherung von Antigenen in DALIS könnte eine optimale Aktivierung von CTLs gewährleistet werden . . . . . 63

# 1 Zusammenfassung

Während der Reifung von murinen Makrophagen und BMDCs (*bone marrow derived dendritic cells*) akkumulieren transient ubiquitinierte Proteine in DALIS (*Dendritic Cell Aggresome-Like Induced Structures*). DALIS beinhalten defekte ribosomale Proteine (DRiPs - *defective ribosomal products*), die prozessiert und auf MHCI-Molekülen präsentiert werden. Dadurch werden cytotoxische T-Zellen (CTLs - *cytotoxic T-lymphocytes*) aktiviert und eine Immunantwort eingeleitet.

In vorliegender Arbeit wurde am Beispiel der Formation von DALIS untersucht, wie die Aggregat-Bildung in eukaryotische Zellen durch Modulation der Proteostase-Maschinerie beeinflusst wird. Tatsächlich konnte das Chaperon/Co-Chaperon-Netzwerk als Regulator der Bildung und des Abbaus von DALIS identifiziert werden. Co-Chaperone modulieren die Interaktion zwischen Hsc/Hsp70 und dem Ubiquitin/Proteasomsystem, bzw. dem autophagischen Abbau. Die Chaperon-assoziierte Ubiquitinligase CHIP und das Ubiquitin-ähnliche Protein BAG-1 werden essentiell für die Bildung von DALIS in murinen Makrophagen und BMDCs benötigt. Des Weiteren kooperiert CHIP mit dem Autophagie-assoziierten Co-Chaperon BAG-3 und dem Ubiquitin-Adapter p62 und vermittelt den Abbau von DALIS über Chaperon-vermittelte selektive Autophagie (CASA - *chaperone-assisted selective autophagy*). Das Co-Chaperon HspBP1 inhibiert CHIP-Aktivität und drosselt auf diese Weise die Einschleusung von Peptiden in den Weg der Antigenprozessierung. Durch die Regulation der DALIS-Formation kontrollieren die Co-Chaperone die Präsentation von endogenen und viralen Antigenen auf MHCI-Molekülen in murinen BMDCs.

In vorliegender Arbeit konnte zum ersten Mal gezeigt werden, dass das Chaperon/Co-Chaperon-Netzwerk die transienten Protein-Aggregation in professionellen Antigen-präsentierenden Zellen (APC - *antigen presenting cell*) kontrolliert und auf diese Weise die Immunantwort reguliert. Ähnliche Mechanismen könnten auch bei der Formation von Aggresomen oder Aggresomen-ähnlichen Aggregaten in Nicht-Immunzellen eine Rolle spielen.

## 2 Einleitung

Die Aufrechterhaltung der Protein-Homöostase (Proteostase) in einer lebenden Zelle beruht auf einem hoch dynamischen Netzwerk aus Proteinsynthese, -faltung und -abbau. Dadurch kann sich die Zelle vor schädlichen äußeren Einflüssen schützen und sich an physiologische Veränderungen anpassen. Eine Fehlregulation innerhalb der Proteostase kann zu zahlreichen Proteinfaltungs- und Aggregationserkrankungen führen [Balch *et al.*, 2008, Powers *et al.*, 2009].

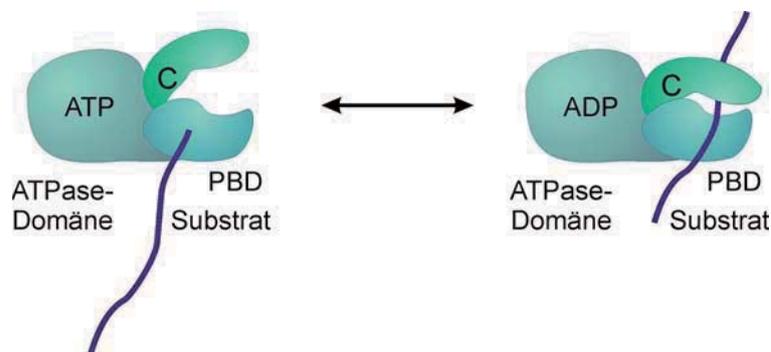
Molekulare Chaperone spielen eine zentrale Rolle innerhalb des Protein-Netzwerks, welches die Proteostase vermittelt. Nach der Translation sind sie die ersten Komponenten, die neu-synthetisierte Proteine binden. Im Zuge der Protein-Qualitätskontrolle übernehmen sie eine duale Funktion. Zum einen agieren sie als Faltungshelfer indem sie posttranslational Proteine binden und in ihre native Form falten [Bukau und Horwich, 1998, Frydman, 2001, Young *et al.*, 2004, Hartl und Hayer-Hartl, 2009]. Zum anderen können sie fehlgefaltete Substrate dem proteasomalen Abbau oder dem Abbau über lysosomale Kompartimente zuführen [Massey *et al.*, 2006, Arndt *et al.*, 2007, Gamerdinger *et al.*, 2009]. Die Aktivität der Chaperone wird dabei durch Co-Chaperone reguliert. Auf diese Weise verhindert das Chaperon/Co-Chaperon-Netzwerk die Aggregation von nicht-nativen Proteinen und gewährleisten somit das Gleichgewicht der Proteostase innerhalb der Zelle [Kettern *et al.*, 2010].

Der proteasomale Abbau ist in Antigen-präsentierenden Zellen auch an der Generierung von Antigenen beteiligt. Hierbei werden endogene oder virale Proteine proteasomal prozessiert und zur Zelloberfläche transportiert, wo sie auf MHC-I-Molekülen (*major histocompatibility complex*) präsentiert werden und cytotoxische T-Zellen (CTL - *cytotoxic T-lymphocytes*) aktivieren [Rock und Goldberg, 1999]. Als Ursprung dieser Peptide werden defekte ribosomale Proteine (DRiPs - *defective ribosomal products*) diskutiert, die sich im Verlauf der Immunzellreifung transient in DALIS (*Dendritic Cell Aggresome-Like Induced Structures*) ansammeln [Lelouard

et al., 2002]. Bei der Prozessierung der DALIS scheint das Chaperon/Co-Chaperon-System eine entscheidende regulatorische Rolle zu spielen.

## 2.1 Molekulare Chaperone in der Proteostase

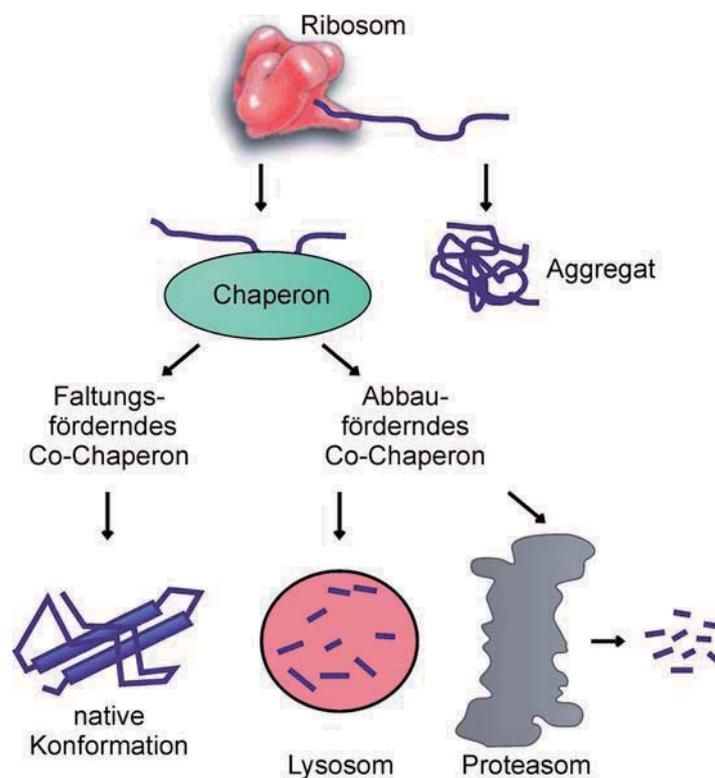
Die Proteine der Hsp70-Protein-Familie (70 kDa *heat shock protein*) gehören zu den am besten beschriebenen Chaperonen. Neben dem konstitutiv exprimierten Hsc70 (70 kDa *heat shock cognate*) ist das Stress-induzierte Hsp70 einer der Hauptvertreter dieser Protein-Familie.



**Abbildung 2.1: Der ATP-Zyklus von Hsc/Hsp70.** Hsc/Hsp70 ist ein Multi-Domänen-Protein. Nukleotidaustausch an der N-terminalen ATPase-Domäne (ATP) ändert die Konformation des Chaperons und beeinflusst die Substrataffinität. An die ATPase-Domäne schließt sich die Peptid-Binde-Domäne an (PBD). C-terminal befindet sich eine Domäne, die sich bei Substratbindung wie ein Deckel schließt (C).

Hsc/Hsp70 ist ein Multi-Domänen-Protein. N-terminal befindet sich die 44 kDa große ATPase-Domäne. An diese schließt sich eine 27 kDa große Peptid-Binde-Domäne (PBD) an. Neu-synthetisierte Proteine exponieren große Bereiche mit hydrophoben Aminosäuren, die in der nativen Faltung im Inneren des Proteins verborgen werden. Diese Bereiche können von der PBD gebunden werden [Bukau und Horwich, 1998]. C-terminal folgt eine Domäne aus fünf  $\alpha$ -Helices, welche sich bei Peptid-Bindung wie eine Art Deckel über das gebundene Substrat faltet. Die Substratbindung wird hierbei über einen Zyklus von ATP-Bindung und -Hydrolyse reguliert. In der ATP-gebundenen Form ist die PBD für das Substrat frei zugänglich. Die Affinität des Chaperons zur Substrat-Bindung ist hierbei jedoch gering. Durch

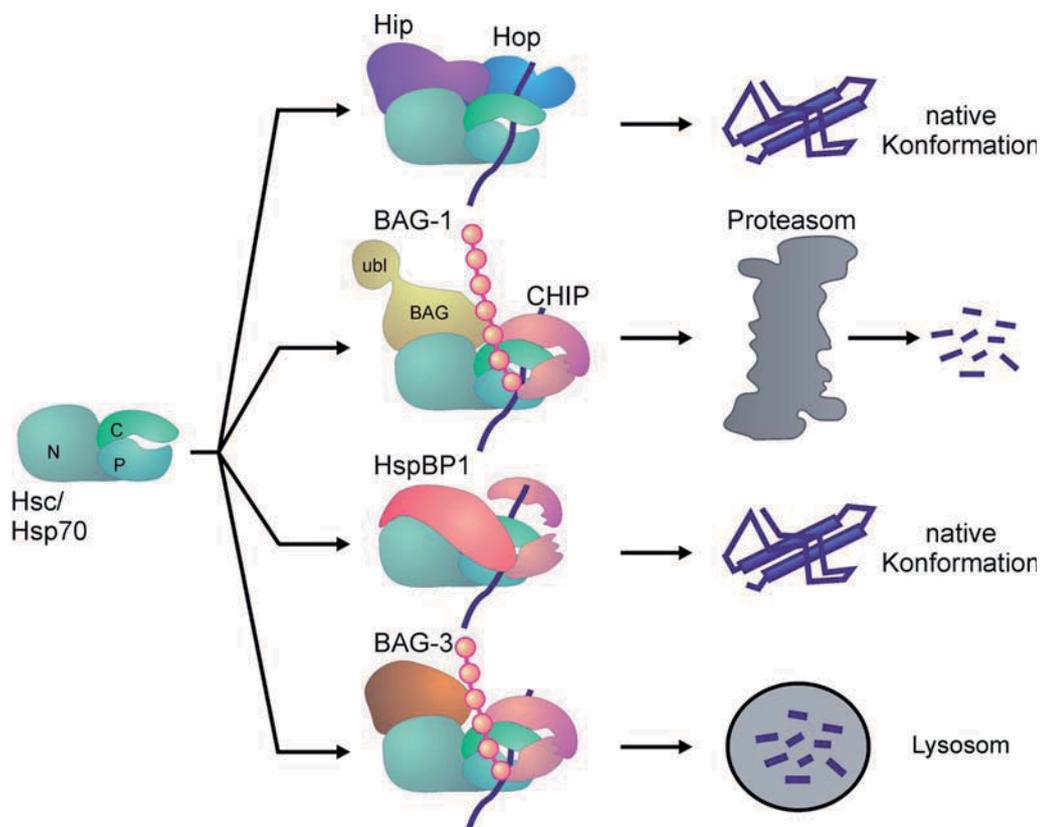
ATP-Hydrolyse kommt es zur Konformationsänderung des Chaperons und der C-terminale Deckel schließt sich über die PBD. Dadurch wird die Bindung zwischen Hsc/Hsp70 und Substrat stabilisiert. Durch den Austausch von ADP gegen ATP öffnet sich die PBD und das Substrat wird freigesetzt [Hartl und Hayer-Hartl, 2002]. Der Zyklus von Substrat-Bindung und -Freisetzung ermöglicht eine schrittweise Faltung des Substrats (Abb. 2.1). Neben der Funktion als Faltungshelfer können Chaperone jedoch auch dafür sorgen, dass Substrate einem der zellulären Protein-Abbauwege zugeführt werden. Die Chaperonaktivität wird durch Co-Chaperone reguliert. Sie können das Substrat zur nativen Faltung, zum proteasomalen, oder zum autophagischen Abbau lenken (Abb. 2.2). In dieser Arbeit steht der Protein-Abbau im Mittelpunkt, weshalb auf die Hsc/Hsp70-Funktion als Faltungshelfer nur kurz eingegangen wird.



**Abbildung 2.2: Chaperone und Co-Chaperone als Komponenten der Protein-Qualitätskontrolle.** Neu-synthetisierte Proteine neigen zur Aggregation. Chaperone verhindern die Aggregation und unterstützen die Faltung in die native Konformation oder führen das Protein dem Abbau zu. Co-Chaperone bestimmen, ob das Chaperon als Faltungshelfer fungiert, oder den Abbau des Substrats über Autophagie oder das Proteasom vermittelt.

## 2.2 Co-Chaperone als Regulatoren der Chaperon-Aktivität

Die ATPase-Aktivität von Hsp/Hsc70 wird durch Co-Chaperone reguliert, welche um gemeinsame Bindestellen am Chaperon konkurrieren und so die Substrat-Affinität beeinflussen. Außerdem können einige Co-Chaperone Interaktionen zwischen dem Chaperon-Komplex und anderen Protein-Komplexen vermitteln, welche dann bei der Faltung oder dem Abbau mit dem Chaperon kooperieren (Abb. 2.3).



**Abbildung 2.3: Co-Chaperone regulieren die Chaperon-Aktivität in Richtung Protein-Faltung oder -Abbau.** In Interaktion mit Hip oder Hop werden Hsc/Hsp70-Substrate gefaltet. Die Ubiquitinligase CHIP vermittelt die Ubiquitinierung der Chaperon-gebundenen Substrate. In Kooperation mit dem Proteasom-Kopplungsfaktor BAG-1 werden Proteine zum proteasomalen Abbau sortiert, während HspBP1 als Inhibitor von CHIP die Faltung des Substrats fördert. BAG-3 induziert den Abbau des Proteins über Autophagie. N - N-Terminus, C - C-Terminus, P - Peptid-Binde-Domäne von Hsc/Hsp70.

### 2.2.1 Regulation der Substratfaltung durch Co-Chaperone

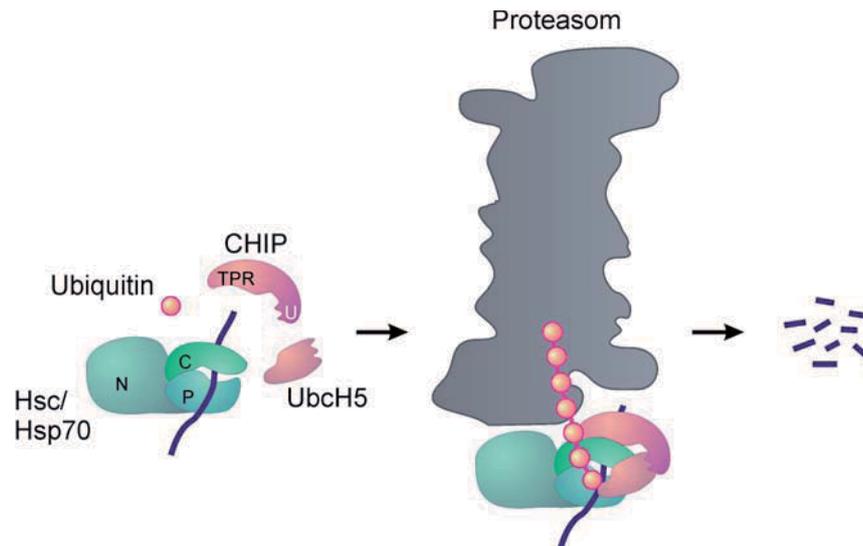
Die Faltungsaktivität von Hsc/Hsp70 wird unter anderem durch die Co-Chaperone Hip (*hsp70 interacting protein*) und Hop (*hsp70/hsp90 organizing protein*) der Hsp40-Familie unterstützt [Frydman und Höhfeld, 1997]. Die Proteine dieser Familie beeinflussen die Chaperon-Substrat-Affinität durch Erhöhung der ATPase-Aktivität von Hsc/Hsp70. Außerdem erkennen die Hsp40-Co-Chaperone nicht-native Proteine und leiten sie an Hsp/Hsc70 weiter. Hip bindet hierbei an die ATPase-Domäne von Hsc/Hsp70 wodurch die ADP-gebundene Konformation stabilisiert wird [Höhfeld *et al.*, 1995]. Hop hingegen fungiert als Kopplungsfaktor zwischen Hsc/Hsp70 und Hsp90 und gewährleistet somit die Substratübertragung von Hsc/Hsp70 auf Hsp90 [Scheufler *et al.*, 2000].

### 2.2.2 Chaperone-assisted proteasomal degradation (CAP)

Neben Co-Chaperonen, welche die Faltung des Hsc/Hsp70 gebundenen Peptids stimulieren, existieren andere Co-Chaperone, welche zum Abbau des Substrats beitragen. Beim Chaperon-vermittelten proteasomalen Abbau (*CAP - Chaperone-assisted proteasomal degradation*) wird das Substrat in einer Enzymkaskade mit Ubiquitinresten versehen. Diese fungieren als Abbausignal und werden vom 26S-Proteasom erkannt, wodurch das Substrat abgebaut wird [Hartmann-Petersen *et al.*, 2003, Finley *et al.*, 2004, Varshavsky, 2005]. Das 76 Aminosäure große Ubiquitin wird zunächst unter ATP-Verbrauch durch ein Ubiquitin-aktivierendes Enzym (E1) aktiviert [Haas *et al.*, 1982]. Anschließend wird das aktivierte Ubiquitin auf ein Ubiquitin-konjugierendes Enzym übertragen (E2) und durch eine Ubiquitinligase (E3) entweder direkt vom E2 oder indirekt über das E3-Enzym auf das Substrat übertragen [Hershko *et al.*, 1983, Pickart, 2004]. Diese Schritte werden mehrfach wiederholt, so dass eine Ubiquitinkette entsteht. An der Ausbildung der Ubiquitinkette ist möglicherweise eine weitere Enzymgruppe, die als E4 bezeichnet wird, beteiligt [Hoppe, 2005]. Die Ubiquitinkette kann über konservierte Lysinreste (Lys6, Lys11, Lys27, Lys29, Lys48, Lys63) des Ubiquitins verknüpft werden. Je nach Art und Anzahl der Verknüpfungen können die Ubiquitinketten unterschiedliche Funktionen ausüben [Pickart und Fushman, 2004]. Lys63-verknüpfte Ubiquitinketten spielen z. B. in der DNA-Reparatur eine Rolle [Hofmann und Pickart, 1999]. Lys48-verknüpfte

Ubiquitinketten mit mehr als vier Lysinen konnten als Signal für den proteasomalen Abbau identifiziert werden [Thrower *et al.*, 2000].

Beim Proteasom handelt es sich um einen Multi-Enzym-Komplex, der aus dem katalytischen 20S Kernkomplex und zwei regulatorischen 19S Kappenkomplexen besteht. Die Kappenkomplexe sind für die Bindung der Ubiquitinkette am Substrat verantwortlich. Das Substrat wird entfaltet und in den 20S-Kernkomplex transferiert, wo es abgebaut wird [Baumeister *et al.*, 1998, Pickart und Cohen, 2004].



**Abbildung 2.4: Der Chaperon-vermittelte Abbau von Proteinen.** Das neu-synthetisierte Protein wird über die Peptid-Binde-Domäne von Hsc/Hsp70 gebunden. CHIP interagiert über sein TPR-Motiv mit Hsc/Hsp70, während es mit seiner U-Box-Domäne an das E2-Enzym (UbchH5) bindet und so das Substrat ubiquitiniert. Über die Ubiquitinkette wird der gesamte Komplex zum Proteasom sortiert und das gebundene Substrat abgebaut. TPR - *tetra-trico-peptide repeat*, U - U-Box, N - N-Terminus, C - C-Terminus, P - Peptid-Binde-Domäne von Hsc/Hsp70.

Eines der zentralen Co-Chaperone bei der Regulation der Ubiquitin/Proteasom-Maschinerie ist die Ubiquitinligase CHIP (*carboxyl terminus of hsc70-interacting protein*) [Demand *et al.*, 2001]. Über sein TPR-Motiv (*tetra-trico-peptide repeat*) kann CHIP an das EEVD-Motiv von Hsc/Hsp70 und Hsp90 binden, wodurch die Faltungsaktivität der Chaperone gehemmt wird [Ballinger *et al.*, 1999, Connell *et al.*, 2001]. C-terminal befindet sich die für die Ubiquitinligase-Aktivität verantwortliche U-Box-Domäne des Co-Chaperons [Koepl *et al.*, 1999]. Die U-Box ist strukturell mit der RING-Finger-Domäne eng verwandt, die in diversen Ubiquitinligasen vorkommt [Jackson *et al.*, 2000, Joazeiro und Weissman, 2000, Cyr *et al.*, 2002]. Über die

U-Box bindet CHIP an Ubiquitin-konjugierende Enzyme der UbcH5-Familie, wodurch das Substrat ubiquitiniert wird (Abb. 2.4) [Demand *et al.*, 2001, Jiang *et al.*, 2001, Murata *et al.*, 2001].

### 2.2.2.1 Abbau-stimulierende Co-Chaperone

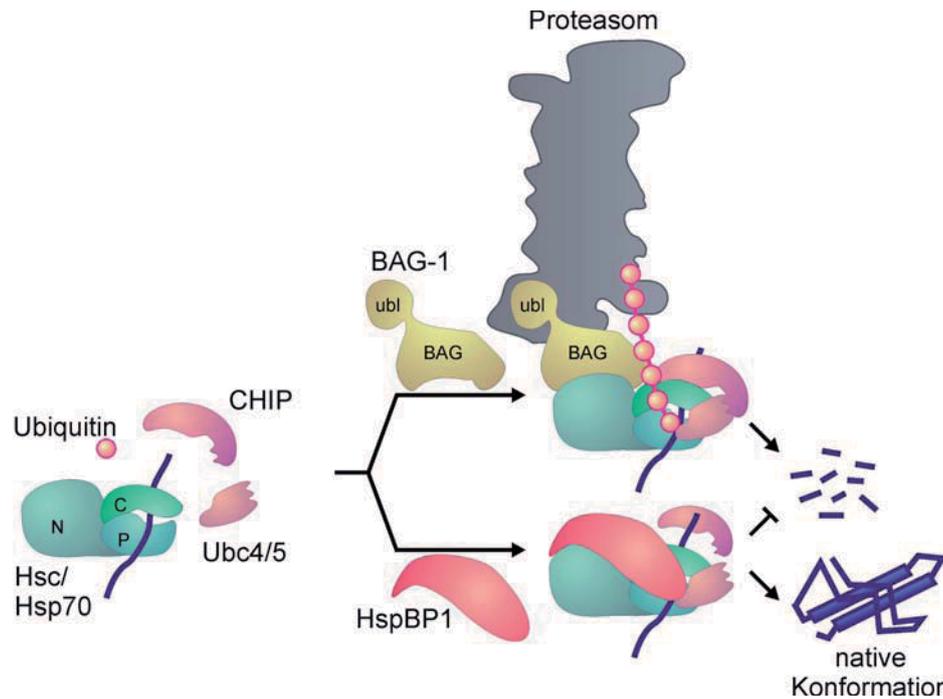
Zu den Co-Chaperonen, die den Abbau von Chaperon-Substraten in Kooperation mit CHIP fördern, gehört BAG-1 (*Bcl-2 associated athanogene-1*). Dieses Co-Chaperon agiert als Kopplungsfaktor zwischen dem CHIP/Chaperon-Komplex und dem Proteasom (Abb. 2.5). BAG-1 zeichnet sich durch eine C-terminale BAG-Domäne aus, über die es mit dem Chaperon interagieren kann. Über die N-terminal gelegene ubl-Domäne (*ubiquitin like domain*) wird die Assoziation mit dem Proteasom vermittelt [Höhfeld und Jentsch, 1997, Lueders *et al.*, 2000, Sondermann *et al.*, 2001]. Zusätzlich ist BAG-1 ein Nukleotidaustauschfaktor für Hsc/Hsp70. Dadurch bewirkt das Co-Chaperon eine erhöhte Substratfreisetzung von Hsc/Hsp70 und begünstigt damit die Einschleusung des Substrats in den 20S Kernkomplex des Proteasoms [Alberti *et al.*, 2003].

### 2.2.2.2 Abbau-inhibierende Co-Chaperone

Abbau-inhibierende Co-Chaperone limitieren die Aktivität des CHIP-vermittelten Abbaus. Sie geben neu-translatierten Proteinen die Möglichkeit von Chaperonen in ihre native Form gefaltet zu werden.

Eines dieser Abbau-inhibierenden Co-Chaperone ist der Nukleotidaustauschfaktor HspBP1 (*heat shock protein binding protein 1*). HspBP1 bindet an die ATPase-Domäne von Hsc/Hsp70 und bildet zusammen mit CHIP einen ternären Komplex, wie er auch für BAG-1, CHIP und Hsc/Hsp70 beschrieben ist [Demand *et al.*, 2001]. Durch diese Bindung werden anscheinend Lysinreste abgeschirmt, bzw. durch die Konformationsänderung des Chaperons so verschoben, dass keine weitere Ubiquitinierung durch den CHIP/E2-Komplex mehr möglich ist [Alberti *et al.*, 2004].

Die einzelnen Co-Chaperone stehen also in Konkurrenz um die Bindungsstelle an Hsc/Hsp70 und entscheiden so, ob das Hsc/Hsp70-gebundene Substrat dem Abbau zugeführt wird, oder einen weiteren Schritt zur Proteinfaltung eingeht (Abb. 2.5).



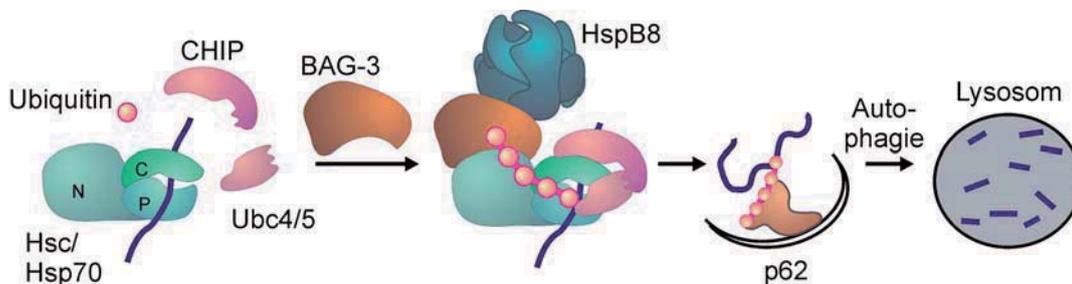
**Abbildung 2.5: Die Regulation des proteasomalen Abbaus durch Co-Chaperone.** BAG-1 bindet mit seiner BAG-Domäne an die ATPase-Domäne von Hsc/Hsp70. Gleichzeitig bindet es über seine ubl-Domäne an das Proteasom und fungiert so als Kopplungsfaktor. Durch Nukleotidaustausch induziert es Substratfreisetzung und fördert so den proteasomalen Abbau des Substrats. HspBP1 bindet, wie BAG-1, ebenfalls an die ATPase-Domäne von Hsc/Hsp70. Durch Nukleotidaustausch wird eine Ubiquitinkettenverlängerung verhindert, oder die Konformation des Chaperons so verändert, dass es nicht mehr zugänglich ist für den CHIP/UbcH5-Komplex. Dadurch verhindert HspBP1 den proteasomalen Abbau des Substrats. N - N-Terminus, C - C-Terminus, P - Peptid-Binde-Domäne von Hsc/Hsp70.

### 2.2.3 Chaperone-assisted selective autophagy (CASA)

Neben CAP ist der Abbau über Autophagie ein weiterer Protein-Abbauweg [Rubinsztein, 2006, Eskelinen und Saftig, 2009]. Bei der Autophagie wird cytosolisches Material mit einer Phagophoren-Isolationsmembran umschlossen, wodurch sich das sogenannte Autophagosom bildet. Dieses fusioniert mit Lysosomen, in deren saurem Milieu das eingeschlossene Material abgebaut wird. Diese Art der Autophagie wird auch als Makroautophagie bezeichnet. Bei der Mikroautophagie hingegen wird cytosolisches Material direkt in eine lysosomale Membran eingeschlossen. Autophagie kann unspezifisch ablaufen, z. B. bei Nahrungsknappheit innerhalb der Zelle, oder aber selektiv erfolgen. Dies geschieht z. B. beim Abbau von Proteinaggregaten, funktionsuntauglichen Organellen, wie Mitochondrien oder Peroxiso-

men, oder aufgenommenen Mikroben [Nakagawa *et al.*, 2004, Dunn *et al.*, 2005, Rubinsztein, 2006, Todde *et al.*, 2009].

In einigen Fällen ist die oben beschriebene selektive Autophagie Ubiquitin-abhängig [Xie und Klionsky, 2007, Kirkin *et al.*, 2009b]. Über diesen Weg werden sowohl polyubiquitinierte Proteine als auch Ubiquitin-Konjugat-enthaltende Aggregate abgebaut [Kirkin *et al.*, 2009a, Clausen *et al.*, 2010]. Ubiquitinketten am Substrat werden von den Adapterproteinen p62 und NBR1 (*neighbor of BRCA1 gene 1*) gebunden. Über eine LIR-Domäne (*LC3 interacting region*) können NBR1 oder p62 wiederum an das Autophagophoren-Protein LC3 binden und das eingeschlossene Substrat kann autophagisch abgebaut werden [Komatsu *et al.*, 2007, Pankiv *et al.*, 2007]. Die Rekrutierung der Substrate in Autophagosomen ist dabei von dem Phosphatidylinositol-3-Phosphat-interagierendem Protein ALFY (*autophagy-linked FYVE protein*) abhängig [Filimonenko *et al.*, 2010].



**Abbildung 2.6: Chaperon-vermittelte selektive Autophagie.** BAG-3 initiiert zusammen mit dem kleinen Hitzeschockprotein HspB8 den autophagischen Abbau des Hsc/Hsp70-gebundenen Substrats. Durch CHIP-vermittelte Ubiquitinierung kann das Substrat von p62 gebunden werden. Es bildet sich eine Phagophorenmembran, in die das Substrat eingeschlossen wird. Nach Verschmelzung mit Lysosomen wird das Protein abgebaut. N - N-Terminus, C - C-Terminus, P - Peptid-Binde-Domäne von Hsc/Hsp70.

Kürzlich konnte gezeigt werden, dass molekulare Chaperone an der Initiierung von selektiver Autophagie mitwirken. Dies geschieht im Rahmen eines Abbauweges, der als CASA (*chaperone-assisted selective autophagy*) beschrieben wurde [Arndt *et al.*, 2010, Kettern *et al.*, 2010]. Hierbei sind BAG-3, ein Co-Chaperon von Hsc/Hsp70, und das kleine Hitzeschock-Protein HspB8 von zentraler Bedeutung [Carra *et al.*, 2008, Gamerdinger *et al.*, 2009, Arndt *et al.*, 2010]. BAG-3 koordiniert die Aktivität von Hsc/Hsp70 und HspBP8 während des Abbauprozesses des Substrats. Durch CHIP-vermittelte Ubiquitinierung wird das Substrat anschließend von p62 gebunden und der Autophagie zugeführt (Abb. 2.6) [Arndt *et al.*, 2010].

## 2.3 Professionell Antigen-präsentierende Zellen

Bereits seit längerer Zeit wurde eine Kooperation von molekularen Chaperonen mit Protein-Abbausystemen im Zuge der Prozessierung von endogenen und viralen Antigenen in professionellen Antigen-präsentierenden Zellen (APCs - *antigen presenting cells*) diskutiert [Lelouard *et al.*, 2004]. Bei professionellen APCs handelt es sich um Immunzellen des adaptiven Immunsystems, die durch die Präsentation von Antigenen auf MHC-Molekülen eine spezifische Immunantwort auslösen können.

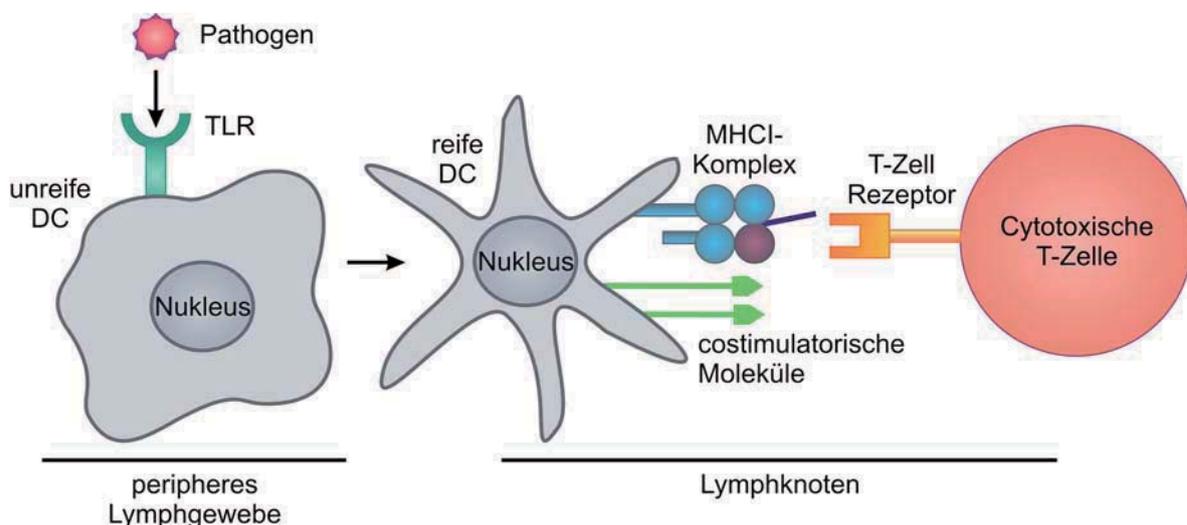
### 2.3.1 Zelluläre Spezialisierung von APCs - Die Immunzellreifung

Nach einem Immunstimulus reifen Monozyten zu professionellen APCs, wie DCs (*dendritic cells*) und Makrophagen, heran und sind in der Lage, T-Zellen zu aktivieren. Die immunkompetentesten APCs sind hierbei DCs [Banchereau und Steinman, 1998]. Bei der Zellreifung auslösenden Stimulierung werden pathogen-spezifische Strukturen (PAMPs - *pathogen-associated molecular patterns*) von der DC erkannt [Medzhitov und Janeway, 2000]. Dabei kann es sich z. B. um den Bakterienzellwand-Bestandteil Lipopolysaccharid (LPS) handeln, oder um doppelsträngige RNA, wie sie für viele Viren typisch ist [Winzler *et al.*, 1997, Banchereau *et al.*, 2000]. PAMPs werden von transmembranen TLRs (*toll-like receptors*) auf der Zelloberfläche von DCs und Makrophagen gebunden, was eine NF $\kappa$ B-Signalkaskade auslöst [Muzio *et al.*, 1998]. In Säugerzellen sind zwölf TLRs beschrieben. TLR4 z. B. wird durch LPS aktiviert [Beutler, 2000], während doppelsträngige Virus-RNA von TLR7 und TLR8 erkannt wird [Heil *et al.*, 2004]. Durch die eingeleitete Signalkaskade werden verschiedene Transkriptionsfaktoren aktiviert. In der Folge können Zelldifferenzierung und -proliferation oder auch Apoptose eingeleitet werden.

### 2.3.2 Antigenpräsentation in professionellen APCs

Im Zuge der Immunzellreifung präsentieren professionelle APCs Antigene auf ihrer Zelloberfläche. Der erste Schritt ist die Aufnahme eines Pathogens oder seiner Bestandteile. Hierbei kann es sich z. B. um ein Bakterium, oder eine Virusinfektion

handeln. Durch den Kontakt mit dem Pathogen wird die Reifung der APC ausgelöst. Im Zuge der Zellreifung wandern die APCs von den peripheren Lymphgeweben in die Lymphknoten ein. Die APC exprimiert vermehrt MHC-Komplexe auf der Zelloberfläche, auf denen die prozessierten Peptide präsentiert werden. Neben MHC-Komplexen exprimiert die APC auch costimulatorische Moleküle [Jenkins *et al.*, 1990]. Diese werden für die vollständige Aktivierung von T-Zellen benötigt (Abb. 2.7). Es gibt verschiedene Arten von T-Zellen, die unterschiedliche Funktionen erfüllen. CTLs eliminieren die infizierte Zelle, indem sie Apoptose auslösen. T-Helferzellen hingegen können unter anderem B-Zellen aktivieren, welche daraufhin Antikörper produzieren und sezernieren, während T-Gedächtniszellen wichtig sind um bei zukünftigen Infektionen mit dem gleichen Erreger eine schnellere spezifische Immunantwort zu gewährleisten.



**Abbildung 2.7: Die Immunzellreifung.** Die Immunzellreifung wird durch eine TLR-vermittelte Signalkaskade ausgelöst, in Folge derer die Immunzelle in die Lymphknoten einwandert und dort MHC-Komplexe und costimulatorische Moleküle präsentiert. Diese werden von T-Zellen erkannt, welche dadurch aktiviert werden.

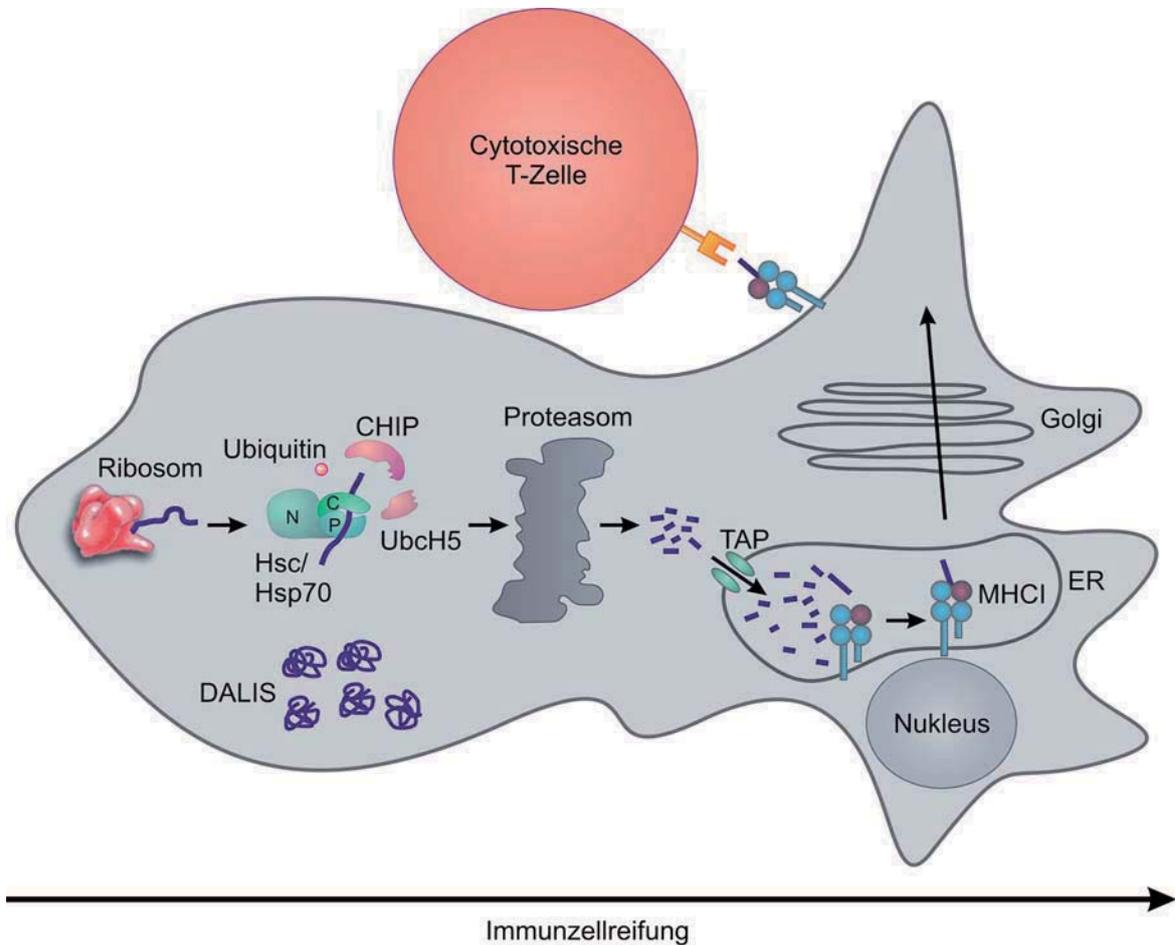
Die Antigenpräsentation findet auf unterschiedlichen MHC-Molekülen statt. Auf MHCI-Molekülen werden hauptsächlich endogene und virale Antigene präsentiert [Heemels und Ploegh, 1995, Rock und Goldberg, 1999]. Durch die Präsentation von Antigenen auf MHCI-Molekülen werden CTLs aktiviert. MHCI-Komplexe kommen ubiquitär auf allen somatischen Zellen vor. Aufgrund der Expression costimulatorischer Moleküle sind jedoch nur professionelle APCs in der Lage, CTLs zu

aktivieren [Trombetta und Mellman, 2005]. Bei MHCII-Molekülen stammen die Antigene aus den endozytischen Kompartimenten, in denen extrazelluläre Substanzen proteolytisch abgebaut werden. Auf MHCII-Molekülen-präsentierte Antigene werden von CD4<sup>+</sup>-Zellen erkannt. [Bryant und Ploegh, 2004]. In den letzten Jahren konnte jedoch gezeigt werden, dass MHCI- und MHCII-Moleküle nicht ausschließlich endo-, bzw. exogene Antigene präsentieren. So können Peptide von exogenen Proteinen auf MHCI-Molekülen präsentiert werden [Pfeifer *et al.*, 1993, Ackerman und Cresswell, 2004], während endogene Antigene auch auf MHCII-Molekülen präsentiert werden können [Nimmerjahn *et al.*, 2003, Paludan *et al.*, 2005].

### 2.3.3 Die Rolle des Ubiquitin/Proteasom-Systems bei der Antigenprozessierung

Bei der Reifung von professionellen APCs ist das Ubiquitin/Proteasom-System an der Generierung von Antigenen zur Präsentation auf MHCI-Molekülen maßgeblich beteiligt [Rock und Goldberg, 1999]. Außerdem liefert es Vorläufer-Peptide, die anschließend vom Proteasom zu MHCI-Antigenen weiter prozessiert werden [Rock *et al.*, 2002]. Cytosolische ubiquitinierte Proteine werden proteasomal abgebaut und über den TAP-Transporter (*transporter associated with antigen processing*) ins Endoplasmatische Retikulum (ER) geschleust [Kloetzel, 2001]. Dort werden MHCI-Moleküle mit Antigenen beladen und zur CTL-Aktivierung an die Zelloberfläche transportiert [Vyas *et al.*, 2008] (Abb. 2.8). Als Quelle dieser Antigene werden DRiPs (*defective ribosomal products*) diskutiert. Unter DRiPs werden neu-translatierte fehlerhafte Proteine zusammengefasst. Hierbei können die Fehler schon auf mRNA Ebene, oder auch bei der Translation entstehen, wenn Aminosäuren fehlerhaft in die Peptidkette eingebaut werden. Außerdem können ein zu früher Translationsabbruch, oder das Fehlen von Aminosäuren dafür sorgen, dass ein Peptid nicht in die native Konformation gefaltet werden kann. Darüber hinaus können sich Multi-Domänen-Proteine fehlerhaft zusammensetzen und somit ihre Funktion verlieren [Yewdell *et al.*, 2001, Princiotta *et al.*, 2003]. Über den Mechanismus der DRiPs-Prozessierung kann die Zelle ein breites Spektrum des translatierten Proteoms, sowie auch virale Proteine bei Infektion der Zelle, auf ihrer Oberfläche präsentieren [Yewdell *et al.*, 2001, Trombetta und Mellman, 2005]. Es wird diskutiert, dass möglicherweise bis zu 30% aller neu-synthetisierten Proteine DRiPs sind [Schu-

bert *et al.*, 2000], während andere Studien von einem weitaus geringeren Anteil ausgehen [Vabulas und Hartl, 2005]. Im Verlauf der Immunzellreifung akkumulieren DRiPs und bilden transiente Aggregate, sogenannte DALIS (*Dendritic Cell Aggresome-Like Induced Structures*) [Lelouard *et al.*, 2004].



**Abbildung 2.8: Antigenprozessierung und -präsentation auf MHC I-Molekülen in professionellen APCs.** Im Verlauf der Immunzellreifung bilden sich DALIS, die über das Proteasom prozessiert werden. Die Peptide werden über den TAP-Transporter in das Endoplasmatische Retikulum transloziert, auf MHC I-Moleküle geladen und an die Zelloberfläche transportiert. Dort werden sie CTLs präsentiert. ER - Endoplasmatisches Retikulum, N - N-Terminus, C - C-Terminus, P - Peptid-Binde-Domäne von Hsc/Hsp70.

### 2.3.4 *Dendritic Cell Aggresome-Like Induced Structures - DALIS*

Lelouard et al. konnten 2002 zeigen, dass humane LCs (*Langerhans cells*) und murine DCs als Antwort auf einen inflammatorischen Stimulus Aggregate von ubiquitinierten Proteinen im Cytosol akkumulieren. Im Gegensatz zu Aggresomen und *inclusion bodies* ist die Bildung dieser Strukturen transient [Lelouard et al., 2002]. Des Weiteren sind sie nicht wie Aggresomen von Vimentin umhüllt und colokalisieren nicht mit dem Mikrotubuli-organisierenden Zentrum (MTOC) [Kopito, 2000]. Diese Strukturen ähneln Aggresomen, die sich in unterschiedlichen Zelltypen bilden, wenn die Abbausysteme überlastet sind, z. B. aufgrund von Proteasom-Inhibition oder Überexpression von Aggregations-anfälligen Proteinen. Dementsprechend werden diese Aggregate *Dendritic Cell Aggresome-Like Induced Structures* (DALIS) genannt. Sie bilden sich nach einem Reifungsstimulus, wie z. B. der Zugabe von LPS. Die Menge der Aggregate steigt im Verlauf von zwölf Stunden an, bevor die Anzahl wieder abnimmt und nach ca. 48 Stunden keine Aggregate mehr detektierbar sind. DALIS bestehen aus neu-synthetisierten Proteinen und ihre Bildung ist abhängig von einer intakten Translation [Lelouard et al., 2002]. Auch eine Virusinfektion mit Influenza A löst Immunzellreifung aus. Währenddessen werden exprimierte Viruspeptide in DALIS abgelagert und es kommt zu einer verzögerten Antigenpräsentation [Herter et al., 2005]. DALIS werden deshalb als Speicherkompartimente für Peptide diskutiert, die als Antigene auf MHC-I-Molekülen präsentiert werden. Auf diese Weise soll gewährleistet werden, dass die DC vollständig ausgereift ist, bevor sie CTLs aktiviert [Lelouard et al., 2002, Herter et al., 2005, Fassbender et al., 2008]. Auch wenn das Vorkommen von DALIS zunächst auf professionelle APCs beschränkt schien, können auch Nicht-Immunzellen Aggregate ausbilden, die vergleichbar mit DALIS sind. Sie werden deshalb ALIS (*Aggresome-Like Induced Structures*) genannt. Diese bilden sich in verschiedenen Zelltypen in unterschiedlichen Stresssituationen. Auch sie dienen vermutlich als eine Art „Kurzzeitspeicher“ für DRiPs bevor sie abgebaut werden [Szeto et al., 2006]. Bei der Prozessierung von DALIS könnte die Chaperon-Maschinerie involviert sein. Verschiedene Komponenten, wie z. B. das Co-Chaperon CHIP, sind mit DALIS assoziiert [Lelouard et al., 2002, Lelouard et al., 2004]. Seifert et al. konnten eine proteasomale Beteiligung am DALIS-Abbau nachweisen [Seifert et al., 2010]. Hierbei wurde eine modulierte Form des Proteasoms, das sogenannte Immunoproteasom (I-Proteasom), beschrieben [Yewdell, 2005]. Dieses unterscheidet sich vom „herkömmlichen“ Proteasom in

der Umstrukturierung einiger Untereinheiten nach Interferon- $\gamma$ -Induktion [Kloetzel, 2001]. Dadurch wird das Proteasom dazu befähigt wesentlich effizienter zu prozessieren [Cerundolo *et al.*, 1995]. Aber auch die Autophagie scheint in der finalen DALIS-Beseitigung eine wichtige Rolle zu spielen [Szeto *et al.*, 2006].

In vorliegender Arbeit sollte untersucht werden, ob und auf welche Weise die DALIS-Bildung durch Co-Chaperone der Hsc/Hsp70-Maschinerie reguliert wird. Außerdem sollten nähere Einblicke in den Abbau von DALIS gewonnen werden. In diesem Kontext wurde analysiert, inwieweit in diesem Prozess proteasomaler und autophagischer Abbau beteiligt und reguliert sind. Im Hinblick auf die Speicherfunktion der DALIS konnte im Anschluss der Einfluss der regulierten DALIS-Formation und -Prozessierung auf die Antigenpräsentation auf MHCI-Molekülen untersucht werden.

## 3 Material und Methoden

### 3.1 Material

#### 3.1.1 Chemikalien und Reagenzien

Alle Chemikalien stammen, mit Ausnahme der unten aufgelisteten und gesondert bezeichneten, von den Firmen Roth, Fischer, Fluka, Serva, Merck oder Sigma:

<b>Chemikalie</b>	<b>Firma</b>
DNA-Ladepuffer (6x)	Fermentas GmbH
DNA-Standard	Fermentas GmbH
dNTPs	Roche Diagnostics GmbH
Dulbecco's Modified Eagle Medium	Invitrogen
VLE-Dulbecco's Modified Eagle Medium	GIBCO
ECL Chemilumineszenz Substrat	Pierce
Fötale Kälberserum (FCS)	GIBCO
Fugene HD Transfektionsreagenz	Roche Diagnostics GmbH
Hyperfilm ECL	Amersham
L-Glutamin	GIBCO
Meerrettich Peroxidase	Invitrogen
Optimem	Invitrogen
Penicillin-Streptomycin-Mix	GIBCO
Proteaseinhibitor-Mix „complete“	Roche Diagnostics GmbH
Proteinstandard	Bio-Rad
Pyruvat	Invitrogen
Trypsin/EDTA	GIBCO

Alle Polymerasen, RNAsen und Restriktionsenzyme wurden von der Firma Fermentas bezogen. Oligonukleotide stammten von biomers.net.

### 3.1.2 Antikörper

Folgende primäre Antikörper wurden verwendet:

<b>Antikörper</b>	<b>Spezies</b>	<b>Firma</b>
20S	Kaninchen	Biomol
2.4G2 Antikörper für Fc-Blockierung		BD Pharmingen
BAG-1	Kaninchen	Santa Cruz
BAG-3	Kaninchen	Proteintech
BAG-5	Ziege	Abcam
CD-8, gekoppelt an magnetische Partikel		Miltenyi
CHIP	Kaninchen	Oncogene
FK2	Maus	Biotrend
Hsp70 (SPA812)	Kaninchen	Stressgen
HspBP1	Kaninchen	Delta Biolabs
HspBP1	Maus	Transduction
IL-2	Maus	eBioscience
MHCI (APC-konjugiert)		eBioscience
Ovalbumin	Kaninchen	Pierce
p62	Meerschwein	Progen
$\gamma$ -Tubulin	Maus	Sigma

Als sekundäre Antikörper für Western Blots wurden nachfolgend aufgelistete IRDye 800CW-Antikörper der Firma Licor verwendet:

Esel-anti-Kaninchen  
Esel-anti-Maus  
Ziege-anti-Kaninchen  
Ziege-anti-Maus  
Ziege-anti-Meerschwein  
Ziege-anti-Mensch

Für die Immunfluoreszenz wurde für die Zellkernfärbung (DNA-Färbung) TOTO-3 (Firma Invitrogen) in einer Verdünnung von 1:40000 eingesetzt. Des Weiteren wurden folgende Fluoreszenzfarbstoff-gekoppelten Antikörper verwendet:

<b>Antikörper</b>	<b>Fluorophor</b>	<b>Firma</b>
Esel-anti-Ziege	Alexa-488	Invitrogen
Ziege-anti-Maus	Alexa-488	Invitrogen
Ziege-anti-Maus	Alexa-546	Invitrogen
Ziege-anti-Meerschwein	Cy2	Jackson Immuno Research
Ziege-anti-Kaninchen	Alexa-546	Invitrogen
Ziege-anti-Kaninchen	Alexa-633	Invitrogen

### 3.1.3 Plasmide

Die konstruierten Plasmide zur Überexpression verschiedener Proteine basieren auf dem pcDNA3.1 Vektor von Invitrogen und wurden alle in der AG Höfeld generiert. Als Kontrolle wurde der GFP-exprimierende Vektor pEGFP-C(1) eingesetzt.

<b>pCDNA3.1(+/-):</b>	Überexpression von Proteinen in Säugerzellen (Invitrogen)
pCDNA3.1(+)- <i>chip</i>	
pCDNA3.1(+)- <i>hspb1</i>	
pCDNA3.1(-)- <i>bag-1</i>	
pCDNA3.1(+)- <i>bag-3</i>	
<b>pEGFP-C(1):</b>	Expression von EGFP in Säugerzellen (Clontech)

### 3.1.4 Oligonukleotide

siRNA Oligonukleotide wurden mit folgenden Targetsequenzen bei der Firma Qiagen bestellt. Die Kontroll-siRNA wurde von der Firma Dharmacon bezogen.

<b>siRNA</b>	<b>Targetsequenz</b>
<i>chip_1</i> :	CAC ACT TGT GGC AGT GTA CTA
<i>chip_2</i> :	CCG GCT CTT CGT GGG CCG CAA
<i>hspb1_1</i> :	CAG AAA GTC CAT GGC AGA CAA
<i>hspb1_2</i> :	CAG GAC CGT GAA GGC GCA CTA
<i>bag-1_1</i> :	CCG AGT CAT GTT AAT TGG TGA
<i>bag-1_2</i> :	CAG GGA GTT GAC TAG AAG TAA
<i>bag-3_1</i> :	CCG TGA TAC ATG AGC AGA ATA
<i>bag-3_2</i> :	CCC AGG TCA AGT ACA AGT CTA
Kontrolle:	SiGLO Transfektionsindikator

## 3.2 Methoden im Umgang mit eukaryontischen Zellen

### 3.2.1 RAW309 murine Makrophagen-Zelllinie

#### 3.2.1.1 Kultivierung von RAW309-Zellen

Zellkulturmedium: Dulbecco's Modified Eagle Medium  
5% FCS  
2 mM Pyrovat  
100 IU/ml Penicillin  
100 IU/ml Streptomycin

RAW309-Zellen wurden als adhärenente Einzelschicht bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> und 95% Luftfeuchtigkeit im entsprechenden Medium kultiviert. Zur Passage wurde bei einer Zellkonfluenz von 80-90% das Medium abgenommen. Anschließend wurden die Zellen abgespült, durch Auf- und Abpipettieren vereinzelt und in vorgewärmtes Medium aufgenommen. Ein Aliquot der so erhaltenen Zellsuspension wurde dann 1:4 bis 1:6 verdünnt und in eine neue Sechs-Loch-Schale überführt.

#### 3.2.1.2 Transfektion mit Fugene HD

Die Transfektion erfolgte unter Verwendung eines kommerziell erhältlichen Transfektionskits (Fugene HD Transfection Reagent, Roche) nach Anleitung des Herstellers. Die Zellen wurden so passagiert, dass sie am Tag der Transfektion zu 50-80% konfluent waren. Vor Zugabe der Transfektionslösung wurde das Medium gegen Serum- und Antibiotika-freies Medium gewechselt. Für Transfektionen in Sechs-Loch-Schalen wurde pro Loch folgender Transfektionsansatz pipettiert:

Plasmid-DNA	2 µg
Fugene HD Transfektionsreagenz	6 µl
→	mit Medium auf ein Endvolumen 100 µl aufnehmen

Der Ansatz wurde anschließend 10 sek gevortext. Es folgte eine 15-minütige Inkubation bei Raumtemperatur. Im Anschluss wurde die Transfektionslösung auf die Zellen pipettiert. Nach ca. 8-16 h erfolgte ein erneuter Mediumwechsel gegen Vollmedium und eine abschließende Inkubation für 24 h. Im Anschluss daran wurde die Kinetik durch LPS-Zugabe gestartet. Zur Ermittlung der Transfektionseffizienz diente optional ein Kontrolltransfektionsansatz mit dem EGFP-Expressionsplasmid als Marker.

### 3.2.2 Infektion von RAW309-Makrophagen mit Adenoviren

Für die Immunfluoreszenz von Ovalbumin in DALIS wurden  $5 \times 10^4$  RAW309-Zellen auf ein 12,5 mm Deckglas ausgesät. Die Zellen wurden mit  $1 \times 10^5$  Virus-Partikeln/Zelle eines Ovalbumin-exprimierenden Adenovirus (AdOVA) (bereitgestellt von Dr. A. Limmer, Universität Bonn) in einem Volumen von 100  $\mu$ l infiziert. 30 min nach Infektion wurden 250  $\mu$ l frisches Medium hinzugegeben. Nach 12 h wurden die Zellen fixiert und gefärbt (Kap. 3.6.1).

### 3.2.3 Murine dendritische Zellen

#### 3.2.3.1 Isolierung muriner Knochenmarksmonozyten

PBS: 137 mM *NaCl*  
2,7 mM *KCl*  
8 mM *Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>*  
1,4 mM *KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>*  
pH 7,4  
autoklaviert

Die Gewinnung muriner Knochenmarksmonozyten erfolgte durch das Ausspülen der Ober- und Unterschenkelknochen. Hierzu wurde die Maus auf dem Rücken liegend mit Nadeln fixiert und die Haut der Hinterbeine entfernt. Durch Entfernen von Muskulatur und Sehnen wurden die Knochen freigelegt und in Höhe der

Hüftgelenke abgetrennt. Die Knochen wurden in PBS auf Eis gelagert. Das Knochenmark wurde unter sterilen Bedingungen mit PBS ausgespült. Hierzu wurden Kanülen mit einem Außendurchmesser von 0,4 mm benutzt. Die Zellen wurden durch Auf- und Abpipettieren vereinzelt, über ein Zellsieb gegeben (Porengröße 40  $\mu\text{m}$ , B & D) und ausplattiert. Die Zellen wurden entweder direkt in Kultur genommen, oder bei  $-80^{\circ}\text{C}$  eingefroren.

### 3.2.3.2 Kultivierung von murinen Monozyten und Differenzierung zu dendritischen Zellen

Zellkulturmedium: VLE Dulbecco's Modified Eagle Medium  
10% FCS  
GM-CSF (30% Gesamtvolumen aus Hybridom Zellüberstand)  
100 IU/ml Penicillin  
100 IU/ml Streptomycin

Die Differenzierung zu dendritischen Zellen erfolgte durch Zugabe von GM-CSF aus Hybridomzellüberstand. Nach drei Tagen Kultivierung wurden 50% des Mediums abgenommen und bei 1000 rpm abzentrifugiert. Das Pellet wurde in neues Kulturmedium aufgenommen und die Zellsuspension auf die verbliebenen Zellen gegeben. Nach sechs bis sieben Tagen waren im Durchschnitt ca. 80% der Zellen zu murinen dendritischen Zellen differenziert.

### 3.2.3.3 Elektroporation von Zellen mit siRNA

Zur transienten Ausschaltung von Genen in Zelllinien und Primärzellen wurden die Zellen zunächst abgeerntet, in PBS gewaschen und bei 1000 rpm, 10 min abzentrifugiert. Für die Elektroporation von RAW309-Zellen wurden  $1 \times 10^6$ , für die Elektroporation von Primärzellen  $4 \times 10^6$  pro Ansatz eingesetzt und nach dem Waschen in jeweils 100  $\mu\text{l}$  Optimem resuspendiert. Pro Ansatz wurden jeweils 10  $\mu\text{g}$  siRNA in eine Elektroporationsküvette (Qiagen) vorgelegt und die Zellsuspension darauf gegeben. Hierbei wurden jeweils zwei unterschiedliche siRNAs pro Ansatz

gemischt um die Depletionseffizienz zu verstärken. Es folgte eine genau dreiminütige Inkubation bei Raumtemperatur mit anschließender Elektroporation in einem Bio-Rad *Gene Pulser X cell* mit *CE module* und *shock pod* mit folgenden Einstellungen:

Programm	Squarewave
Spannung	1000 V
Anzahl der Pulse	2
Zeitintervall	5 sek
Pulsdauer	0,5 msec
Küvetten Schichtdicke	4 mm

Anschließend wurden die Zellen ausplattiert und bis zur Versuchsdurchführung bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> und 95% Luftfeuchtigkeit inkubiert.

#### **3.2.3.4 Infektion von murinen dendritischen Zellen mit Adenoviren**

Zur Infektion der BMDCs wurde ein rekombinantes Adenovirus verwendet, welches Gene für Luciferase, Ovalbumin und GFP codiert (AdLOG) (bereitgestellt von Dr. A. Limmer, Universität Bonn). Zur Kontrolle wurden Zellen mit Adenoviren infiziert, welche nur GFP exprimieren. Hierbei wurden BMDCs am siebten Tag nach Differenzierung mit siRNA transfiziert (Kap. 3.2.3.3). Da die Expressionslevel der Zielproteine 24 h nach siRNA Transfektion am geringsten waren, wurde die Infektion zu diesem Zeitpunkt durchgeführt. Dazu wurden ca.  $1 \times 10^6$  BMDCs pro Sechsl Loch-Platte in 500  $\mu$ l Medium ausgesät und mit 10000-15000 Viruspartikeln/Zelle infiziert. Nach 30-180 min wurden 500  $\mu$ l frisches Medium hinzugegeben. Nach 12 h Inkubation mit gelegentlichem Schwenken der Platte wurden die Zellen abgeschabt und dreimal mit PBS gewaschen. Anschließend wurden die infizierten Zellen in einen Cytokintest eingesetzt.

### 3.2.4 Murine T-Zellen aus Milzzellen

#### 3.2.4.1 Isolierung von murinen Milzzellen

Zur Isolation von murinen Milzzellen für die anschließende Generierung von T-Zellen wurde zunächst die Milz einer OT-1 Maus entnommen. Die Milz wurde mit Hilfe eines Spritzenstempels durch ein Zellsieb gedrückt. Das Sieb wurde mit 10 ml PBS gespült, die Zellen durch Auf- und Abpipettieren vereinzelt und bei 1500 rpm, 10 min zentrifugiert. Nach einem weiteren Waschschrift wurden die Zellen in 3,5 ml RPMI-Medium aufgenommen.

Zellkulturmedium: RPMI 1640 inkl. HEPES  
8% FCS  
2 mM Glutamin  
100 IU/ml Penicillin  
100 IU/ml Streptomycin  
50  $\mu$ M 2-Mercaptoethanol

#### 3.2.4.2 Aufreinigung von CD8<sup>+</sup>-Zellen aus Milzzellen

Wurden für die Gewinnung von CD8<sup>+</sup>-Zellen (OT-1) RAG-defiziente Mäuse verwendet, welche außer CD8<sup>+</sup>-Zellen keine weiteren Lymphozyten produzieren können, konnte die Aufreinigung mittels Nylon-Filtration erfolgen. Hierbei wurde von einer 10 ml Spritze der Stempel entfernt und die Spritze mit kleingeschnittener Nylon-Wolle gefüllt. Diese wurde mit 2% FCS in PBS gespült. Anschließend wurde die Spritze verschlossen und erneut mit 2% FCS in PBS gefüllt. Durch das Einfüllen entstandene Luftblasen wurden aus der Spritze herausgepresst. Es folgte eine 45-minütige Inkubation bei 37°C. Die FCS/PBS Lösung wurde verworfen und die Spritze mit 7 ml der Milzzellsuspension gefüllt. Die Zellsuspension fließt dabei langsam durch die mit Nylon-Wolle-gefüllte Spritze. Sobald die Zellsuspension das untere Ende der Spritze erreicht hatte, wurde diese zügig verschlossen. Die Spritze wurde abgedeckt und 60 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die OT-1-Zellen zweimal mit 10 ml 37°C warmem Medium eluiert.

Bei der Verwendung von OT-1 Tieren ohne RAG-Defizienz erfolgte die Aufreinigung mittels MACS-Sortierung. Hierbei wurde die Milzzellsuspension in 50 ml MACS-Puffer aufgenommen.

MACS-Puffer: 1x PBS  
1% FCS  
2 mM EDTA

Die Zellen wurden bei 1500 rpm, 8°C 10 min zentrifugiert, anschließend wieder in MACS-Puffer aufgenommen und über ein Zellsieb gefiltert. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt wurden die Zellen in 20 ml MACS-Puffer aufgenommen, mit 12  $\mu$ l magnetischer anti-CD8-MACS-beads versetzt und 15 min bei 4°C inkubiert. Es wurde ein weiteres Mal gewaschen, die Zellen in 5 ml resuspendiert und mit Hilfe des Auto-MACS (Miltenyi) die CD8-positiven Zellen selektiert.

#### **3.2.4.3 *In-vitro*-Cytokintest**

Für den Cytokintest wurden  $1 \times 10^5$  der Virus-infizierten BMDCs (Kap. 3.2.3.4) in einem Volumen von 100  $\mu$ l/Loch auf eine 96-Loch-Platte überführt. Aufgereinigte OT-1 Zellen (Kap. 3.2.4.2) wurden 1:1 oder 2:1 auf die BMDCs gegeben und für 24 h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Überstände abgenommen und die IL-2-Konzentration per ELISA (Kap. 3.5.7) analysiert.

### **3.3 Methoden im Umgang mit Mäusen**

Bei allen verwendeten Mäusen handelte es sich um Tiere mit einem genetischen BL6-Hintergrund.

#### **3.3.1 *In-vivo*-Cytokintest**

Den Mäusen wurden jeweils  $1 \times 10^6$  Viruspartikel intravenös in die Schwanzvene injiziert. Nach 12 h wurde die Milz entnommen und die Milzzellen isoliert (Kap.3.2.4.2). Diese wurden im Verhältnis 1:1 oder 1:2 mit OT-1 Zellen für 24 h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Überstände abgenommen und die IL-2-Konzentration per ELISA (Kap. 3.5.7) analysiert.

## 3.4 Molekularbiologische Methoden

### 3.4.1 Plasmidpräparation

#### 3.4.1.1 Plasmid-DNA-Maxipräparation

Zur präparativen Isolierung großer Mengen Plasmid-DNA aus *E.coli* dienen kommerzielle DNA-Isoliersysteme der Firmen Qiagen oder Macherey-Nagel. Dabei wurde jeweils gemäß den Angaben der Hersteller vorgegangen.

#### 3.4.1.2 Plasmid-DNA-Minipräparation

Für eine Plasmidpräparation in kleinem Maßstab wurden 1,5 ml einer 2 ml Übernachtskultur 1 min bei 13000 rpm zentrifugiert. Nach Abnahme des Überstands wurde das Zellpellet in 100  $\mu$ l Lösung I resuspendiert. Die alkalische Lyse der Bakterienzellen erfolgte anschließend durch Zugabe von 200  $\mu$ l Lösung II und mehrmaliges Invertieren des Reaktionsgefäßes. Zur Fällung von denaturierten Proteinen und genomischer DNA wurden abschließend 150  $\mu$ l Lösung III zugefügt. Das Gemisch wurde 10 min bei 13000 rpm und 4°C abzentrifugiert. Durch Zugabe von Phenol-Chloroform-Lösung gleichen Volumens konnten im Anschluss Proteine aus dem Überstand extrahiert werden. Nach 2-minütiger Zentrifugation bei 13000 rpm wurde das Phenol durch Zugabe gleicher Volumina Chloroform aus dem Überstand entfernt. Nachdem dem Überstand zwei Volumina Ethanol abs. zugegeben worden waren, erfolgte die DNA-Fällung bei -20°C für mindestens 30 min. Die gefällte DNA wurde für 5 min bei 13000 rpm abzentrifugiert und im Anschluss mit 200  $\mu$ l 70% Ethanol gewaschen. Abschließend wurde das DNA-Pellet getrocknet und in 30  $\mu$ l TE-Puffer aufgenommen.

Zur Isolierung von Plasmid-DNA für die Sequenzierung dienen kommerziell erhältliche DNA-Isoliersysteme der Firma Qiagen.

Lösung I:     50 mM Glucose  
              25 mM Tris/HCl, pH 8  
              10 mM EDTA, pH 8

Lösung II:    0,2 N NaOH

1% SDS

Lösung III: 60 ml 5 M Kaliumacetat  
11,5 ml Eisessig  
28,2 ml A. bidest

TE-Puffer: 10 mM Tris/HCl, pH 8  
1 mM EDTA

### 3.4.2 Bestimmung der Konzentration von Nukleinsäuren

Die Konzentrationsbestimmung erfolgte photometrisch bei einer Wellenlänge von 260 nm. Eine Extinktion von 1 bei 260 nm entspricht dabei einer Konzentration von 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  für doppelsträngige DNA.

### 3.4.3 Verdau von DNA mittels Restriktionsendonukleasen

Die Restriktionsenzyme sowie die dazugehörigen Puffer wurden gemäß Herstellerangabe verwendet. Dabei wurden für präparative Restriktionen 1-2  $\mu\text{g}$  DNA mit 2 U der Restriktionsenzyme und der entsprechenden Puffer für bis zu 3 h bei 37°C inkubiert.

### 3.4.4 DNA-Agarosegelelektrophorese

TBE-Laufpuffer: 90 mM Tris-Base  
90 mM  $\text{H}_3\text{BO}_3$   
2,5 mM EDTA  
1% Agarose in TBE  
Ethidiumbromid

Die Auftrennung geschnittener DNA erfolgte mittels Agarosegelen in Gegenwart von Ethidiumbromid. Es wurde eine Agarosekonzentration von 1% in TBE verwendet. Dazu wurde die entsprechende Menge Agarose durch Aufkochen in der

Mikrowelle in TBE-Puffer gelöst. Vor dem Erstarren wurden 2  $\mu$ l Ethidiumbromid zu 50 ml flüssiger Agarose gegeben. Die DNA wurde mit Ladepuffer versetzt und in die Geltaschen aufgetragen. Der Gellauf erfolgte bei 100 V für 30-60 min. Das DNA-Bandenmuster konnte im Anschluss mittels UV-Licht sichtbar gemacht und dokumentiert werden (BioRad *GelDoc XRS*). Zur Größenbestimmung diente ein Längenstandard (Fermentas).

### **3.4.5 Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen**

Die Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen diente der Aufreinigung von präparativen Restriktions-Ansätzen. Dafür wurde entweder das „MiniElut GelExtraktion Kit“ (Qiagen) oder das „NucleoSpin Extract Kit“ (Macherey-Nagel) gemäß Vorschrift der Hersteller verwendet.

### **3.4.6 Ligation von DNA**

Die Konzentration der einzelnen DNA-Fragmente wurde aufgrund der Intensität der Gelbanden abgeschätzt. Das Fragment und der Vektor wurden für die Ligation mindestens im Verhältnis 10:1 eingesetzt. Die Ligation erfolgte mit der  $T_4$ -DNA-Ligase im dazugehörigen Puffer (16 h bei 16°C).

### **3.4.7 DNA-Sequenzanalyse**

Die Sequenzierung klonierter DNA-Konstrukte erfolgte durch die Firma GATC Biotech AG.

## **3.5 Proteinbiochemische Techniken**

### **3.5.1 Herstellung von Proteinextrakten**

Zur Herstellung von Zellextrakten aus *E. coli* oder HeLa-Zellen wurden diese zunächst bei 4°C und 5000 rpm für 7 min pelletiert und mit PBS gewaschen. Die Zellen wurden in Lysepuffer folgender Zusammensetzung resuspendiert:

Lysepuffer RIPA: 25 mM Tris pH 8  
150 mM *NaCl*  
0,1% SDS  
0,5% Natriumdeoxycholat  
1% Nonidet P-40  
10% Glycerol  
2 mM EDTA  
1 x „complete“ Proteaseinhibitor

Die Zellsuspension wurde für 30 min auf Eis inkubiert und regelmäßig gevortext. Sollte im Anschluss ein *filter trap* durchgeführt werden, wurden die Lysate 6 x 10 sek auf höchster Stufe mit Ultraschall behandelt und die Proteinkonzentration bestimmt.

Für einen Western Blot wurde das so erhaltene Lysat mit einer entsprechenden Menge Probenpuffer auf 8  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  aufgenommen.

### 3.5.2 Bestimmung der Proteinkonzentration

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration wurden die einzelnen Proben zunächst in  $H_2O$  vorverdünnt und anschließend 1:50 mit BRADFORD-Lösung verdünnt. Die Proteinkonzentration konnte danach durch Messung der Absorption bei einer Wellenlänge von 595 nm ermittelt werden. Das dazu verwendete Photometer wurde zuvor durch eine IgG-Standard-Verdünnungsreihe (Sigma) geeicht. Alternativ wurde die Bestimmung per ELISA-*reader* durchgeführt. Hierzu wurde zunächst eine Eichreihe mit  $\gamma$ -Globulin in den Konzentrationen zwischen 200 und 0  $\mu\text{g}/\text{ml}$  angesetzt und jeweils 50  $\mu\text{l}$  in einer Dreifachbestimmung auf eine 96-Loch-Platte gegeben. Die Proben wurden 1:400 verdünnt und jeweils 50  $\mu\text{l}$  in dreifacher Ausführung auf die Platte gegeben. Anschließend wurden 200  $\mu\text{l}$  Bradfordreagenz hinzupipettiert und die Absorption bei 595 nm in dem Auslesegerät ELX-800 der Firma BioTek Instruments vermessen.

### 3.5.3 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Elektrophoresepuffer: 25 mM Tris-Base  
190 mM Glycin  
1% SDS

Probenpuffer (4x): 8% SDS  
40% Glycerol  
240 mM Tris/HCl pH 6,8  
0,02% Bromphenolblau  
100 mM DTT oder  $\beta$ -Mercaptoethanol (frisch hinzugeben)

Trenngele (Ansatz für zehn Gele):

<b>Gelkonzentration:</b>	<b>7,5%</b>	<b>10%</b>	<b>12,5%</b>	<b>15%</b>
1,5 M Tris pH 8,8	15,2 ml	15,2 ml	15,2 ml	15,2 ml
30% Aa/0,8% BisAa	15,1 ml	20 ml	25,2 ml	30,2 ml
H <sub>2</sub> O	28,9 ml	24 ml	18,7 ml	13,7 ml
10% SDS	890 $\mu$ l	890 $\mu$ l	890 $\mu$ l	890 $\mu$ l
10% APS	390 $\mu$ l	390 $\mu$ l	390 $\mu$ l	390 $\mu$ l
TEMED	38 $\mu$ l	38 $\mu$ l	38 $\mu$ l	38 $\mu$ l

Sammelgele (Ansatz für fünf Gele):

1 M Tris pH 6,5	2 ml
30% Aa/0,8% BisAa	1,33 ml
H <sub>2</sub> O	4,41 ml
10% SDS	240 $\mu$ l
10% APS	80 $\mu$ l
TEMED	8 $\mu$ l

Die Auftrennung der Proteine nach ihrem Molekulargewicht erfolgte mittels der diskontinuierlichen SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese. Der Gellauf wurde bei einer Stromstärke von 25-30 mA durchgeführt. Zum Größenvergleich dienten Protein-Marker von BioRad oder *Prestained* Marker von Fermentas.

### 3.5.4 Färbung von Polyacrylamidgelen

#### 3.5.4.1 Coomassie-Färbung:

Coomassie-Lösung: 50% Methanol  
10% Essigsäure  
0,125% Coomassie Brilliant Blue R-250

Entfärbelösung: 50% Methanol  
10% Essigsäure

Die Gele wurden für 3 x 10 sec in der Färbelösung aufgeköcht und im Anschluss weitere 5 min bei RT oder ohne Aufkochen 30 min bei RT geschwenkt. Nachdem die Färbelösung abgegossen wurde, konnten durch mehrmaliges Schwenken in Entfärbelösung die Banden sichtbar gemacht werden. Die Gele wurden zur Dokumentation mit Hilfe eines Licor ODYSSEY IMAGERs bei einer Wellenlänge von 680 nm eingescannt.

### 3.5.5 Western Blot

Transferpuffer: 20 mM Tris-Base  
144 mM Glycin  
20% Methanol  
0,01% SDS

TBST-Puffer: 20 mM Tris-Base  
137 mM *NaCl*  
0,006% Triton X-100  
pH 7,6

Blockpuffer: 2% Milchpulver in TBST

Die mittels SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (Kap. 3.5.3) aufgetrennten Proteine wurden in einer *Tankblot*-Apparatur gemäß Herstelleranleitung auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Der Transfer erfolgte für 1,5 h bei 300 mA. Im Anschluss wurde die Membran zur Kontrolle des Transfers sowie zur Detektion der Proteinbanden und des Markers für kurze Zeit in Ponceau S-Lösung geschwenkt und der Hintergrund mit A. bidest entfärbt. Für die immunochemische Detektion von Proteinbanden wurde die Membran zuerst für 30-60 min bei RT blockiert und dann mit einer 1:1000 Verdünnung des primären Antikörpers in Blockpuffer ü. N. bei 4°C auf dem Schüttler inkubiert. Nach drei Waschschritten von je 5 min mit TBST erfolgte im Anschluss die Inkubation mit einem entsprechenden sekundären Antikörper. Nach dreimaligem Waschen in TBST folgte die Detektion der Immunmarkierung mittels des Licor ODYSSEY IMAGERS. Im Falle des p62 Primärantikörpers wurde der Blot für 1 min in ECL-Lösung inkubiert und die Chemilumineszenz mit Hilfe eines Hyperfilms detektiert.

### 3.5.6 *Filter trap*

Zur *filter trap*-Analyse wurde eine Dot-Blot-Apparatur der Firma Whatman benutzt. Diese basiert auf einem Vakuum-Blot-System, bei dem Detergenz-unlösliche Proteine auf eine Membran geblottet werden. Hierzu wurden die Zellen geerntet und lysiert (Kap. 3.5.1) und mit Ultraschall behandelt (100 %, Stufe 1). Die Proteinkonzentrationen wurden bestimmt (Kap. 3.5.2) und eine SDS-Probe mit einer Konzentration von 4-10  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  hergestellt. Die Proben wurden auf ein Gel aufgetragen, Coomassie gefärbt (Kap. 3.5.4) und anschließend im Licor ODYSSEY IMAGER eingescannt und die Bandenstärke quantifiziert. Dies diente der genaueren Bestimmung der Proteinkonzentration. 20-50  $\mu\text{g}$  Protein wurden in 500  $\mu\text{l}$  RIPA-Puffer gelöst und auf die *filter trap* Apparatur aufgetragen. Nach zweimaligem Waschen konnte die Nitrozellulosemembran blockiert und ü. N. mit Primärantikörper inkubiert werden.

### 3.5.7 ELISA

Das im Cytokintest (Kap. 3.2.4.3) produzierte Cytokin IL-2 wurde durch einen *Enzyme Linked Immunosorbent Assay* (ELISA) nachgewiesen. Hierbei wurde der Primärantikörper 1:500 in Beschichtungspuffer (0,1 M  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , pH 8,5) aufgenommen und 50  $\mu\text{l}$ /Loch in eine 96-Loch-Platte gegeben, mit Klebefolie abgedichtet und ü. N. bei 4°C inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Antikörperlösung abgenommen und die Platte viermal mit Waschpuffer (0,2% Tween 20 in PBS) gewaschen. Anschließend wurde mit 80-100  $\mu\text{l}$  Blockierlösung (1% BSA in PBS) 30-60 min bei RT blockiert. Es folgten erneut vier Waschschrte. Als Referenz für die später gemessenen Werte wurde eine Standardreihe von IL-2 in den Verdünnungen von 80 ng/ml bis 0,02 ng/ml erstellt und jeweils 50  $\mu\text{l}$  in Dreifachbestimmung aufgetragen. Von den zu messenden Proben wurden ebenfalls dreimal 50  $\mu\text{l}$  aufgetragen und ü. N. bei 4°C inkubiert. Es folgten drei Waschschrte und die Inkubation mit Sekundärantikörper (1:500 in 50  $\mu\text{l}$ /Loch) für 3 h bei RT. Nach drei weiteren Waschschrten wurden 0,05% Meerrettich Peroxidase in PBS in die Platte pipettiert und 30 min bei RT inkubiert. Als Substrat wurden 50  $\mu\text{l}$  3,3',5,5'-Tetramethylbenzidinbase (TMB) zugegeben und die Extinktion bei 650 nm im ELISA-Auslesegerät (Firma Molecular Devices) gemessen. Die enzymatische Reaktion wurde durch die Zugabe von 50  $\mu\text{l}$  0,18 M  $\text{H}_2\text{SO}_4$  abgestoppt und die Extinktion bei 450 nm gemessen.

## 3.6 Zellbiologische Methoden

### 3.6.1 Immunfärbung

Für den mikroskopischen Nachweis wurden Zellen auf Deckgläsern mit 12,5-15 mm Durchmesser in 12- oder 24-Loch-Platten ausgesät. Nach der Maturation mit LPS wurden die Zellen dreimal mit PBS gewaschen und mit 4% Paraformaldehyd in PBS für 20 min bei RT fixiert. Nach drei weiteren Waschschrten wurden die Zellen in 3% BSA für 1 h blockiert. Anschließend wurde erneut dreimal gewaschen. Dazu wurden die Deckgläser nacheinander in drei Gefäße mit PBS getaucht. Die Inkubation mit Primärantikörper in PBS erfolgte für eine Stunde bei RT in einer abgedunkelten Feuchtkammer. Nach dreimaligem Waschen folgte die Inkubation

mit Alexa- oder Cy-gekoppelten Sekundärantikörpern in PBS für 1 h bei RT. Anschließend wurde wiederholt gewaschen, im letzten Schritt mit A. bidest, und die Deckgläser mit Mowiol eingedeckelt. Nach einer 24-stündigen Trocknungsphase konnten die Zellen mit einem Axiovert Laser-Scanning Mikroskop (Zeiss) ausgewertet werden.

### 3.6.2 FACS

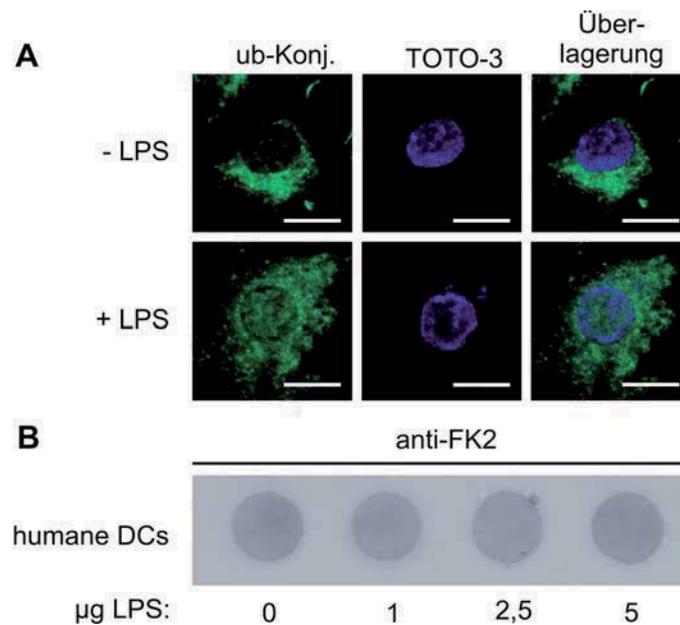
Mindestens  $1 \times 10^5$  Zellen pro Ansatz wurden mit FACS Puffer (1% FCS in PBS) gewaschen (1500 rpm, 10 min) und in 100  $\mu$ l resuspendiert. Fc Rezeptoren wurden mit einer 1:200 Verdünnung des Fc Antikörpers 20 min bei RT blockiert. Anschließend wurden die Zellen 15 min in einer 1:200 Verdünnung des APC-konjugierten MHCI-Antikörpers inkubiert. Als Kontrolle wurden ungefärbte Zellen eingesetzt. Nach einem weiteren Waschschrift wurde die Fluoreszenz mit einem BD LSRII *flow cytometer* bestimmt.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Transiente Aggregation ubiquitinerter Proteine - DALIS

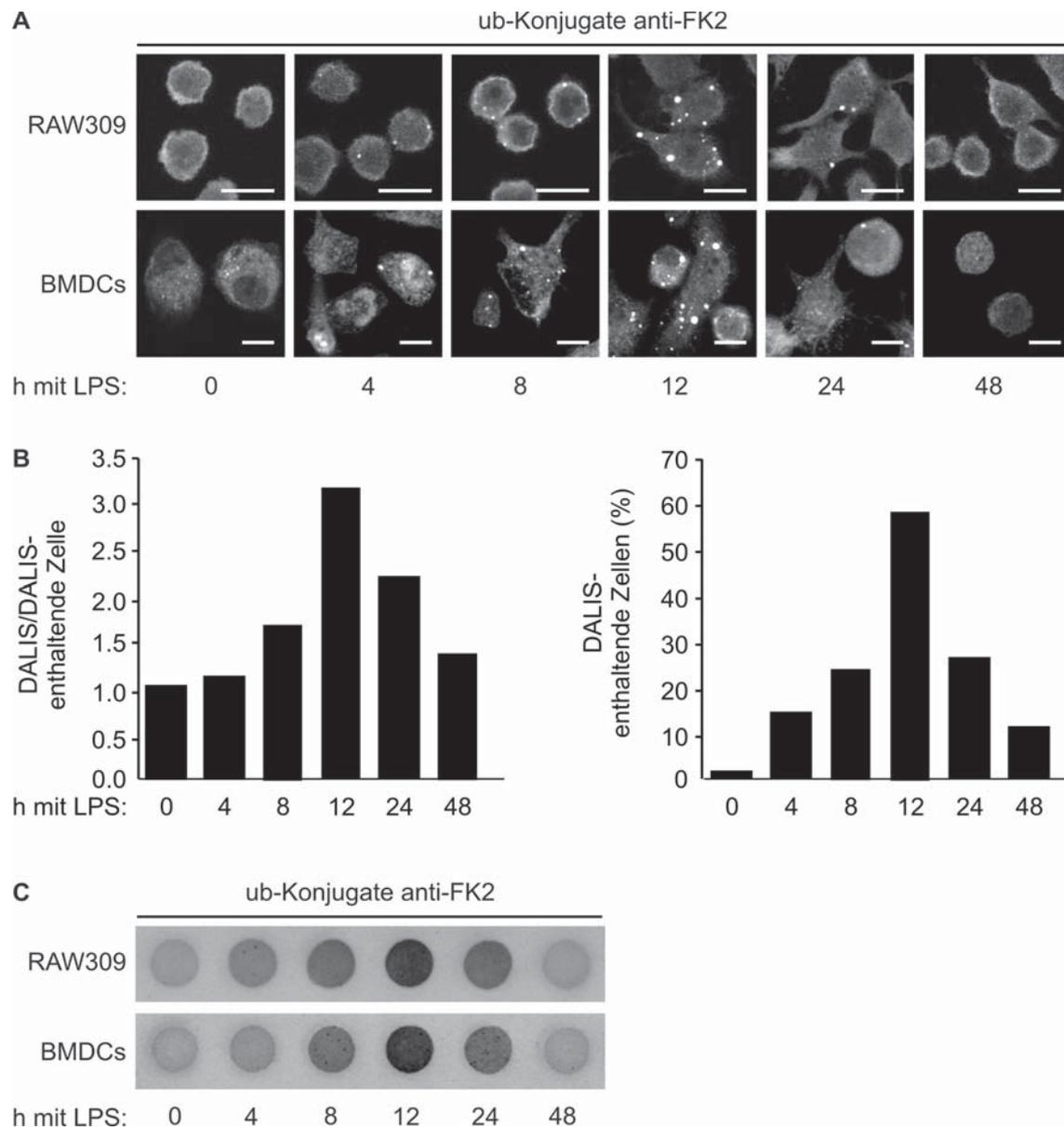
Zur Untersuchung der DALIS sollte zunächst ein geeignetes Modellsystem etabliert werden. Der DALIS-Nachweis erfolgte hierbei mit Hilfe eines  $\alpha$ -Ubiquitin-Antikörpers (FK2). Dieser detektiert mono- und polyubiquitinierte Proteine, jedoch kein freies Ubiquitin. Da DALIS zuerst in humanen LCs (*Langerhans cells*) entdeckt wurden [Lelouard *et al.*, 2002], sollten zunächst LCs aus Hautproben isoliert werden (Kooperation AG Nowak, Universität Bonn). Hierbei war jedoch die Ausbeute an LCs zu gering, um damit biochemische und histologische Versuche durchführen zu können. Des Weiteren wurden Monozyten aus humanen Blutkonserven isoliert und durch die Cytokine IL-4 und GM-CSF zu DCs (*dendritic cells*) differenziert. Allerdings konnten in diesem Zelltyp mittels des FK2-Antikörpers weder im mikroskopischen Nachweis (Abb. 4.1 A), noch mit Hilfe eines Vakuum-Blot-Systems (*filter trap*) DALIS detektiert werden (Abb. 4.1 B). Dies könnte entweder daran liegen, dass durch den Vorgang der Präparation die transiente Aggregat-Bildung schon vor der Differenzierung zu DCs stattgefunden hat, oder dass humane DCs zwar Aggregate bilden, die darin enthaltenen Proteine jedoch nicht ubiquitiniert und daher mit dem FK2-Antikörper nicht nachweisbar sind.

Zur Untersuchung der DALIS-Bildung wurde die murine Makrophagen-ähnliche Zelllinie RAW309 gewählt, da diese wie humane LCs und murine BMDCs (*bone marrow dendritic cells*) auf einen inflammatorischen Stimulus hin Aggregate ausbildet, welche dieselben Eigenschaften wie DALIS aufweisen. In Abb. 4.2 A ist die transiente Erscheinung der Aggregate im zeitlichen Verlauf mit Hilfe des FK2-Antikörpers mikroskopisch dargestellt. DALIS erscheinen ca. vier bis acht Stunden nach LPS-Stimulierung, erreichen ihre maximale Größe und Anzahl nach zwölf



**Abbildung 4.1: Aus Monozyten generierte humane DCs zeigen keine DALIS nach LPS-Induktion.** (A) Immunfluoreszenz von humanen DCs. Aus Monozyten generierte DCs blieben unbehandelt (- LPS) oder wurden mit 5 µg LPS stimuliert (+ LPS) und mit dem FK2-Antikörper angefärbt. Der Zellkern wurde mit TOTO-3 gefärbt. Größenmarker: 10 µm. (B) *filter trap*-Analyse von humanen DCs. Die Zellen blieben unbehandelt, oder wurden mit angegebenen Mengen LPS stimuliert. Nach 12 h Inkubation wurden die Zellen mit detergentzhaltigem Puffer lysiert und 50 µg Protein durch eine Nitrozellulosemembran filtriert. Detergenz-unlösliche Ubiquitin-Konjugate konnten mittels des FK2-Antikörpers nicht nachgewiesen werden.

bis 16 Stunden, bevor ihre Anzahl wieder geringer wird und sie nach 48 Stunden nicht mehr detektierbar sind. Um auszuschließen, dass die Verminderung der DALIS-Anzahl zu späten Zeitpunkten durch die Aufteilung auf Tochterzellen im Zuge der Zellteilung zurückzuführen ist, wurden die DALIS-enthaltenden Zellen im Verlauf der Kinetik gezählt. Da die Anzahl der Zellen, die DALIS enthalten mit Zunahme der DALIS zu Beginn der Kinetik steigt und mit der Verringerung der DALIS-Anzahl zu späteren Zeitpunkten sinkt, kann eine zellteilungsbedingte Verringerung der DALIS-Anzahl ausgeschlossen werden (Abb. 4.2 B). Zusätzlich zum mikroskopischen Nachweis wurde zum biochemischen Nachweis der DALIS eine *filter trap*-Analyse durchgeführt (Abb. 4.2 C). RAW309-Makrophagen wurden zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach LPS-Stimulierung geerntet, aufgeschlossen (Kap. 3.5.1) und das Lysat im *filter trap* durch eine Nitrozellulosemembran filtriert (Kap. 3.5.6). Mittels des FK2-Antikörpers konnten Detergenz-unlösliche Bestandteile anschließend detektiert werden.



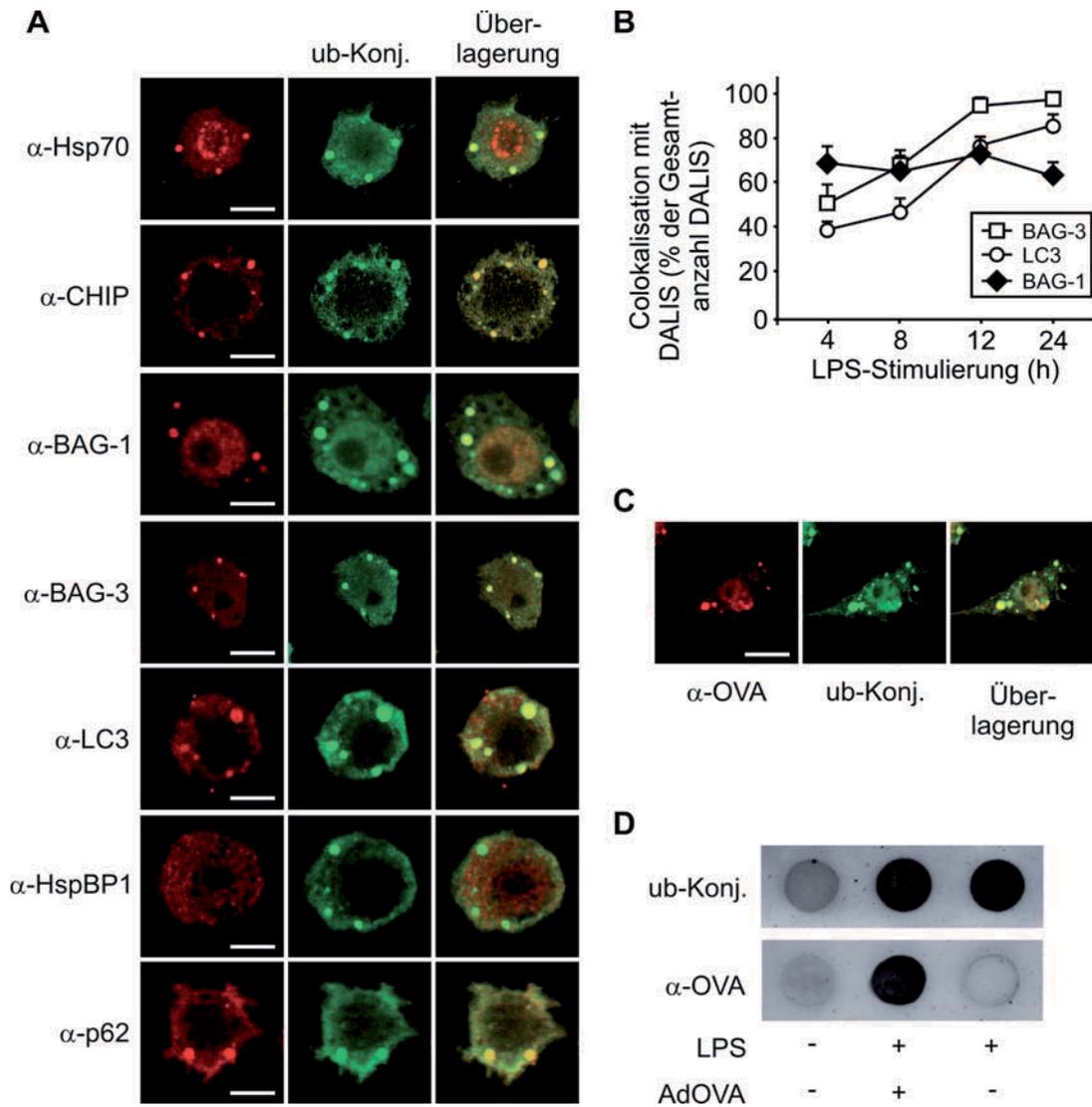
**Abbildung 4.2: Transiente Bildung von DALIS in Immunzellen.** (A) Immunfluoreszenz der DALIS. RAW309 bzw. BMDCs wurden mit LPS stimuliert und Ubiquitin-Konjugate mit dem FK2-Antikörper immunhistochemisch nachgewiesen. Größenmarker: 10  $\mu\text{m}$ . (B) Quantifizierung der DALIS aus (A). Die Diagramme zeigen die durchschnittliche DALIS-Anzahl pro Zelle zu angegebenen Zeitpunkten sowie die prozentuale Anzahl der DALIS-positiven Zellen. (C) *filter trap*-Analyse der DALIS. RAW309-Zellen wurden mit LPS stimuliert. Nach Lyse der Zellen mit detergentenhaltigem Puffer zu den angegebenen Zeitpunkten wurden 50  $\mu\text{g}$  Protein durch eine Nitrozellulosemembran filtriert und Detergenz-unlösliche Bestandteile (ub-Konjugate) mittels FK2-Antikörper nachgewiesen.

## 4.2 Co-Chaperone der Hsc/Hsp70-Maschinerie und Komponenten der Abbauwege colokalisieren mit DALIS

Um die molekularen Hintergründe der transienten DALIS-Formation näher zu charakterisieren, wurden Colokalisationsstudien von Komponenten des Ubiquitin/Proteasom-Systems bzw. des autophagischen Abbauweges mit DALIS durchgeführt (Kap. 3.6.1). Hierbei wurden RAW309-Makrophagen mit LPS stimuliert, zu angegebenen Zeitpunkten fixiert, DALIS mit FK2-Antikörper angefärbt und jeweils stress-induziertes Hsp70, die Co-Chaperone CHIP, BAG-1, BAG-3, HspBP1 sowie der Ubiquitinadapter p62 und der Autophagosomenmarker LC3 gefärbt. Während sowohl Hsp70 und die mit Hsp70 assoziierte Ubiquitinligase CHIP als auch das Abbau-stimulierende Co-Chaperon BAG-1 mit DALIS colokalisieren, war das CHIP-inhibierende Co-Chaperon HspBP1 nicht mit DALIS assoziiert. Das Autophagie-einleitende Co-Chaperon BAG-3 sowie p62 und LC3 zeigten ebenfalls eine Colokalisation mit DALIS (Abb. 4.3 A). Die BAG-Domäne-Proteine BAG-1 und BAG-3 zeigten in ihrer Colokalisation mit DALIS eine unterschiedliche Kinetik. Im Gegensatz zu BAG-1, welches während des gesamten Zeitraums der DALIS-Kinetik in ca. 60 bis 70% der Aggregate vorzufinden ist, colokalisiert BAG-3 zu Beginn der Kinetik nur mit ca. 40% der DALIS, während es zu späteren Zeitpunkten in fast allen DALIS vorliegt. Dieselbe Kinetik ist für den Autophagosomenmarker LC3 zu beobachten (Abb. 4.3 B). Offensichtlich findet eine selektive Rekrutierung von Autophagie-vermittelten Komponenten in die DALIS statt, die eine Rolle in der Entfernung der DALIS spielen könnten.

### 4.2.1 Virus-exprimierte Proteine colokalisieren mit DALIS

Es wurde postuliert, dass endogene und virale Antigene, die auf MHCI-Molekülen auf der Zelloberfläche präsentiert werden, in DALIS aggregieren bevor sie proteasomal prozessiert werden [Lelouard *et al.*, 2002]. Um dies nachzuweisen, wurden RAW309-Zellen mit einem Ovalbumin-exprimierenden Adeno-Virus in-



**Abbildung 4.3: Kokalisation von Komponenten der Proteostase mit DALIS.** (A) RAW309-Zellen wurden für zwölf oder 24 h mit LPS stimuliert und anschließend mit Antikörpern gegen die entsprechenden Proteostase-Komponenten und mit FK2-Antikörper gegen ubiquitinierte Proteine (ub-Konj.) gefärbt. Größenmaßstab entspricht  $5 \mu\text{m}$ . (B) Quantifizierung der Kokalisation. DALIS wurden zu angegebenen Zeitpunkten nach LPS-Stimulierung gezählt und der Anteil der mit BAG-1, BAG-3 und LC3 kokalisierenden Aggregate prozentual aufgetragen. Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung der Mittelwerte von drei unabhängigen Experimenten. (C) RAW309-Zellen wurden mit Ovalbumin-codierendem Adeno-Virus infiziert und mit LPS stimuliert. Nach 12 h wurden die Zellen fixiert und mit FK2-Antikörper (ub-Konj.) bzw. Ovalbumin-Antikörper ( $\alpha$ -OVA) gefärbt. Größenmaßstab entspricht  $5 \mu\text{m}$ . (D) RAW309-Zellen wurden für 12 h mit AdOVA infiziert und mit LPS stimuliert. Kontrollzellen blieben unbehandelt oder wurden nur mit LPS stimuliert. Die Zellen wurden in detergentenhaltigem Puffer aufgeschlossen und  $50 \mu\text{g}$  Gesamtprotein wurden auf einen *filter trap* gegeben. DALIS wurden mit FK2-Antikörper (ub-Konj.) und Ovalbumin mit  $\alpha$ -OVA-Antikörper detektiert.

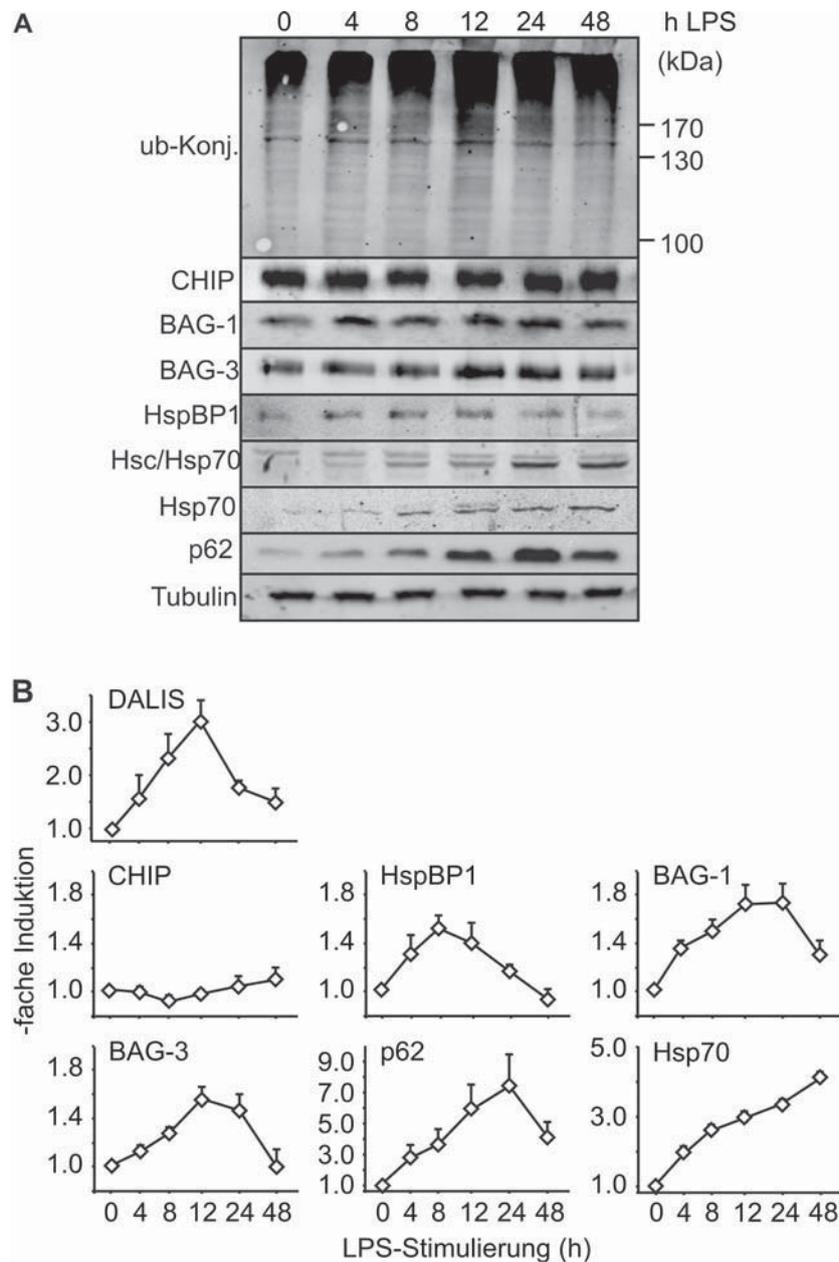
fiziert (Kap. 3.2.2). Zwölf Stunden nach Induktion der Immunzellreifung durch LPS konnte das Protein sowohl in der Immunfluoreszenz, als auch im biochemischen Nachweis mit Hilfe des *filter traps* in DALIS detektiert werden (Abb. 4.3 C und D). Somit konnte gezeigt werden, dass virale Peptide zunächst in DALIS abgelagert werden, bevor sie zur Präsentation auf MHCI-Molekülen weiter prozessiert werden.

### 4.3 Regulation der Hsc/Hsp70-Maschinerie während der Immunzellreifung

Um nähere Informationen über den Einfluss der Proteostase-Komponenten auf die DALIS-Formation zu erhalten, wurden RAW309-Makrophagen mit LPS stimuliert, zu angegebenen Zeitpunkten geerntet und lysiert (Kap. 3.5.1). Die Zell-Extrakte wurden hinsichtlich einer veränderten Expression der Proteostase-Komponenten mittels Western Blot analysiert (Kap. 3.5.5). In Abb. 4.4 sind die Expressionslevel der zu untersuchenden Komponenten dargestellt. Mittels des FK2-Antikörpers wurden die Ubiquitin-Konjugate im Verlauf der Immunzellreifung detektiert. Diese entsprechen quantitativ dem in Abb. 4.2 dargestellten kinetischen Verlauf der DALIS-Bildung. Während die CHIP-Level den gesamten Reifungsprozess über nicht reguliert sind, steigt das HspBP1-Level in der initialen Phase der DALIS-Bildung bis zu einem Maximum nach acht bis zwölf Stunden an und sinkt in der anschließenden Abbauphase der DALIS wieder ab. BAG-1- und BAG-3-Level sowie die Level des Ubiquitinadapters p62 steigen im Verlauf der Zellreifung an. Sie erreichen ihr maximales Level nach 24 Stunden, zu einem Zeitpunkt, an dem DALIS schon wieder abgebaut werden. Das Expressionslevel des stressinduzierten Chaperons Hsp70 steigt zu späten Zeitpunkten der Immunzellreifung stark an und ist nach 48 Stunden maximal, während das konstitutiv exprimierte Hsc70 nicht reguliert ist.

Der Anstieg des HspBP1-Levels zu Beginn der Immunzellreifung deutet auf eine regulatorische Funktion der CHIP-vermittelten Ubiquitinierung hin, während Abbau-assoziierte Komponenten wie BAG-1, BAG3 und LC3 zum Ende der Zellreifung bei der DALIS-Beseitigung zum Tragen kommen könnten. Das Absinken von BAG-3- und p62-Levels nach 48 Stunden LPS-Stimulierung könnte auf den

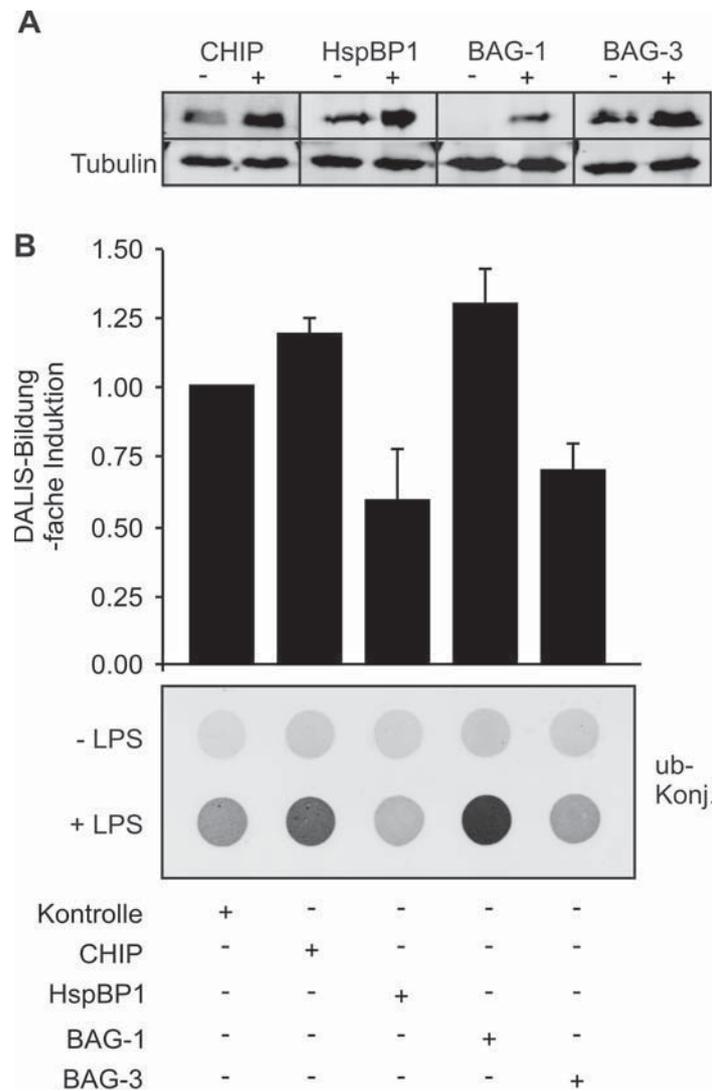
gleichzeitigen Abbau der Proteine über Autophagie zurückzuführen sein.



**Abbildung 4.4: Regulation der Abbau-Komponenten während der Immunzellreifung.** (A) Western Blot Analyse der Expressionslevel der Komponenten der Hsc/Hsp70 Co-Chaperon-Maschinerie. RAW309-Makrophagen wurden für angegebene Zeitwerte mit LPS stimuliert und jeweils 80  $\mu$ g Gesamtprotein auf einen Western Blot aufgetragen. Die Komponenten der Chaperon-Maschinerie wurden mit entsprechenden Antikörpern detektiert. (B) Quantifizierung der in (A) gezeigten Proteinbanden. Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung der Mittelwerte von mindestens drei unabhängigen Experimenten.

## 4.4 Co-Chaperone regulieren die DALIS-Bildung

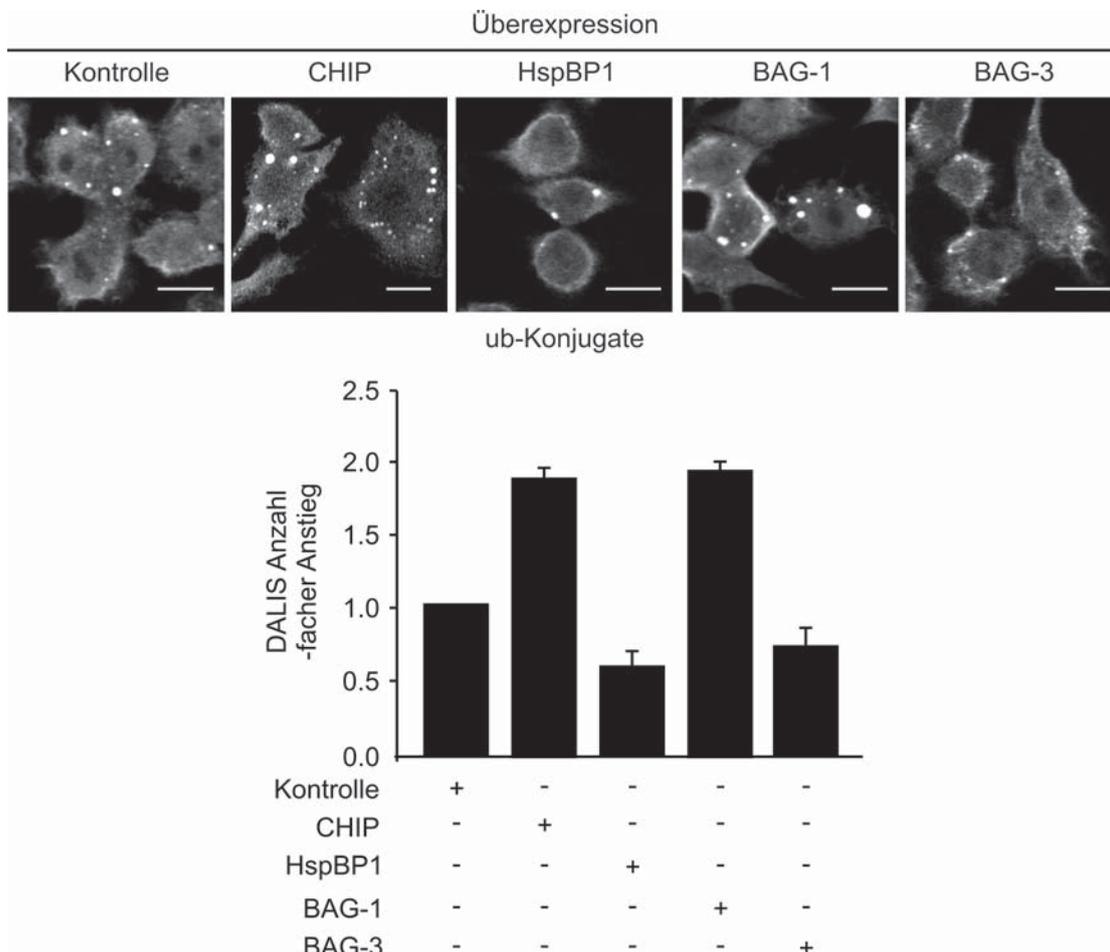
Zu Beginn sollte der Einfluss einer Überexpression der Co-Chaperone auf die DALIS-Formation getestet werden. Ursprünglich wurden DALIS in DCs beschrieben. Da sich aus Knochenmark isolierte BMDCs jedoch nicht transfizieren lassen, ohne durch den Transfektionsvorgang eine Reifung der Zellen hervorzurufen, wurden die Überexpressionsexperimente mit RAW309-Makrophagen durchgeführt. Zellen wurden transient mit pCDNA3.1(+)-*chip*, pCDNA3.1(+)-*hsbp1*, pCDNA3.1(-)*bag-1* bzw. pCDNA3.1(+)-*bag-3* und als Kontrolle mit pCDNA3.1(+)-Leervektor transfiziert (Kap. 3.2.1.2). Nach 24 Stunden, zum Zeitpunkt der maximalen Überexpression, wurde mit LPS stimuliert. Nach weiteren zwölf Stunden Inkubation wurden die Zellen geerntet, aufgeschlossen (Kap. 3.5.1) und das Lysat im *filter trap* analysiert (Kap. 3.5.6). In Abbildung 4.5 A ist die Überexpression der Co-Chaperone im Western Blot dargestellt. In Abbildung 4.5 B ist erkennbar, dass die Überexpression der Ubiquitinligase CHIP eine verstärkte DALIS-Bildung im Vergleich zur Kontrolle zur Folge hat, ebenso die Überexpression des CHIP-Stimulators BAG-1. Die Überexpression des CHIP-Inhibitors HspBP1 setzt die DaLIS-Bildung um fast 50% herab und auch die Überexpression von BAG-3 resultiert in einer verminderten Bildung von DALIS.



**Abbildung 4.5: Die Überexpression von CHIP, HspBP1, BAG-1 bzw. BAG-3 beeinflusst die Formation von DALIS in RAW309-Makrophagen.** (A) RAW309-Zellen wurden transient mit pCDNA3.1(+)-Leervektor, pCDNA3.1(+)-*chip*, pCDNA3.1(+)-*hspb1*, pCDNA3.1(-)-*bag-1* bzw. pCDNA3.1(+)-*bag-3* transfiziert und die Überexpression des jeweiligen Co-Chaperons mit entsprechenden Antikörpern im Western Blot nachgewiesen. (B) RAW309-Zellen wurden wie oben transfiziert und nach 24 h für 12 h mit LPS stimuliert (+ LPS). Nach Lyse der Zellen wurden 50  $\mu$ g Protein auf einen *filter trap* aufgetragen und ubiquitinierte Konjugate mit FK2-Antikörper detektiert. Im Diagramm ist die Quantifizierung des FK2-Signals nach Überexpression des jeweiligen Co-Chaperons dargestellt. Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung der Mittelwerte aus mindestens drei unabhängigen Experimenten.

Die Ergebnisse der biochemischen Analyse werden durch die der Immunfluoreszenz bestätigt (Abb. 4.6). Die mit dem jeweiligen Co-Chaperon transfizierten Zellen wurden nach 24 Stunden Überexpression für zwölf Stunden mit LPS stimuliert

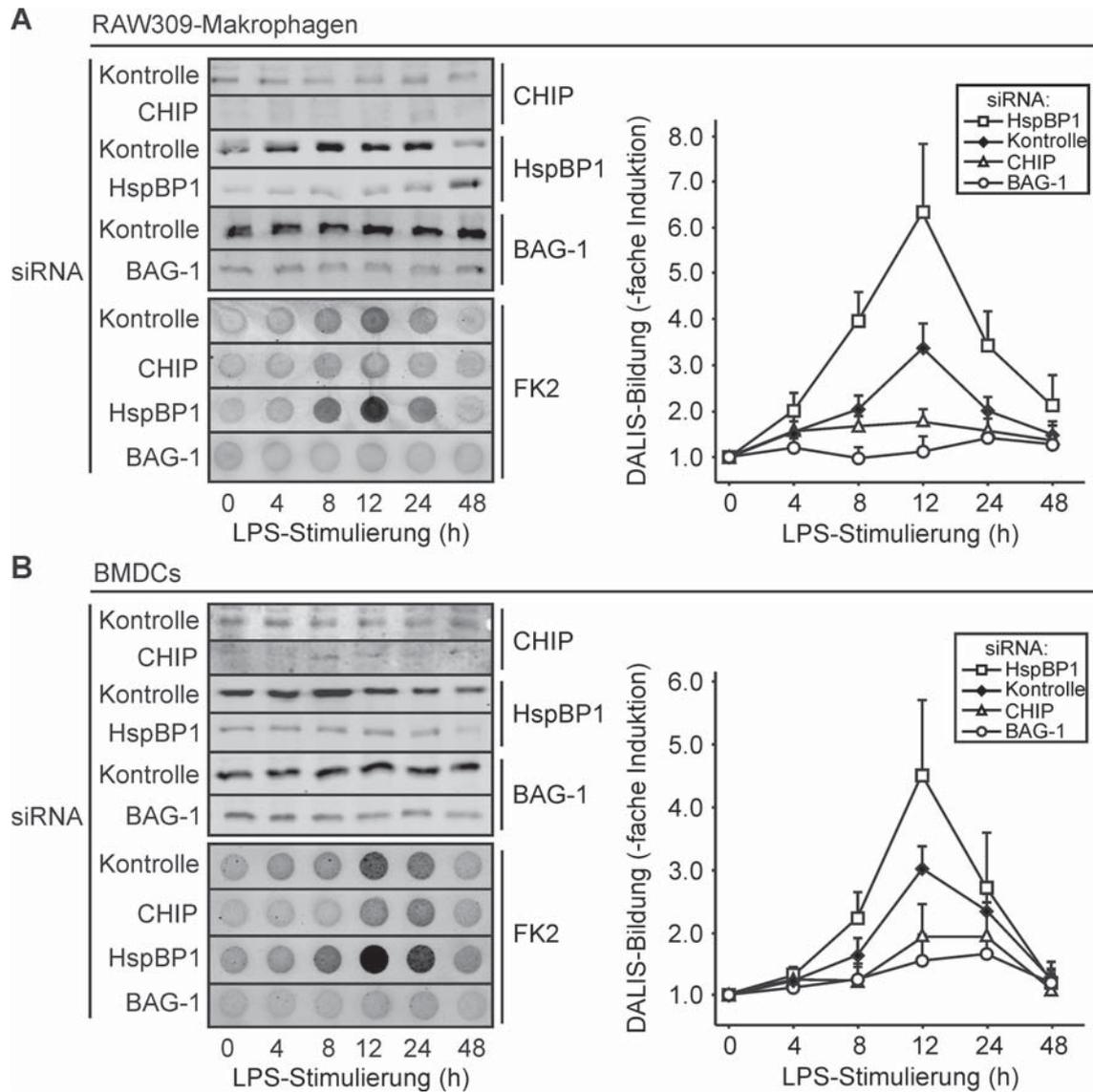
und die Anzahl der DALIS pro Zelle ausgezählt. In den initialen Schritten der Immunzellreifung scheinen BAG-1 und HspBP1 die DALIS-Bildung gegensätzlich zu beeinflussen, während BAG-3 zum Ende der Immunzellreifung als Autophagieeinleitendes Co-Chaperon an der DALIS-Beseitigung beteiligt sein könnte.



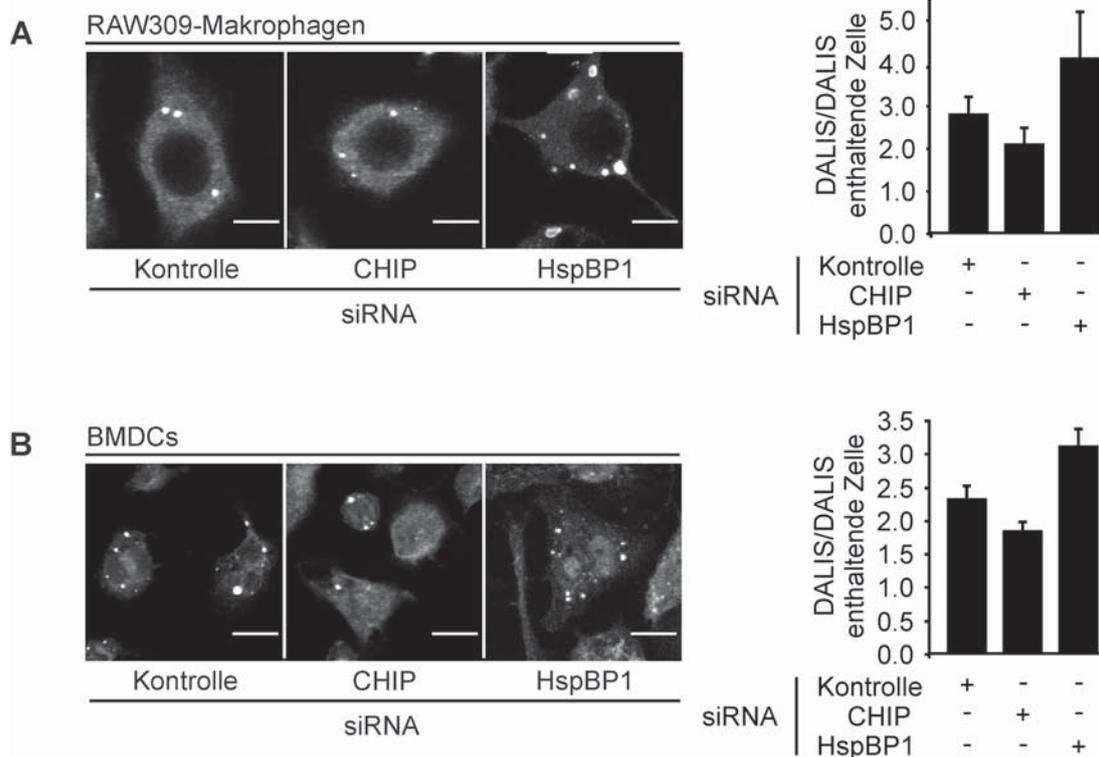
**Abbildung 4.6: Die Überexpression von CHIP, HspBP1, BAG-1 bzw. BAG-3 beeinflusst die DALIS-Menge.** Immunfluoreszenz von transfizierten RAW309-Makrophagen nach 24 h Überexpression der angegebenen Co-Chaperone und 12 h Stimulierung mit LPS. Die Graphik zeigt die Quantifizierung der ausgezählten DALIS. Die Anzahl der DALIS der Kontrollzellen wurde gleich eins gesetzt. Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung der Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten.

#### 4.4.1 CHIP und BAG-1 sind essentiell für die DALIS-Bildung

Um den Einfluss der Komponenten der Proteostase auf die Regulation der DALIS-Bildung näher zu charakterisieren, wurden Depletionen der Co-Chaperone in RAW309-Makrophagen und in BMDCs durchgeführt. Dabei wurden die Zellen mit siRNA gegen die einzelnen Co-Chaperone elektroporiert (Kap. 3.2.3.3) und zum Zeitpunkt der maximalen Depletion des entsprechenden Proteins mit LPS stimuliert. Als Kontrolle wurden Zellen mit Fluoreszenz-gekoppelter siRNA elektroporiert. Die Zellen wurden zu den angegebenen Zeitpunkten abgeerntet und nach Lyse (Kap. 3.5.1) im *filter trap* analysiert (Kap. 3.5.6). Außerdem wurden die depletierten Zellen mikroskopisch ausgewertet (Kap. 3.6.1). Eine Depletion von CHIP und BAG-1 führte zu einer stark herabgesetzten Bildung von DALIS sowohl in RAW309-Makrophagen als auch in BMDCs (Abb. 4.7). Die Ergebnisse der biochemischen Analyse konnten bei der Auswertung der Immunfluoreszenzen bestätigt werden (Abb. 4.8). Aufgrund dessen könnte CHIP die essentielle Ubiquitinligase sein, die in der ersten Phase der Immunzellreifung für die Ubiquitinierung der DRiPs verantwortlich ist. Allerdings scheint die initiale Sortierung der ubiquitinierten Substrate durch BAG-1 ebenfalls wesentlich für die Bildung der DALIS zu sein.



**Abbildung 4.7: Depletion von CHIP, HspBP1 bzw. BAG-1 beeinflusst die Formation von DALIS.** Zellen wurden mit siRNA elektroporiert und mit LPS stimuliert. Nach Lyse der Zellen wurden  $50 \mu\text{g}$  Protein auf einen *filter trap* aufgetragen, mit FK2-Antikörper gefärbt und das Antikörpersignal quantifiziert. Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung der Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten. Western Blot: Nachweis der Depletion mit CHIP-, HspBP1-, bzw. BAG-1-Antikörper. **(A)** RAW309-Makrophagen. **(B)** BMDCs.



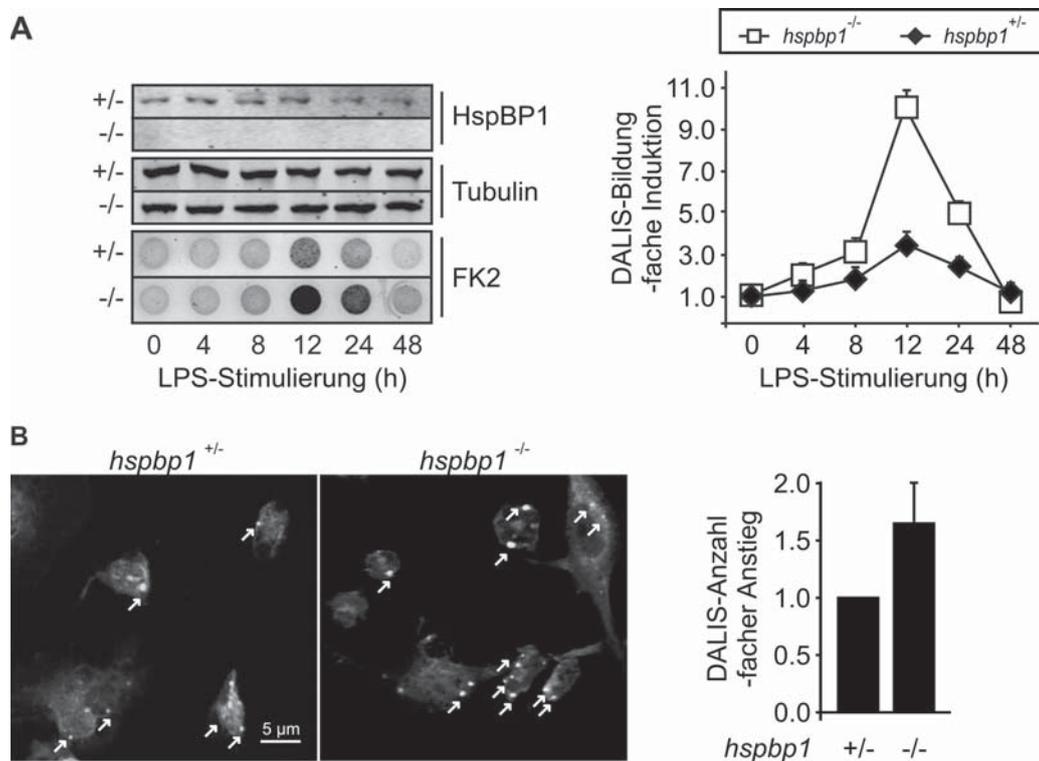
**Abbildung 4.8: Regulation der DALIS-Menge nach Depletion von CHIP, HspBP1 bzw. BAG-1.** Zellen wurden mit siRNA elektroporiert und 12 h mit LPS stimuliert und DALIS mit FK2-Antikörper angefärbt. Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung aus drei unabhängigen Experimenten. **(A)** RAW309-Makrophagen. **(B)** BMDCs.

#### 4.4.2 HspBP1 kontrolliert die CHIP-Aktivität während der Aggregat-Bildung

Die Verminderung der HspBP1-Konzentration durch siRNA-vermittelte Depletion hat eine verstärkte der Bildung von DALIS zur Folge (Abb. 4.7). In der einleitenden Phase der Immunzellreifung steigt die HspBP1-Expression an (Abb. 4.4). Als Inhibitor von CHIP verringert HspBP1 die Ubiquitinligase-Aktivität von CHIP. Wird diese regulatorische Funktion von HspBP1 ausgeschaltet, so könnte es zu einer verstärkten Ubiquitinierung der translatierten Proteine durch CHIP kommen. Die Ergebnisse einer Auszählung von DALIS in Zellen mit dem jeweilig depletierten Co-Chaperon im Vergleich zur DALIS-Anzahl in Kontrollzellen korreliert mit den biochemischen Analysen (Abb. 4.8). Es zeigt sich ein Anstieg der DALIS-Menge in Zellen mit HspBP1-Depletion.

Zur weiteren Verifizierung der Rolle von HspBP1 bei der DALIS-Formation stan-

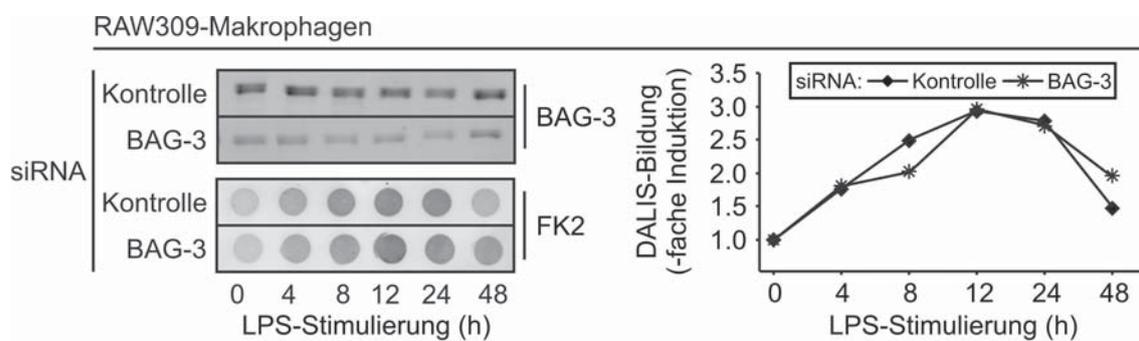
den Zellen einer homo- und heterozygoten *hspb1-knockout*-Maus zur Verfügung. Es wurden Monozyten aus dem Knochenmark der Mäuse isoliert und zu BMDCs differenziert (Kap. 3.2.3.1). Ähnlich wie in den RNAi Versuchen war im *filter trap* eine vermehrte Bildung von DALIS in *hspb1<sup>-/-</sup>*-Zellen zu erkennen (Abb. 4.9 A). In der mikroskopischen Auswertung wurde die Anzahl von DALIS in DALIS-enthaltenden Zellen quantifiziert. Die Anzahl der DALIS in *hspb1<sup>+/-</sup>*-Zellen ist vergleichbar mit der in Zellen der Wildtyp-Maus (nicht dargestellt), so dass BMDCs der *hspb1<sup>+/-</sup>*-Maus als Referenz gewählt wurden. Wie in Abb. 4.9 B dargestellt, enthalten die Zellen der *hspb1<sup>-/-</sup>*-Maus ca. 30% mehr DALIS als die der heterozygoten Kontrollmaus.



**Abbildung 4.9: BMDCs aus der *hspb1<sup>-/-</sup>*-Maus bilden verstärkt DALIS. (A)** BMDCs aus *hspb1<sup>-/-</sup>*-Mäusen und *hspb1<sup>+/-</sup>*-Kontrollmäusen wurden mit LPS stimuliert. Zu angegebenen Zeitpunkten wurden die Zellen geerntet, lysiert und auf einen *filter trap* aufgetragen. Die Diagramme stellen die Quantifizierung des FK2-Signals von drei unabhängigen Experimenten dar. **(B)** Immunfluoreszenz der DALIS in Zellen der *hspb1<sup>+/-</sup>*- und *hspb1<sup>-/-</sup>*-Maus mit Quantifizierung der ausgezählten Aggregate. Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung der Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten.

### 4.4.3 BAG-3 zeigt keinen Einfluss auf die DALIS-Formation

Die DALIS-Formation war bei BAG-3-Überexpression vermindert (Abb. 4.5). Dies könnte eventuell auf einen verstärkten Autophagie-induzierten Abbau der Aggregate zurückgeführt werden. Deshalb sollte untersucht werden, ob DALIS bei Depletion von BAG-3 ineffizienter abgebaut werden und die Ablagerung von ubiquitinierten Proteinen in DALIS stabilisiert wird. Eine Depletion von BAG-3 hat in RAW309-Makrophagen keine signifikante Änderung der DALIS-Bildung zur Folge (Abb. 4.10). BAG-3 könnte an der Beseitigung der Aggregate beteiligt sein (Abb. 4.5), trotzdem scheint es für den Abbau von DALIS nicht essentiell benötigt zu werden.



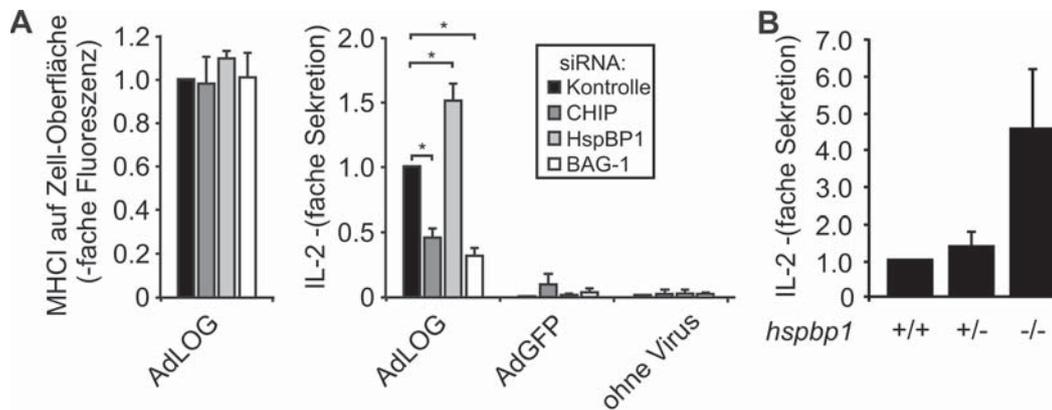
**Abbildung 4.10: BAG-3 hat keinen Einfluss auf die Bildung von DALIS.** RAW309-Zellen wurden mit siRNA elektroporiert und mit LPS stimuliert. Nach Lyse der Zellen wurden 50  $\mu\text{g}$  Protein durch einen *filter trap* filtriert und mit FK2-Antikörper gefärbt. Western Blot: Nachweis der Depletion mit BAG-3-Antikörper. Das Diagramm zeigt die Quantifizierung eines repräsentativen Experiments.

## 4.5 Auswirkungen der regulierten DALIS-Prozessierung auf die Antigenpräsentation

Da DALIS als Speicher für Peptide diskutiert werden, die als Antigene auf MHCI-Molekülen präsentiert werden [Lelouard *et al.*, 2002], sollte untersucht werden, ob die Co-Chaperone die Antigenprozessierung beeinflussen. Dafür wurden BMDCs mit siRNAs gegen CHIP, HspBP1 und BAG-1 transfiziert (Kap. 3.2.3.3) und anschließend mit einem rekombinanten Adeno-Virus infiziert (Kap. 3.2.3.4). Dieses Virus codiert das Gen für das Protein Ovalbumin (AdOVA, bzw. AdLOG). Eine Infektion der Zellen mit diesem Virus führt zu einer Reifung der DCs. Dadurch werden Viruspeptide zur Präsentation auf MHCI-Molekülen an der DC-Oberfläche über das Proteasom prozessiert. Hierbei konnte virus-codiertes Ovalbumin als Modellprotein eingeführt werden (Abb. 4.3 C und D). Bei einer Präsentation auf MHCI-Molekülen erkennen spezielle cytotoxische T-Zellen (OT-1) ein kurzes Peptid (SIINFEKL) des präsentierten Ovalbumins, was zu einer Aktivierung der T-Zellen führt. In Folge dessen sezernieren die OT-1-Zellen Cytokine, unter anderem IL-2, und lösen so eine Immunreaktion aus. Durch die Messung der ausgeschütteten IL-2-Menge können Rückschlüsse auf die Menge an präsentiertem Antigen gezogen werden. In einem Cytokintest (Kap. 3.2.4.3) wurde der Einfluss der Co-Chaperone auf die Antigenpräsentation untersucht. Die Depletion von CHIP führte zu einer um fast die Hälfte reduzierten IL-2-Sekretion im Vergleich zur Kontrolle, wohingegen eine Depletion von HspBP1 eine um 70% erhöhte Cytokinausschüttung zur Folge hatte. Die Ausschaltung von BAG-1 bewirkt eine noch geringere Cytokinausschüttung als die von CHIP. Hier wurde nur noch knapp 20% der in der Kontrolle sekretierten IL-2-Menge detektiert. (Abb. 4.11 A, rechtes Diagramm). Dabei wird die Menge an exprimierten MHCI-Molekülen auf der Zelloberfläche durch die Depletion nicht verändert (4.11 A, linkes Diagramm).

Der Einfluss einer vollständigen HspBP1-Depletion konnte *in vivo* untersucht werden. Hierzu wurden *hspb1*<sup>-/-</sup>, *hspb1*<sup>+/-</sup> und *hspb1*<sup>+/+</sup>-Mäuse intravenös mit rekombinantem Influenza-Virus (A PR/8/43) infiziert, welches das Peptid SIINFEKL exprimiert. Zwölf Stunden nach Infektion wurde den infizierten Mäusen die Milz entnommen und Milzzellen präpariert. Diese wurden anschließend für 24 Stunden mit OT-1-Zellen inkubiert und die IL-2-Sekretion der T-Zellen gemessen. Abb. 4.11 B zeigt, dass Zellen der *hspb1*<sup>+/+</sup>-Maus eine ähnliche IL-2-Sekretion

aufweisen, wie die der *hspb1*<sup>+/-</sup>-Maus. Die Zellen der *hspb1*<sup>-/-</sup>-Maus hingegen zeigen eine mehr als vierfach erhöhte Cytokinausschüttung. Die Komponenten des Hsc/Hsp70 Co-Chaperon-Netzwerks scheinen demnach durch die Regulation der Antigenprozessierung auch die Antigenpräsentation zu beeinflussen.



**Abbildung 4.11: Das Hsc/Hsp70 Co-Chaperon-Netzwerk kontrolliert die Antigenpräsentation.** (A) Mit CHIP-, HspBP1-, oder BAG-1-siRNA-depletierte BMDCs wurden mit einem Adeno-Virus (AdLOG) infiziert und mit LPS stimuliert. Nach 12 h wurden MHC I-Moleküle auf der Zelloberfläche per FACS quantifiziert (linkes Diagramm). Die Fluoreszenz der Kontrollzellen wurde gleich eins gesetzt. Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung der Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten. Zur Quantifizierung der Antigenpräsentation wurden BMDCs wie o. g. behandelt und anschließend mit der gleichen Menge OT-1-Zellen für 24 h kokultiviert. Als Kontrolle wurde ein Adeno-Virus, das GFP codiert, eingesetzt (AdGFP). Die Menge der OT-1-vermittelten IL-2-Sekretion wurde als Maß für die Antigenpräsentation auf MHC I-Komplexen genommen. Die IL-2-Sekretionsrate der mit Kontroll-siRNA-elektroporierten Zellen wurde gleich eins gesetzt (rechtes Diagramm). Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung der Mittelwerte von drei unabhängigen Experimenten. (B) *hspb1*<sup>+/+</sup>-, *hspb1*<sup>+/-</sup>- und *hspb1*<sup>-/-</sup>-Mäuse wurden mit rekombinantem Influenzavirus (A PR/8/43), welches das Ovalbuminpeptid SIINFEKL codiert, intravenös infiziert. 12 h später wurde den Versuchstieren die Milz entnommen und Milzzellen isoliert. Diese wurden für 24 h mit OT-1-Zellen inkubiert und die IL-2-Sekretion als Maß für die Antigenpräsentation auf MHC I-Molekülen bestimmt. Die Werte der *hspb1*<sup>+/+</sup>-Zellen wurden gleich eins gesetzt. Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung der Mittelwerte von drei unabhängigen Experimenten. Sterne stellen die Signifikanz von  $p < 0,05$  laut *student's t-test* dar.

## 5 Diskussion

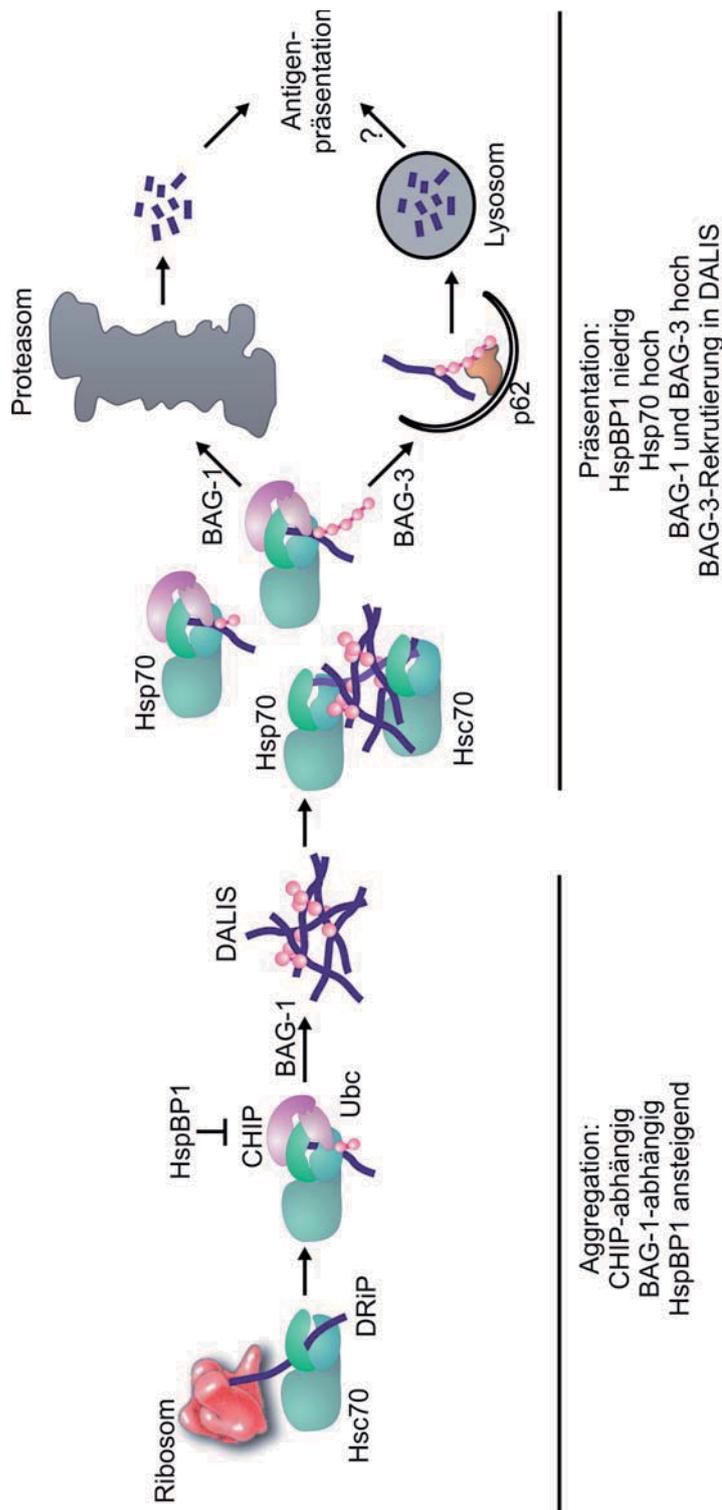
In der vorliegenden Arbeit konnte ein Chaperon/Co-Chaperon-Netzwerk identifiziert werden, welches die Prozessierung von Antigenen in professionell Antigen-präsentierenden Zellen (APC - *antigen presenting cells*) reguliert. Dabei werden im ersten Schritt fehlerhafte Translationsprodukte (DRiPs - *defective ribosomal products*) von Hsc/Hsp70 gebunden. Dadurch erhält das Co-Chaperon CHIP offensichtlich Zugang zum Chaperon-gebundenen Substrat und ubiquitiniert dieses. Eine Depletion von CHIP führt zu einer starken Reduzierung der Ablagerung von DRiPs in DALIS. Das Co-Chaperon BAG-1 scheint ebenfalls essentiell für die Bildung von DALIS zu sein und könnte auch eine Rolle beim Abbau der Aggregate übernehmen. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die Aktivität von CHIP in APCs durch den CHIP-Inhibitor HspBP1 kontrolliert wird (Abb. 4.7). Durch Überexpressions- und Depletionsanalysen konnte zum ersten Mal die Regulation von DALIS-Bildung und -Abbau durch Co-Chaperone näher charakterisiert werden. Es konnte gezeigt werden, dass die Hsc/Hsp70-Maschinerie die transiente Formation von DALIS während der Immunzellreifung reguliert und so die Antigenpräsentation und die Immunantwort von professionellen Antigen-präsentierenden Zellen kontrolliert.

### 5.1 CHIP ubiquitiniert die in DALIS akkumulierten Proteine

Proteine, bei denen eine Faltung in ihre native Konformation nicht möglich ist, werden im Rahmen der Protein-Qualitätskontrolle dem Hsc/Hsp70-abhängigen Abbau über das Proteasom zugeführt. Auch ein großer Anteil der DRiPs wird auf diese Weise abgebaut [Qian *et al.*, 2006]. Eine Schlüsselrolle innerhalb des Chaperon-vermittelten proteasomalen Abbaus übernimmt die Ubiquitinligase CHIP. Durch

CHIP wird die Chaperon-Aktivität von der Protein-Faltung zum Abbau gelenkt [Ballinger *et al.*, 1999]. Durch die Bindung an Hsc/Hsp70 können DRiPs für die Ubiquitinierung durch CHIP zugänglich gemacht werden. Eine Assoziation von CHIP an DALIS wurde schon vor einigen Jahren durch Colokalisations-Analysen nachgewiesen [Lelouard *et al.*, 2004]. Jedoch konnte CHIP im Rahmen vorliegender Arbeit erstmals als zentrale Ubiquitinligase für die Ubiquitinierung der in DALIS akkumulierten DRiPs identifiziert werden. Nach Depletion von CHIP konnten mit Hilfe des FK2-Antikörpers im *filter trap* nur noch geringfügig DALIS nachgewiesen werden (Abb. 4.7). Im Maus-Modell zeigt eine CHIP-Defizienz unter normalen Wachstumsbedingungen keinen Phänotyp [Dai *et al.*, 2003], weshalb die Vermutung nahe liegt, dass zusätzliche Chaperon-assoziierte Ubiquitinligasen, wie z. B. Parkin, die fehlende E3-Aktivität von CHIP ausgleichen. Deshalb war es erstaunlich, dass eine Depletion von CHIP einen so massiven Effekt auf die DALIS-Bildung hat und die fehlende CHIP-Aktivität offensichtlich nicht durch weitere Ubiquitinligasen kompensiert werden kann. CHIP-vermittelte Ubiquitinierung ist demnach essentiell um DRiPs in den Weg der proteasomalen Antigenprozessierung einzuschleusen (Abb. 5.1). Die verstärkte Bildung von DALIS nach CHIP-Überexpression unterstützt die Theorie, wonach CHIP als zentrale Ubiquitinligase an der Ablagerung von DRiPs in DALIS beteiligt ist (Abb. 4.5).

Es stellt sich die Frage, warum die ubiquitinierten DRiPs nicht abgebaut werden und akkumulieren. Eine mögliche Erklärung wäre eine transiente Inhibition des Proteasoms. Eventuell übersteigt die Anzahl der für den Abbau bestimmten Proteine die Prozessierungsrate des Proteasoms. In HEK293-Zellen resultiert eine Überlastung des Proteasoms in einer Ablagerung der Proteine in Aggresomen [Johnston *et al.*, 1998]. Daraus könnte man schließen, dass auch die Ablagerung von DRiPs in DALIS auf eine Überlastung des Proteasoms zurückzuführen ist.



**Abbildung 5.1: Das Hsc/Hsp70 Co-Chaperon-Netzwerk kontrolliert die Antigenprozessierung und -präsentation während der Immunzellreifung.** Die Immunzellreifung kann in zwei Phasen eingeteilt werden. In der Aggregationsphase bindet Hsc/Hsp70 DRiPs, welche vermutlich durch CHIP ubiquitiniert werden. Dabei wird die CHIP-Aktivität durch HspBP1 reguliert. Teilweise ubiquitinierte DRiPs aggregieren BAG-1-abhängig zu DALIS. In der darauf folgenden Präsentationsphase werden Hsp70- und BAG-3-Level hochreguliert während die HspBP1-Menge abnimmt. Der inhibitorische Effekt auf CHIP ist aufgehoben und DALIS-Proteine werden weiter ubiquitiniert. Durch Erhöhung der BAG-1-Level können DRiPs wieder proteasomal abgebaut werden. Gleichzeitig könnten DALIS BAG-3-vermittelt über CASA (*chaperone-assisted selective autophagy*) abgebaut werden. Die prozessierten Peptide werden zur Zelloberfläche transportiert und auf MHC-I-Molekülen präsentiert. Inwieweit die Autophagie eine Rolle in der Antigenpräsentation spielt, muss in weiteren Experimenten untersucht werden („?“).

## 5.2 Der CHIP-Inhibitor HspBP1 reguliert die DALIS-Formation

Die Co-Chaperone scheinen eine große Rolle in den ersten Schritten der Antigenprozessierung zu spielen, denn nicht nur CHIP, sondern auch BAG-1 und HspBP1 beeinflussen massiv die DALIS-Formation. Es konnte gezeigt werden, dass BAG-1 und HspBP1 in Nicht-Immunzellen gegensätzlich auf die CHIP-Aktivität wirken. BAG-1 wurde als Stimulator des proteasomalen Abbaus beschrieben, während HspBP1 CHIP-vermittelten Abbau inhibiert. Durch Bindung an Hsc/Hsp70 könnte HspBP1 eine Konformationsänderung des Chaperons herbeiführen, so dass das gebundene Substrat gegen die CHIP-vermittelte Ubiquitinierung abgeschirmt wird [Alberti und Höhfeld, 2002, Alberti *et al.*, 2004]. Im Rahmen vorliegender Arbeit wurde der Einfluss von HspBP1 auf die CHIP-Aktivität im Hinblick auf die Formation von DALIS näher untersucht. Depletion von HspBP1 führt zu einer erhöhten DALIS-Bildung sowohl bei transienter siRNA-vermittelter Depletion als auch bei Analysen von *hspb1*<sup>-/-</sup>-BMDCs (Abb. 4.7 - 4.9). Hingegen wird bei Überexpression von HspBP1 die DALIS-Bildung fast vollständig unterdrückt (Abb. 4.5). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass HspBP1 auch in Immunzellen regulatorisch auf die Ubiquitinligase-Aktivität von CHIP wirkt.

Im Verlauf der Immunzellreifung steigen HspBP1-Level in den ersten zwölf Stunden, dem Zeitpunkt der maximalen DALIS-Formation, stark an (Abb. 4.4). HspBP1 könnte in dieser initialen Phase der Immunzellreifung die Ubiquitinligase-Aktivität von CHIP limitieren. Dadurch könnte gewährleistet werden, dass während der Akkumulation von DALIS nicht zu viele Chaperon-gebundene Substrate in Richtung der Ablagerung in Aggregate dirigiert werden. In späten Phasen der Immunzellreifung sinken HspBP1-Level wieder. Die Aufhebung der CHIP-Inhibition würde dann die weitere Ubiquitinierung von Chaperon-gebundenen Substraten durch CHIP ermöglichen, die daraufhin abgebaut werden könnten (Abb. 5.1).

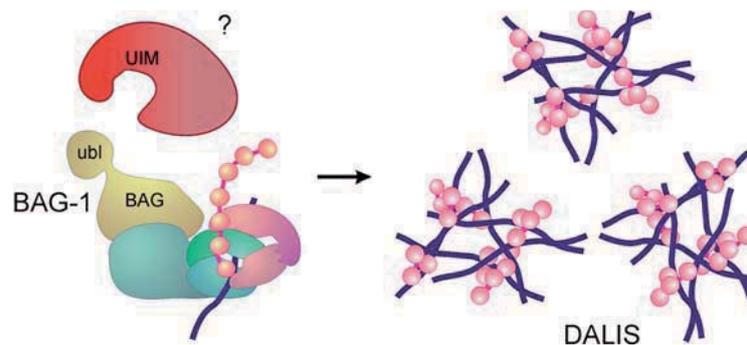
In Hirn-Zellen kommt neben HspBP1 auch das CHIP-inhibierende Co-Chaperon BAG-2 vor. BAG-2 assoziiert mit der Chaperon-Maschinerie indem es, wie BAG-1, an die ATPase-Domäne von Hsc/Hsp70 bindet. Dadurch wird die Kooperation zwischen CHIP und dem E2-Enzym sterisch behindert, so dass die CHIP-vermittelte Ubiquitinierung des Substrats unterbunden wird [Arndt *et al.*, 2005, Dai *et al.*, 2005]. Sowohl BAG-2 als auch HspBP1 werden gewebsspezifisch und in unter-

schiedlichen Zelltypen exprimiert und es wird vermutet, dass sie sich in ihrer inhibitorischen Funktion gegenseitig ersetzen können. In murinen Hoden-Zellen konnte kein BAG-2 nachgewiesen werden, was in einem Defekt der Hoden-Entwicklung der *hspb1*<sup>-/-</sup>-Maus resultiert [C. Rogon, persönliche Korrespondenz]. Deshalb wurde untersucht, ob BAG-2 in den Immunzellen kompensatorisch auf die HspBP1-Depletion wirken könnte. In BMDCs konnte BAG-2 jedoch nicht nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Dies erklärt den massiven Effekt der HspBP1-Defizienz in Immunzellen. Der Verlust von HspBP1 kann nicht durch das funktionell verwandte BAG-2 kompensiert werden.

### 5.3 Der Einfluss von BAG-1 auf die Formation von DALIS

Auch das BAG-Domänen-Protein BAG-1 zeigt einen massiven Einfluss auf die DALIS-Formation. Die Depletion von BAG-1 führt zu einer fast vollständigen Unterdrückung der DALIS-Bildung (Abb. 4.7), während bei einer Überexpression vermehrt DALIS gebildet werden. Diese Beobachtung war zunächst unerwartet, da BAG-1 bisher ausschließlich als Stimulator des proteasomalen Abbaus galt. In dieser Funktion sollte eine Depletion von BAG-1 jedoch zu einer Ansammlung von Ubiquitin-Konjugaten führen und eine Überexpression eine verminderte Bildung von DALIS, und nicht das Gegenteil bewirken. Die Daten vorliegender Arbeit deuten insofern auf eine Proteasomen-unabhängige Funktion von BAG-1 bei der Ablagerung von Ubiquitin-Konjugaten in DALIS hin. Hierbei könnte die ubl-Domäne von BAG-1 eine entscheidende Rolle spielen. Interessanterweise existieren andere Proteine, die ebenfalls sowohl Funktionen am Proteasom als auch bei der Aggregatbildung übernehmen. Das ubl-Protein PLIC-1 (*protein linking IAP to the cytoskeleton*) z. B. kann, wie BAG-1, über seine ubl-Domäne mit der S5 $\alpha$ -Untereinheit des Proteasoms interagieren und Proteine zum proteasomalen Abbau sortieren. Es kann aber auch andere Proteine mit Ubiquitin-interagierendem Motiv binden. In Kooperation mit EPS15 (*epidermal growth factor substrate 15*), einer Komponente des endozytischen Weges, ist PLIC-1 essentiell an der Ablagerung ubiquitiniertes Proteine in Aggresomen beteiligt [Walters *et al.*, 2002, Regan-Klapisz *et al.*, 2005, Heir *et al.*, 2006]. Dadurch wird der ubl-Domäne von PLIC-1 eine duale Funktion zugeschrieben. Normalerweise sortiert PLIC-1 in Interaktion mit der S5 $\alpha$ -Untereinheit

des Proteasoms ubiquitinierte Proteine zum Abbau. Ist das Proteasom jedoch bei Aggregation überlastet, induziert PLIC-1 zusammen mit EPS15 die Ablagerung der ubiquitinierten Proteine in Aggresomen [Heir *et al.*, 2006]. Auch BAG-1 könnte eine solche duale Funktion während der Immunzellreifung zugeschrieben werden. Bei transienter Proteasom-Inhibition in der frühen Phase der Immunzellreifung könnte BAG-1 in Kooperation mit einem noch unbekanntem Interaktionspartner die Ablagerung der DRiPs in DALIS vermitteln (Abb. 5.2). Diese Interaktionspartner sollten durch weiterführende Bindestudien in der Zukunft identifiziert werden.

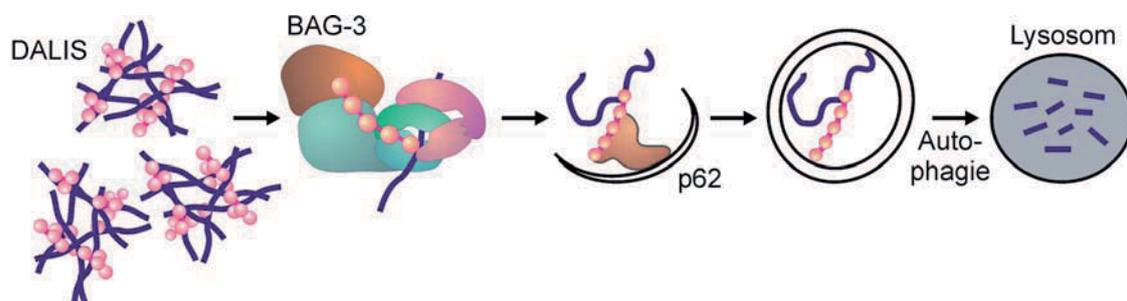


**Abbildung 5.2: Die Rolle von BAG-1 bei der DALIS-Bildung.** BAG-1 könnte über die ubl-Domäne (ubl) an das Ubiquitin-interagierende Motiv (UIM) eines noch unbekanntem Interaktionspartners (?) binden und als Sortierungsfaktor ubiquitinierte Proteine in DALIS ablagern, wenn das Proteasom überlastet ist. BAG - BAG-Domäne von BAG-1.

In späten Phasen der Immunzellreifung, wenn die Funktion des Proteasoms wieder hergestellt ist, könnten Chaperon-gebundene Substrate wieder BAG-1-vermittelt dem proteasomalen Abbau zugeführt werden (Abb. 5.1).

## 5.4 Die Rolle von BAG-3 beim autophagischem Abbau von DALIS

Es existieren Hinweise darauf, dass DALIS über lysosomale Abbauewege beseitigt werden. Eine durch LPS über die TLR4-Signalkaskade stimulierte Immunzellreifung induziert in RAW264-Makrophagen Autophagie [Xu *et al.*, 2008] und erst kürzlich konnte gezeigt werden, dass DALIS in RAW264-Makrophagen nach LPS-Stimulierung p62-abhängig autophagisch abgebaut werden [Fujita *et al.*, 2011]. Zu späten Zeitpunkten der Immunzellreifung, etwa 24 Stunden nach LPS-Stimulierung, steigen BAG-3- und p62-Level stark an (Abb. 4.4). Die Vermutung liegt daher nahe, dass die Aggregate Ubiquitin-abhängig durch CASA abgebaut werden können (Abb. 5.3). BAG-3 kann in Kooperation mit dem Ubiquitinadapter p62 den Einschluss ubiquitiniertes Substrate in eine Phagophoren-Isolationsmembran vermitteln, wodurch lysosomaler Abbau der Substrate eingeleitet wird [Gamerding *et al.*, 2009, Arndt *et al.*, 2010]. Weitere Evidenz für die Bedeutung von CASA bei der Beseitigung von DALIS ergibt sich aufgrund der Colokalisation von BAG-3, p62 sowie des Autophagosomenmarkers LC3 mit DALIS (Abb. 4.3).



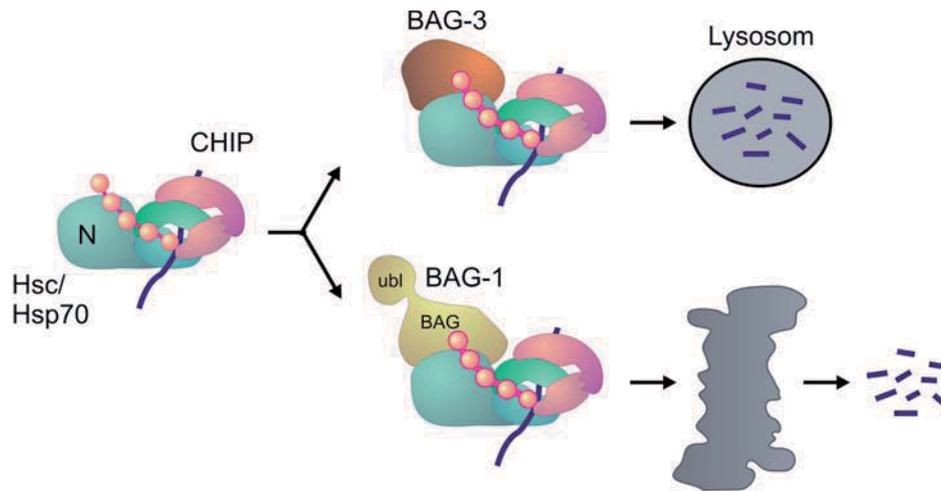
**Abbildung 5.3: BAG-3 könnte am Abbau der DALIS beteiligt sein.** Ansteigende BAG-3-Level in den letzten Stunden der Immunzellreifung deuten auf eine Beteiligung von BAG-3 beim autophagischen Abbau der DALIS hin. BAG-3 vermittelt die Interaktion des ubiquitinierten Substrats mit p62 und initiiert so den Abbau über Autophagie.

Überexpressionsexperimente unterstützen die Theorie, dass CASA in die DALIS-Beseitigung involviert ist. RAW309-Makrophagen, in denen BAG-3 überexprimiert wurde, zeigen eine geringere DALIS-Bildung im Vergleich zu Kontrollzellen (Abb. 4.5). Durch die Hochregulation von BAG-3 in der initialen Phase der Immunzellreifung werden DRiPS vermutlich schon frühzeitig über CASA abgebaut und somit eine Ablagerung in DALIS verhindert. Dass BAG-3 eine Rolle im Abbau von

aggregierenden Proteinen spielt, konnte am Beispiel von Htt43Q gezeigt werden. Htt43Q ist eine pathogene Form des Huntingtin, welche durch einen ausgedehnten PolyQ-Bereich charakterisiert ist. Dies macht das Protein aggregationsanfällig. Die Ausbildung zellulärer Htt43Q-Aggregate löst die neurodegenerative Krankheit Chorea Huntington aus. Es ist beschrieben, dass eine Überexpression von BAG-3 Autophagie verstärkt und damit den Abbau von Htt43Q in HEK293- und COS-1-Zellen induziert. Eine Depletion von BAG-3 resultiert hingegen in einer ineffizienten Beseitigung von Htt43Q-Aggregaten [Carra *et al.*, 2008].

Beim selektiven autophagischen Abbau kooperiert BAG-3 mit dem kleinen Hitzeschock-Protein HspB8 [Arndt *et al.*, 2010]. In neuronalen Zellen wird HspB8 bei Aggregation von mutierter Superoxid Dismutase (SOD1) hochreguliert. Dadurch wird der autophagische Abbau der Aggregate induziert [Crippa *et al.*, 2010]. Es ist daher vorstellbar, dass kleine Hitzeschock-Proteine auch beim Abbau der DALIS von Bedeutung sind.

Es wurde überprüft, ob Depletion von BAG-3 Auswirkungen auf die Formation von DALIS hat. Bei Depletion von BAG-3 könnte der Abbau über CASA nicht mehr korrekt eingeleitet und DALIS daher nur noch ineffizient abgebaut werden. Tatsächlich ist bei einer Depletion von BAG-3 jedoch kein verringerter DALIS-Abbau zu beobachten (Abb. 4.10). Eine mögliche Erklärung für diesen überraschenden Befund beruht auf Ergebnissen zur Regulation von BAG-3 in neuronalen Zellen. Hierbei wurde beschrieben, dass durch Depletion von BAG-3 die Expression von BAG-1 induziert wird [Gamerding *et al.*, 2009]. Ein Ausfall des autophagischen Abbauges führt also offensichtlich zu einer Induktion des proteasomalen Abbaus. Ein derartiger kompensatorischer Mechanismus könnte in der Abbauphase der Immunzellreifung dazu beitragen, dass bei Depletion von BAG-3 vermehrt Proteine BAG-1-vermittelt proteasomal abgebaut werden und deshalb keine Akkumulation von DALIS erkennbar ist. In diesem Zusammenhang wirken die BAG-Domäne-Proteine als hochregulierbare „molekulare Schalter“. Während BAG-3 einen Abbau über CASA fördert, lenkt BAG-1 den CHIP/Chaperon-Komplex zum Abbau des Substrats über CAP (Abb. 5.4).



**Abbildung 5.4:** Die Co-Chaperone BAG-1 und BAG-3 könnten den Chaperon-vermittelten selektiven Abbau regulieren. Der Chaperon-vermittelte selektive Abbau wird durch die Bindung von CHIP an den C-Terminus von Hsc/Hsp70 initiiert. Die Co-Chaperone BAG-1 und BAG-3 binden parallel zu CHIP an die N-terminale ATPase-Domäne von Hsc/Hsp70 (N). Es ist vorstellbar, dass BAG-3 in der Endphase der Immunzellreifung unter Zusammenwirken des Autophagieadapters p62 den Abbau über CASA einleitet, während BAG-1 die Sortierung des Substrats zum Proteasom vermittelt.

#### 5.4.1 Chaperon-vermittelte Autophagie - CMA (Chaperone-mediated autophagy)

Neben CASA ist die Chaperon-vermittelte Autophagie (CMA - *chaperone-mediated autophagy*) ein weiterer Abbauweg über das lysosomale Kompartiment. Im Gegensatz zu CASA wird bei dieser Art des Abbaus das Substrat direkt über die Lysosomenmembran ins Innere des Kompartiments geschleust, ohne dass zuvor eine Phagophorenmembran zum Substrateinschluss gebildet wurde [Dice, 2007]. Die Substrate besitzen ein KFERQ-Motiv, das von Hsc/Hsp70 erkannt und direkt gebunden wird [Chiang und Dice, 1988, Chiang *et al.*, 1989]. Hsc/Hsp70 wiederum bindet das lysosomale Membranprotein LAMP-2A, das daraufhin zusammen mit zwei weiteren LAMP-2-Isoformen einen Translokase-Kanal bildet über den das Substrat in das Lysosom eingeschleust wird [Kaushik *et al.*, 2006, Bandyopadhyay *et al.*, 2008]. Ob CMA, ähnlich wie CASA, über Co-Chaperone reguliert wird, ist noch nicht untersucht worden. Bisher konnte gezeigt werden, dass der Hsp70/Hsp90-Kopplungsfaktor Hop sowie die Co-Chaperone BAG-1 und Hip mit der Hsc/Hsp70-

---

Maschinerie am Lysosom interagieren [Agarraberes und Dice, 2001].

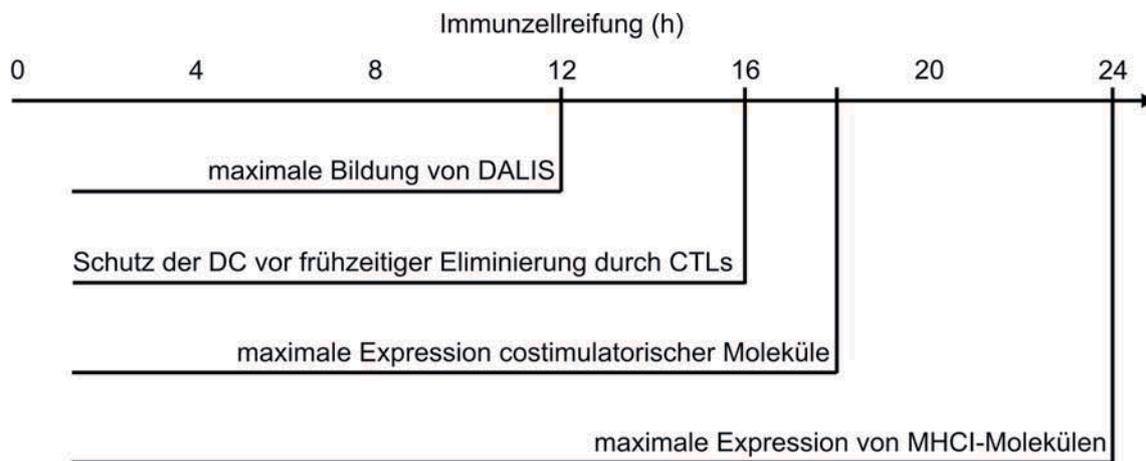
## 5.5 DALIS - ein Speicherkompartiment für Antigene?

Weshalb findet in Immunzellen eine transiente Aggregation ubiquitiniertes Proteine statt (Abb. 4.2)? In der aktuellen Literatur werden DALIS als Speicherkompartimente diskutiert, die für eine Verzögerung der Präsentation von endogenen und viralen Antigenen auf MHCI-Molekülen sorgen und auf diese Weise sicherstellen, dass DCs erst dann virale Antigene präsentieren, wenn sie die Lymphknoten erreicht haben [Lelouard *et al.*, 2002, Herter *et al.*, 2005]. Außerdem findet auch die Expression costimulatorischer Moleküle, wie CD80 und CD86, erst einige Stunden nach Beginn der Immunzellreifung statt. Diese werden im Verlauf der Immunzellreifung exprimiert und vermitteln als zweites Signal, neben der Präsentation von Fremd-Antigenen, die Aktivierung von CTLs [Jenkins *et al.*, 1990]. Sie werden ca. sechs bis acht Stunden nach Beginn der Immunzellreifung exprimiert [Muraille *et al.*, 2002] und erreichen ihre maximale Expression nach etwa 18 Stunden. Auch die Expression von MHCI-Molekülen ist nach ca. 24 Stunden maximal [Herter *et al.*, 2005]. Durch diese Verzögerung wird verhindert, dass eine unreife DC Viruspeptide, jedoch keine costimulatorischen Moleküle präsentiert, da dies Selbsttoleranz auslösen kann [Schoenberger *et al.*, 1998, Mahnke *et al.*, 2002]. Selbsttoleranz ist bei der Präsentation von körpereigenen Antigenen von enormer Wichtigkeit, da CTLs diese Antigene erkennen und die DC aufgrund dessen nicht eliminieren. Bei einer virusinfizierten APC würde die Induktion von Selbsttoleranz jedoch dazu führen, dass im Verlauf der Immunantwort keine CTLs aktiviert werden und Pathogenbefallenen Zellen nicht eliminiert werden [Steinman *et al.*, 2000]. Eine Verzögerung der Antigenpräsentation bis zur Expression der costimulatorischen Moleküle würde demnach eine optimale Aktivierung von CTLs ermöglichen und die Induktion von Selbsttoleranz verhindern.

Die verzögerte Expression der costimulatorischen Moleküle könnte auch erklären, wieso eine optimale Aktivierung von CTLs (*cytotoxic T-lymphocytes*) nur in einem definierten Zeitraum der Immunzellreifung stattfindet: DCs, die acht Stunden gereift wurden, zeigen eine stärkere T-Zell-Antwort als ungereifte, oder 48 Stunden gereifte DCs [Camporeale *et al.*, 2003]. Es wäre jedoch vorstellbar, dass DCs, die länger als acht Stunden gereift sind, eine noch stärkere T-Zell-Antwort auslösen.

Cella *et al.* haben herausgefunden, dass zehn Stunden gereifte BMDCs eine um das Zehnfache erhöhte Antigenpräsentation aufweisen, als fünf Stunden gereifte [Cella *et al.*, 1999]. Herter *et al.* konnten nachweisen, dass BMDCs erst nach zwölf Stunden die Antigenpräsentationsrate aufweisen, die EL-4-Kontrollzellen schon vier Stunden nach Influenza-Infektion präsentieren [Herter *et al.*, 2005]. Dies deutet auf eine erhöhte CTL-Aktivierung zwischen zwölf und 24 Stunden nach Induktion der Immunzellreifung hin. Abbau-stimulierende Co-Chaperonen werden zu diesen Zeitpunkten der Immunzellreifung hochreguliert, was eine erhöhte Antigenprozessierung und eine daraus resultierende verstärkte Immunantwort zur Folge haben könnte (Abb. 4.4 und Abb. 5.1).

Eine Verzögerung der Antigenpräsentation kann außerdem der frühzeitigen CTL-vermittelten Abtötung der DC entgegenwirken. Unreife DCs laufen Gefahr, bei frühzeitiger Aktivierung von CTLs durch diese eliminiert zu werden. Diese CTL-vermittelte Eliminierung der DC verhindert der Serinprotease-Inhibitor 6 (SPI-6) [Bots *et al.*, 2005]. Die Expression von SPI-6 wird jedoch erst acht bis 16 Stunden nach Interferon- $\alpha$ -induzierter Zellreifung hochreguliert [Dauer *et al.*, 2006, Stout-Delgado *et al.*, 2007]. Die Speicherung der Antigene in DALIS könnte der DC demnach die vollständige Ausreifung ermöglichen, was eine optimal Aktivierung von CTLs gewährleistet (Abb. 5.5).



**Abbildung 5.5:** Durch die Speicherung von Antigenen in DALIS könnte eine optimale Aktivierung von CTLs gewährleistet werden. DALIS-Größe und -Anzahl sind etwa zwölf Stunden nach Beginn der Immunzellreifung maximal. In den folgenden Stunden bildet die Zelle maximalen Schutz vor frühzeitiger Eliminierung durch SPI-6-Expression aus und weist eine maximale Anzahl von costimulatorischen und MHCII-Molekülen auf ihrer Oberfläche auf.

## 5.6 Co-Chaperone regulieren Antigenprozessierung und -präsentation auf MHCI-Molekülen

In vorliegender Arbeit wurde analysiert, ob die Regulation der proteasomalen DALIS-Prozessierung durch CHIP, BAG1 bzw. HspBP1 auch die Präsentation auf MHCI-Molekülen beeinflusst. Tatsächlich hat siRNA-vermittelte Depletion von CHIP, BAG-1 bzw. HspBP1 einen signifikanten Effekt auf die Präsentation von endogen-exprimierten Antigenen auf MHCI-Molekülen. Dies spiegelt die Beobachtungen der Einflüsse der Depletionen auf die Bildung von DALIS wider (Abb. 4.7). Depletion von CHIP bzw. BAG-1 resultierte in einer verminderten Antigenpräsentation (Abb. 4.11). Im Gegensatz dazu führt die Depletion von HspBP1 zu einer erhöhten Formation von DALIS und einer gesteigerten MHCI-Antigenpräsentation (Abb. 4.7 und Abb. 4.8). Da die Menge an MHCI-Molekülen nach Depletion der Co-Chaperone stabil ist (Abb. 4.11, linker Graph), können die unterschiedlichen Präsentationslevel auf die intrazelluläre Co-chaperon-regulierte Antigenprozessierung zurückgeführt werden und eine Modulation aufgrund von unterschiedlich starker Expression der MHCI-Molekülen kann ausgeschlossen werden. *In vivo*-Präsentationsstudien mit BMDCs aus *hspbp1*<sup>-/-</sup>-Mäusen bestätigen den beobachteten Effekt der siRNA-vermittelten HspBP1-Depletion (Abb. 4.9). Diese Ergebnisse belegen eine regulatorische Rolle von HspBP1 bei der Antigenpräsentation. Indem sie die Bildung und den Abbau von DALIS in professionellen APCs regulieren, kontrollieren Co-Chaperone die Antigenpräsentation während der Immunzellreifung (Abb. 5.1).

## 5.7 Transiente Aggregat-Formation in Nicht-Immunzellen

Wie bereits erwähnt, bilden auch Nicht-Immunzellen nach verschiedenen physiologischen Stimuli oder aufgrund von nicht-physiologischen Einflüssen transient ubiquitinierte Aggregate [Szeto *et al.*, 2006, Kaganovich *et al.*, 2008]. In HeLa-Zellen z. B. führt Proteasom-Inhibition zur Ablagerung von Proteinen in zwei verschiedenen Arten von Aggregaten. Ubiquitinierte Proteine werden dabei in juxtannukleären Aggregaten (JUNQ - *juxtannuclear quality control compartment*) abgelagert. Eine Anhäufung von Proteasomen und Komponenten der Protein-Qualitätskontrolle deu-

tet darauf hin, dass in diesen Bereichen sowohl Protein-Abbau, als auch -Faltung stattfindet [Kaganovich *et al.*, 2008]. In murinen Fibroblasten werden bei Interferon- $\gamma$ -induziertem oxidativen Stress ALIS (*Aggresome-Like Induced Structures*) gebildet [Seifert *et al.*, 2010]. Oxidativer Stress induziert zusammen mit Proteasom-Inhibition die Expression von Komponenten der Proteostase-Maschinerie, wie z. B. Hsp70, CHIP, und BAG-3 [Dikshit und Jana, 2007, Jacobs und Marnett, 2009] und CHIP-defiziente Mäuse sind anfälliger für die Folgen von oxidativem Stress, als Kontroll-Mäuse ohne CHIP-Defizienz [Min *et al.*, 2008].

In HeLa-Zellen wird dem BAG-1 strukturell ähnlichem BAG-6 eine Rolle bei der Bildung von Aggresomen bei Proteasom-Inhibition sowie beim Abbau von Puromycin-induzierten DRiPs zugewiesen [Minami *et al.*, 2010]. BAG-6 besitzt ebenfalls eine N-terminale ubl-Domäne und eine C-terminale BAG-Domäne. Wie BAG-1 kann BAG-6 über die BAG-Domäne Hsc/Hsp70 binden und fungiert als negativer Regulator der Faltungsaktivität von Hsc/Hsp70 [Thress *et al.*, 2001]. Es wurde nachgewiesen, dass BAG-6 für die Bildung von Aggresomen erforderlich ist. Außerdem liegt BAG-6 mit DRiPs assoziiert vor und scheint in den Abbau von DRiPs involviert zu sein [Minami *et al.*, 2010]. Es ist demnach vorstellbar, dass BAG-1 und BAG-6 funktionelle Ähnlichkeit bei der Formation von Aggregaten zugeschrieben werden kann.

Der Chaperon-vermittelte Prozess der Bildung und des Abbaus von DALIS in Immunzellen könnte demnach einen generellen Mechanismus darstellen, der die Protein-Aggregation unter verschiedenen physiologischen Bedingungen kontrolliert.

## 5.8 Ausblick

In zukünftigen Untersuchungen könnte das Netzwerk an Regulatoren, welche die Formation von DALIS oder ALIS kontrollieren, weiter spezifiziert werden. Neben der Analyse, ob weitere Abbau-stimulierende oder -inhibierende Co-Chaperone in die DALIS-Formation involviert sind (vgl. Kap. 5.2 und 5.3), könnte auch der Einfluss von kleinen Hitzeschock-Proteinen näher untersucht werden. Bei der Aggregation von JUNQ-Proteinen konnte eine Assoziation mit Hsp104 nachgewiesen werden [Kaganovich *et al.*, 2008]. Hsp104 ist z. B. in die Resolubilisierung von aggregierter Luciferase involviert [Parsell *et al.*, 1994] und könnte eine Rolle in der Disaggregation der Aggregate spielen. Es wird spekuliert, ob Hsp104 die aggregierten

Proteine löslich hält um Proteine dem Abbau, oder der Faltung zukommen zu lassen [Kaganovich *et al.*, 2008]. Es sollte geklärt werden, ob Hsp104 auch mit DALIS assoziiert vorliegt und in der letzten Phase der Immunzellreifung die Beseitigung der Aggregate ermöglicht. Des Weiteren wäre es vielversprechend, den Einfluss von Hsp110 auf die DALIS-Formation zu untersuchen. Hsp110 ist ein Co-Chaperon und Nukleotidaustauschfaktor von Hsp70 [Dragovic *et al.*, 2006]. Es interagiert mit der mutierten Form von SOD1 und supprimiert die Aggregation [Wang *et al.*, 2009]. Deshalb ist es vorstellbar, dass Hsp110 auch die Hsp70-Aktivität während der Immunzellreifung regulieren könnte und dies Auswirkungen auf die Aggregation von DALIS hat.

Des Weiteren könnte der Einfluss von proteasomalem und autophagischem Abbau bei der Beseitigung von DALIS näher analysiert werden. In BMDCs führt die Inhibition des Proteasoms zu einer erhöhten Formation von DALIS [Lelouard *et al.*, 2002]. Aber auch die Inhibition des lysosomalen Abbaus durch 3-Methyladenin (3-MA) führt zu einer verstärkten ALIS-Bildung [Szeto *et al.*, 2006]. Es könnte näher charakterisiert werden, auf welche Weise die einzelnen Abbauege in die Formation von DALIS/ALIS und die Antigenpräsentation auf MHCI-Komplexen involviert sind. Dass die Regulation der proteasomalen Aktivität einen Einfluss auf die Antigenpräsentation auf MHCI-Komplexe hat, konnten Dolan *et al.* zeigen. Bei der Inhibition des Proteasoms nach einer Influenza-Virusinfektion in DCs präsentieren diese weniger Viruspeptid auf MHCI-Molekülen, als Zellen mit funktionstüchtigem Proteasom [Dolan *et al.*, 2010]. Welchen Einfluss der Abbau über CASA auf die Antigenpräsentation hat, ist noch nicht erforscht (Abb. 5.1). Es konnte jedoch kürzlich gezeigt werden, dass Autophagie die MHCI-Präsentation stimulieren kann [Münz, 2010]. Es ist demnach vorstellbar, dass die BAG-3- und p62-vermittelte Beseitigung von DALIS über CASA an der Antigenpräsentation beteiligt ist.

# Literaturverzeichnis

- [Ackerman und Cresswell, 2004] Ackerman, A. L. und Cresswell, P. (2004). Cellular mechanisms governing cross-presentation of exogenous antigens. *Nat Immunol*, 5(7):678–684.
- [Agarraberes und Dice, 2001] Agarraberes, F. A. und Dice, J. F. (2001). A molecular chaperone complex at the lysosomal membrane is required for protein translocation. *J Cell Sci*, 114(Pt 13):2491–2499.
- [Alberti *et al.*, 2004] Alberti, S., Böhse, K., Arndt, V., Schmitz, A., und Höhfeld, J. (2004). The cochaperone HspBP1 inhibits the CHIP ubiquitin ligase and stimulates the maturation of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *Mol Biol Cell*, 15(9):4003–4010.
- [Alberti *et al.*, 2003] Alberti, S., Esser, C., und Höhfeld, J. (2003). BAG-1—a nucleotide exchange factor of Hsc70 with multiple cellular functions. *Cell Stress Chaperones*, 8(3):225–231.
- [Alberti und Höhfeld, 2002] Alberti, S. und Höhfeld, J. (2002). Molecular chaperones in the regulation of signal transduction. *Ann N Y Acad Sci*, 973:3–4.
- [Arndt *et al.*, 2005] Arndt, V., Daniel, C., Nastainczyk, W., Alberti, S., und Höhfeld, J. (2005). BAG-2 acts as an inhibitor of the chaperone-associated ubiquitin ligase CHIP. *Mol Biol Cell*, 16(12):5891–5900.
- [Arndt *et al.*, 2010] Arndt, V., Dick, N., Tawo, R., Dreiseidler, M., Wenzel, D., Hesse, M., Fürst, D. O., Saftig, P., Saint, R., Fleischmann, B. K., Hoch, M., und Höhfeld, J. (2010). Chaperone-assisted selective autophagy is essential for muscle maintenance. *Curr Biol*, 20(2):143–148.
- [Arndt *et al.*, 2007] Arndt, V., Rogon, C., und Höhfeld, J. (2007). To be, or not to be—molecular chaperones in protein degradation. *Cell Mol Life Sci*, 64(19-20):2525–2541.
- [Balch *et al.*, 2008] Balch, W. E., Morimoto, R. I., Dillin, A., und Kelly, J. W. (2008). Adapting proteostasis for disease intervention. *Science*, 319(5865):916–919.

- [Ballinger *et al.*, 1999] Ballinger, C. A., Connell, P., Wu, Y., Hu, Z., Thompson, L. J., Yin, L. Y., und Patterson, C. (1999). Identification of CHIP, a novel tetratricopeptide repeat-containing protein that interacts with heat shock proteins and negatively regulates chaperone functions. *Mol Cell Biol*, 19(6):4535–4545.
- [Banchereau *et al.*, 2000] Banchereau, J., Briere, F., Caux, C., Davoust, J., Lebecque, S., Liu, Y. J., Pulendran, B., und Palucka, K. (2000). Immunobiology of dendritic cells. *Annu Rev Immunol*, 18:767–811.
- [Banchereau und Steinman, 1998] Banchereau, J. und Steinman, R. M. (1998). Dendritic cells and the control of immunity. *Nature*, 392(6673):245–252.
- [Bandyopadhyay *et al.*, 2008] Bandyopadhyay, U., Kaushik, S., Varticovski, L., und Cuervo, A. M. (2008). The chaperone-mediated autophagy receptor organizes in dynamic protein complexes at the lysosomal membrane. *Mol Cell Biol*, 28(18):5747–5763.
- [Baumeister *et al.*, 1998] Baumeister, W., Walz, J., Zühl, F., und Seemüller, E. (1998). The proteasome: paradigm of a self-compartmentalizing protease. *Cell*, 92(3):367–380.
- [Beutler, 2000] Beutler, B. (2000). Tlr4: central component of the sole mammalian LPS sensor. *Curr Opin Immunol*, 12(1):20–26.
- [Bots *et al.*, 2005] Bots, M., Kolfshoten, I. G. M., Bres, S. A., Rademaker, M. T. G. A., de Roo, G. M., Krüse, M., Franken, K. L. M. C., Hahne, M., Froelich, C. J., Melief, C. J. M., Offringa, R., und Medema, J. P. (2005). SPI-CI and SPI-6 cooperate in the protection from effector cell-mediated cytotoxicity. *Blood*, 105(3):1153–1161.
- [Bryant und Ploegh, 2004] Bryant, P. und Ploegh, H. (2004). Class II MHC peptide loading by the professionals. *Curr Opin Immunol*, 16(1):96–102.
- [Bukau und Horwich, 1998] Bukau, B. und Horwich, A. L. (1998). The Hsp70 and Hsp60 chaperone machines. *Cell*, 92(3):351–366.
- [Camporeale *et al.*, 2003] Camporeale, A., Boni, A., Iezzi, G., Degl’Innocenti, E., Grioni, M., Mondino, A., und Bellone, M. (2003). Critical impact of the kinetics of dendritic cells activation on the in vivo induction of tumor-specific T lymphocytes. *Cancer Res*, 63(13):3688–3694.

- [Carra *et al.*, 2008] Carra, S., Seguin, S. J., Lambert, H., und Landry, J. (2008). HspB8 chaperone activity toward poly(Q)-containing proteins depends on its association with Bag3, a stimulator of macroautophagy. *J Biol Chem*, 283(3):1437–1444.
- [Cella *et al.*, 1999] Cella, M., Salio, M., Sakakibara, Y., Langen, H., Julkunen, I., und Lanzavecchia, A. (1999). Maturation, activation, and protection of dendritic cells induced by double-stranded RNA. *J Exp Med*, 189(5):821–829.
- [Cerundolo *et al.*, 1995] Cerundolo, V., Kelly, A., Elliott, T., Trowsdale, J., und Townsend, A. (1995). Genes encoded in the major histocompatibility complex affecting the generation of peptides for TAP transport. *Eur J Immunol*, 25(2):554–562.
- [Chiang und Dice, 1988] Chiang, H. L. und Dice, J. F. (1988). Peptide sequences that target proteins for enhanced degradation during serum withdrawal. *J Biol Chem*, 263(14):6797–6805.
- [Chiang *et al.*, 1989] Chiang, H. L., Terlecky, S. R., Plant, C. P., und Dice, J. F. (1989). A role for a 70-kilodalton heat shock protein in lysosomal degradation of intracellular proteins. *Science*, 246(4928):382–385.
- [Clausen *et al.*, 2010] Clausen, T. H., Lamark, T., Isakson, P., Finley, K., Larsen, K. B., Brech, A., Øvervatn, A., Stenmark, H., Bjørkøy, G., Simonsen, A., und Johansen, T. (2010). p62/SQSTM1 and ALFY interact to facilitate the formation of p62 bodies/ALIS and their degradation by autophagy. *Autophagy*, 6(3):330–344.
- [Connell *et al.*, 2001] Connell, P., Ballinger, C. A., Jiang, J., Wu, Y., Thompson, L. J., Höhfeld, J., und Patterson, C. (2001). The co-chaperone CHIP regulates protein triage decisions mediated by heat-shock proteins. *Nat Cell Biol*, 3(1):93–96.
- [Crippa *et al.*, 2010] Crippa, V., Sau, D., Rusmini, P., Boncoraglio, A., Onesto, E., Bolzoni, E., Galbiati, M., Fontana, E., Marino, M., Carra, S., Bendotti, C., Biasi, S. D., und Poletti, A. (2010). The small heat shock protein B8 (HspB8) promotes autophagic removal of misfolded proteins involved in amyotrophic lateral sclerosis (ALS). *Hum Mol Genet*, 19(17):3440–3456.
- [Cyr *et al.*, 2002] Cyr, D. M., Höhfeld, J., und Patterson, C. (2002). Protein quality control: U-box-containing E3 ubiquitin ligases join the fold. *Trends Biochem Sci*, 27(7):368–375.

- [Dai *et al.*, 2005] Dai, Q., Qian, S.-B., Li, H.-H., McDonough, H., Borchers, C., Huang, D., Takayama, S., Younger, J. M., Ren, H. Y., Cyr, D. M., und Patterson, C. (2005). Regulation of the cytoplasmic quality control protein degradation pathway by BAG2. *J Biol Chem*, 280(46):38673–38681.
- [Dai *et al.*, 2003] Dai, Q., Zhang, C., Wu, Y., McDonough, H., Whaley, R. A., Godfrey, V., Li, H.-H., Madamanchi, N., Xu, W., Neckers, L., Cyr, D., und Patterson, C. (2003). CHIP activates HSF1 and confers protection against apoptosis and cellular stress. *EMBO J*, 22(20):5446–5458.
- [Dauer *et al.*, 2006] Dauer, M., Schad, K., Junkmann, J., Bauer, C., Hertel, J., Kiefl, R., Schnurr, M., Endres, S., und Eigler, A. (2006). IFN- $\alpha$  promotes definitive maturation of dendritic cells generated by short-term culture of monocytes with GM-CSF and IL-4. *J Leukoc Biol*, 80(2):278–286.
- [Demand *et al.*, 2001] Demand, J., Alberti, S., Patterson, C., und Höflich, J. (2001). Cooperation of a ubiquitin domain protein and an E3 ubiquitin ligase during chaperone/proteasome coupling. *Curr Biol*, 11(20):1569–1577.
- [Dice, 2007] Dice, J. F. (2007). Chaperone-mediated autophagy. *Autophagy*, 3(4):295–299.
- [Dikshit und Jana, 2007] Dikshit, P. und Jana, N. R. (2007). The co-chaperone CHIP is induced in various stresses and confers protection to cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 357(3):761–765.
- [Dolan *et al.*, 2010] Dolan, B. P., Li, L., Takeda, K., Bennink, J. R., und Yewdell, J. W. (2010). Defective ribosomal products are the major source of antigenic peptides endogenously generated from influenza A virus neuraminidase. *J Immunol*, 184(3):1419–1424.
- [Dragovic *et al.*, 2006] Dragovic, Z., Broadley, S. A., Shomura, Y., Bracher, A., und Hartl, F. U. (2006). Molecular chaperones of the Hsp110 family act as nucleotide exchange factors of Hsp70s. *EMBO J*, 25(11):2519–2528.
- [Dunn *et al.*, 2005] Dunn, W. A., Cregg, J. M., Kiel, J. A. K. W., van der Klei, I. J., Oku, M., Sakai, Y., Sibirny, A. A., Stasyk, O. V., und Veenhuis, M. (2005). Pexophagy: the selective autophagy of peroxisomes. *Autophagy*, 1(2):75–83.

- [Eskelinen und Saftig, 2009] Eskelinen, E.-L. und Saftig, P. (2009). Autophagy: a lysosomal degradation pathway with a central role in health and disease. *Biochim Biophys Acta*, 1793(4):664–673.
- [Fassbender *et al.*, 2008] Fassbender, M., Herter, S., Holtappels, R., und Schild, H. (2008). Correlation of dendritic cell maturation and the formation of aggregates of poly-ubiquitinated proteins in the cytosol. *Med Microbiol Immunol*, 197(2):185–189.
- [Filimonenko *et al.*, 2010] Filimonenko, M., Isakson, P., Finley, K. D., Anderson, M., Jeong, H., Melia, T. J., Bartlett, B. J., Myers, K. M., Birkeland, H. C. G., Lamark, T., Krainc, D., Brech, A., Stenmark, H., Simonsen, A., und Yamamoto, A. (2010). The selective macroautophagic degradation of aggregated proteins requires the PI3P-binding protein Alfy. *Mol Cell*, 38(2):265–279.
- [Finley *et al.*, 2004] Finley, D., Ciechanover, A., und Varshavsky, A. (2004). Ubiquitin as a central cellular regulator. *Cell*, 116(2 Suppl):S29–32, 2 p following S32.
- [Frydman, 2001] Frydman, J. (2001). Folding of newly translated proteins in vivo: the role of molecular chaperones. *Annu Rev Biochem*, 70:603–647.
- [Frydman und Höhfeld, 1997] Frydman, J. und Höhfeld, J. (1997). Chaperones get in touch: the Hip-Hop connection. *Trends in Biochemical Sciences*, 22(3):87–92.
- [Fujita *et al.*, 2011] Fujita, K.-I., Maeda, D., Xiao, Q., und Srinivasula, S. M. (2011). Nrf2-mediated induction of p62 controls Toll-like receptor-4-driven aggresome-like induced structure formation and autophagic degradation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 108(4):1427–1432.
- [Gamerding *et al.*, 2009] Gamerding, M., Hajieva, P., Kaya, A. M., Wolfrum, U., Hartl, F. U., und Behl, C. (2009). Protein quality control during aging involves recruitment of the macroautophagy pathway by BAG3. *EMBO J*, 28(7):889–901.
- [Haas *et al.*, 1982] Haas, A. L., Warms, J. V., Hershko, A., und Rose, I. A. (1982). Ubiquitin-activating enzyme. Mechanism and role in protein-ubiquitin conjugation. *J Biol Chem*, 257(5):2543–2548.
- [Hartl und Hayer-Hartl, 2002] Hartl, F. U. und Hayer-Hartl, M. (2002). Molecular chaperones in the cytosol: from nascent chain to folded protein. *Science*, 295(5561):1852–1858.

- [Hartl und Hayer-Hartl, 2009] Hartl, F. U. und Hayer-Hartl, M. (2009). Converging concepts of protein folding in vitro and in vivo. *Nat Struct Mol Biol*, 16(6):574–581.
- [Hartmann-Petersen *et al.*, 2003] Hartmann-Petersen, R., Seeger, M., und Gordon, C. (2003). Transferring substrates to the 26S proteasome. *Trends Biochem Sci*, 28(1):26–31.
- [Heemels und Ploegh, 1995] Heemels, M. T. und Ploegh, H. (1995). Generation, translocation, and presentation of MHC class I-restricted peptides. *Annu Rev Biochem*, 64:463–491.
- [Heil *et al.*, 2004] Heil, F., Hemmi, H., Hochrein, H., Ampenberger, F., Kirschning, C., Akira, S., Lipford, G., Wagner, H., und Bauer, S. (2004). Species-specific recognition of single-stranded RNA via toll-like receptor 7 and 8. *Science*, 303(5663):1526–1529.
- [Heir *et al.*, 2006] Heir, R., Ablasou, C., Dumontier, E., Elliott, M., Fagotto-Kaufmann, C., und Bedford, F. K. (2006). The UBL domain of PLIC-1 regulates aggresome formation. *EMBO Rep*, 7(12):1252–1258.
- [Hershko *et al.*, 1983] Hershko, A., Heller, H., Elias, S., und Ciechanover, A. (1983). Components of ubiquitin-protein ligase system. Resolution, affinity purification, and role in protein breakdown. *J Biol Chem*, 258(13):8206–8214.
- [Herter *et al.*, 2005] Herter, S., Osterloh, P., Hilf, N., Rechtsteiner, G., Höhfeld, J., Rammensee, H.-G., und Schild, H. (2005). Dendritic cell aggresome-like-induced structure formation and delayed antigen presentation coincide in influenza virus-infected dendritic cells. *J Immunol*, 175(2):891–898.
- [Höhfeld und Jentsch, 1997] Höhfeld, J. und Jentsch, S. (1997). GrpE-like regulation of the hsc70 chaperone by the anti-apoptotic protein BAG-1. *EMBO J*, 16(20):6209–6216.
- [Höhfeld *et al.*, 1995] Höhfeld, J., Minami, Y., und Hartl, F. U. (1995). Hip, a novel cochaperone involved in the eukaryotic Hsc70/Hsp40 reaction cycle. *Cell*, 83(4):589–598.
- [Hofmann und Pickart, 1999] Hofmann, R. M. und Pickart, C. M. (1999). Noncanonical MMS2-encoded ubiquitin-conjugating enzyme functions in assembly of novel polyubiquitin chains for DNA repair. *Cell*, 96(5):645–653.

- [Hoppe, 2005] Hoppe, T. (2005). Multiubiquitylation by E4 enzymes: 'one size' doesn't fit all. *Trends Biochem Sci*, 30(4):183–187.
- [Jackson *et al.*, 2000] Jackson, P. K., Eldridge, A. G., Freed, E., Furstenthal, L., Hsu, J. Y., Kaiser, B. K., und Reimann, J. D. (2000). The lore of the RINGs: substrate recognition and catalysis by ubiquitin ligases. *Trends Cell Biol*, 10(10):429–439.
- [Jacobs und Marnett, 2009] Jacobs, A. T. und Marnett, L. J. (2009). HSF1-mediated BAG3 expression attenuates apoptosis in 4-hydroxynonenal-treated colon cancer cells via stabilization of anti-apoptotic Bcl-2 proteins. *J Biol Chem*, 284(14):9176–9183.
- [Jenkins *et al.*, 1990] Jenkins, M. K., Chen, C. A., Jung, G., Mueller, D. L., und Schwartz, R. H. (1990). Inhibition of antigen-specific proliferation of type 1 murine T cell clones after stimulation with immobilized anti-CD3 monoclonal antibody. *J Immunol*, 144(1):16–22.
- [Jiang *et al.*, 2001] Jiang, J., Ballinger, C. A., Wu, Y., Dai, Q., Cyr, D. M., Höhfeld, J., und Patterson, C. (2001). CHIP is a U-box-dependent E3 ubiquitin ligase: identification of Hsc70 as a target for ubiquitylation. *J Biol Chem*, 276(46):42938–42944.
- [Joazeiro und Weissman, 2000] Joazeiro, C. A. und Weissman, A. M. (2000). RING finger proteins: mediators of ubiquitin ligase activity. *Cell*, 102(5):549–552.
- [Johnston *et al.*, 1998] Johnston, J. A., Ward, C. L., und Kopito, R. R. (1998). Aggresomes: a cellular response to misfolded proteins. *J Cell Biol*, 143(7):1883–1898.
- [Kaganovich *et al.*, 2008] Kaganovich, D., Kopito, R., und Frydman, J. (2008). Misfolded proteins partition between two distinct quality control compartments. *Nature*, 454(7208):1088–1095.
- [Kaushik *et al.*, 2006] Kaushik, S., Massey, A. C., und Cuervo, A. M. (2006). Lysosome membrane lipid microdomains: novel regulators of chaperone-mediated autophagy. *EMBO J*, 25(17):3921–3933.
- [Kettern *et al.*, 2010] Kettern, N., Dreiseidler, M., Tawo, R., und Höhfeld, J. (2010). Chaperone-assisted degradation: multiple paths to destruction. *Biol Chem*, 391(5):481–489.

- [Kirkin *et al.*, 2009a] Kirkin, V., Lamark, T., Sou, Y.-S., Bjørkøy, G., Nunn, J. L., Brun, J.-A., Shvets, E., McEwan, D. G., Clausen, T. H., Wild, P., Bilusic, I., Theurillat, J.-P., Øvervatn, A., Ishii, T., Elazar, Z., Komatsu, M., Dikic, I., und Johansen, T. (2009a). A role for NBR1 in autophagosomal degradation of ubiquitinated substrates. *Mol Cell*, 33(4):505–516.
- [Kirkin *et al.*, 2009b] Kirkin, V., McEwan, D. G., Novak, I., und Dikic, I. (2009b). A role for ubiquitin in selective autophagy. *Mol Cell*, 34(3):259–269.
- [Kloetzel, 2001] Kloetzel, P. M. (2001). Antigen processing by the proteasome. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2(3):179–187.
- [Koegl *et al.*, 1999] Koegl, M., Hoppe, T., Schlenker, S., Ulrich, H. D., Mayer, T. U., und Jentsch, S. (1999). A novel ubiquitination factor, E4, is involved in multiubiquitin chain assembly. *Cell*, 96(5):635–644.
- [Komatsu *et al.*, 2007] Komatsu, M., Waguri, S., Koike, M., Sou, Y.-S., Ueno, T., Hara, T., Mizushima, N., Iwata, J.-I., Ezaki, J., Murata, S., Hamazaki, J., Nishito, Y., Iemura, S.-I., Natsume, T., Yanagawa, T., Uwayama, J., Warabi, E., Yoshida, H., Ishii, T., Kobayashi, A., Yamamoto, M., Yue, Z., Uchiyama, Y., Kominami, E., und Tanaka, K. (2007). Homeostatic levels of p62 control cytoplasmic inclusion body formation in autophagy-deficient mice. *Cell*, 131(6):1149–1163.
- [Kopito, 2000] Kopito, R. R. (2000). Aggresomes, inclusion bodies and protein aggregation. *Trends Cell Biol*, 10(12):524–530.
- [Lelouard *et al.*, 2004] Lelouard, H., Ferrand, V., Marguet, D., Bania, J., Camosseto, V., David, A., Gatti, E., und Pierre, P. (2004). Dendritic cell aggresome-like induced structures are dedicated areas for ubiquitination and storage of newly synthesized defective proteins. *The Journal of Cell Biology*, 164(5):667–675. PMID: 14981091 PMCID: 2172164.
- [Lelouard *et al.*, 2002] Lelouard, H., Gatti, E., Cappello, F., Gresser, O., Camosseto, V., und Pierre, P. (2002). Transient aggregation of ubiquitinated proteins during dendritic cell maturation. *Nature*, 417(6885):177–182. PMID: 12000969.
- [Lueders *et al.*, 2000] Lueders, J., Demand, J., und Höhfeld, J. (2000). The ubiquitin-related BAG-1 provides a link between the molecular chaperones Hsc70/Hsp70 and the proteasome. *J Biol Chem*, 275(7):4613–4617.

- [Mahnke *et al.*, 2002] Mahnke, K., Schmitt, E., Bonifaz, L., Enk, A. H., und Jonuleit, H. (2002). Immature, but not inactive: the tolerogenic function of immature dendritic cells. *Immunol Cell Biol*, 80(5):477–483.
- [Massey *et al.*, 2006] Massey, A. C., Zhang, C., und Cuervo, A. M. (2006). Chaperone-mediated autophagy in aging and disease. *Curr Top Dev Biol*, 73:205–235.
- [Medzhitov und Janeway, 2000] Medzhitov, R. und Janeway, C. (2000). The Toll receptor family and microbial recognition. *Trends Microbiol*, 8(10):452–456.
- [Min *et al.*, 2008] Min, J.-N., Whaley, R. A., Sharpless, N. E., Lockyer, P., Portbury, A. L., und Patterson, C. (2008). CHIP deficiency decreases longevity, with accelerated aging phenotypes accompanied by altered protein quality control. *Mol Cell Biol*, 28(12):4018–4025.
- [Minami *et al.*, 2010] Minami, R., Hayakawa, A., Kagawa, H., Yanagi, Y., Yokosawa, H., und Kawahara, H. (2010). BAG-6 is essential for selective elimination of defective proteasomal substrates. *J Cell Biol*, 190(4):637–650.
- [Münz, 2010] Münz, C. (2010). Antigen processing via autophagy—not only for MHC class II presentation anymore? *Curr Opin Immunol*, 22(1):89–93.
- [Muraille *et al.*, 2002] Muraille, E., Trez, C. D., Pajak, B., Brait, M., Urbain, J., und Leo, O. (2002). T cell-dependent maturation of dendritic cells in response to bacterial superantigens. *J Immunol*, 168(9):4352–4360.
- [Murata *et al.*, 2001] Murata, S., Minami, Y., Minami, M., Chiba, T., und Tanaka, K. (2001). CHIP is a chaperone-dependent E3 ligase that ubiquitylates unfolded protein. *EMBO Rep*, 2(12):1133–1138.
- [Muzio *et al.*, 1998] Muzio, M., Natoli, G., Saccani, S., Levrero, M., und Mantovani, A. (1998). The human toll signaling pathway: divergence of nuclear factor kappaB and JNK/SAPK activation upstream of tumor necrosis factor receptor-associated factor 6 (TRAF6). *J Exp Med*, 187(12):2097–2101.
- [Nakagawa *et al.*, 2004] Nakagawa, I., Amano, A., Mizushima, N., Yamamoto, A., Yamaguchi, H., Kamimoto, T., Nara, A., Funao, J., Nakata, M., Tsuda, K., Hamada, S., und Yoshimori, T. (2004). Autophagy defends cells against invading group A Streptococcus. *Science*, 306(5698):1037–1040.

- [Nimmerjahn *et al.*, 2003] Nimmerjahn, F., Milosevic, S., Behrends, U., Jaffee, E. M., Pardoll, D. M., Bornkamm, G. W., und Mautner, J. (2003). Major histocompatibility complex class II-restricted presentation of a cytosolic antigen by autophagy. *Eur J Immunol*, 33(5):1250–1259.
- [Paludan *et al.*, 2005] Paludan, C., Schmid, D., Landthaler, M., Vockerodt, M., Kube, D., Tuschl, T., und Münz, C. (2005). Endogenous MHC class II processing of a viral nuclear antigen after autophagy. *Science*, 307(5709):593–596.
- [Pankiv *et al.*, 2007] Pankiv, S., Clausen, T. H., Lamark, T., Brech, A., Bruun, J.-A., Outzen, H., Øvervatn, A., Bjørkøy, G., und Johansen, T. (2007). p62/SQSTM1 binds directly to Atg8/LC3 to facilitate degradation of ubiquitinated protein aggregates by autophagy. *J Biol Chem*, 282(33):24131–24145.
- [Parsell *et al.*, 1994] Parsell, D. A., Kowal, A. S., Singer, M. A., und Lindquist, S. (1994). Protein disaggregation mediated by heat-shock protein Hsp104. *Nature*, 372(6505):475–478.
- [Pfeifer *et al.*, 1993] Pfeifer, J. D., Wick, M. J., Roberts, R. L., Findlay, K., Normark, S. J., und Harding, C. V. (1993). Phagocytic processing of bacterial antigens for class I MHC presentation to T cells. *Nature*, 361(6410):359–362.
- [Pickart, 2004] Pickart, C. M. (2004). Back to the future with ubiquitin. *Cell*, 116(2):181–190.
- [Pickart und Cohen, 2004] Pickart, C. M. und Cohen, R. E. (2004). Proteasomes and their kin: proteases in the machine age. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 5(3):177–187.
- [Pickart und Fushman, 2004] Pickart, C. M. und Fushman, D. (2004). Polyubiquitin chains: polymeric protein signals. *Curr Opin Chem Biol*, 8(6):610–616.
- [Powers *et al.*, 2009] Powers, E. T., Morimoto, R. I., Dillin, A., Kelly, J. W., und Balch, W. E. (2009). Biological and chemical approaches to diseases of proteostasis deficiency. *Annu Rev Biochem*, 78:959–991.
- [Princiotta *et al.*, 2003] Princiotta, M. F., Finzi, D., Qian, S.-B., Gibbs, J., Schuchmann, S., Buttgerit, F., Bennink, J. R., und Yewdell, J. W. (2003). Quantitating protein synthesis, degradation, and endogenous antigen processing. *Immunity*, 18(3):343–354.

- [Qian *et al.*, 2006] Qian, S.-B., Princiotta, M. F., Bennink, J. R., und Yewdell, J. W. (2006). Characterization of rapidly degraded polypeptides in mammalian cells reveals a novel layer of nascent protein quality control. *J Biol Chem*, 281(1):392–400.
- [Regan-Klapisz *et al.*, 2005] Regan-Klapisz, E., Sorokina, I., Voortman, J., de Keizer, P., Roovers, R. C., Verheesen, P., Urbé, S., Fallon, L., Fon, E. A., Verkleij, A., Benmerah, A., und van Bergen en Henegouwen, P. M. P. (2005). Ubiquilin recruits Eps15 into ubiquitin-rich cytoplasmic aggregates via a UIM-UBL interaction. *J Cell Sci*, 118(Pt 19):4437–4450.
- [Rock und Goldberg, 1999] Rock, K. L. und Goldberg, A. L. (1999). Degradation of cell proteins and the generation of MHC class I-presented peptides. *Annu Rev Immunol*, 17:739–779.
- [Rock *et al.*, 2002] Rock, K. L., York, I. A., Saric, T., und Goldberg, A. L. (2002). Protein degradation and the generation of MHC class I-presented peptides. *Adv Immunol*, 80:1–70.
- [Rubinsztein, 2006] Rubinsztein, D. C. (2006). The roles of intracellular protein-degradation pathways in neurodegeneration. *Nature*, 443(7113):780–786.
- [Scheufler *et al.*, 2000] Scheufler, C., Brinker, A., Bourenkov, G., Pegoraro, S., Moroder, L., Bartunik, H., Hartl, F. U., und Moarefi, I. (2000). Structure of TPR domain-peptide complexes: critical elements in the assembly of the Hsp70-Hsp90 multichaperone machine. *Cell*, 101(2):199–210.
- [Schoenberger *et al.*, 1998] Schoenberger, S. P., Toes, R. E., van der Voort, E. I., Offringa, R., und Melief, C. J. (1998). T-cell help for cytotoxic T lymphocytes is mediated by CD40-CD40L interactions. *Nature*, 393(6684):480–483.
- [Schubert *et al.*, 2000] Schubert, U., Antón, L. C., Gibbs, J., Norbury, C. C., Yewdell, J. W., und Bennink, J. R. (2000). Rapid degradation of a large fraction of newly synthesized proteins by proteasomes. *Nature*, 404(6779):770–774.
- [Seifert *et al.*, 2010] Seifert, U., Bialy, L. P., Ebstein, F., Bech-Otschir, D., Voigt, A., Schröter, F., Prozorovski, T., Lange, N., Steffen, J., Rieger, M., Kuckelkorn, U., Aktas, O., Kloetzel, P.-M., und Krüger, E. (2010). Immunoproteasomes preserve protein homeostasis upon interferon-induced oxidative stress. *Cell*, 142(4):613–624.

- [Sondermann *et al.*, 2001] Sondermann, H., Scheufler, C., Schneider, C., Hohfeld, J., Hartl, F. U., und Moarefi, I. (2001). Structure of a Bag/Hsc70 complex: convergent functional evolution of Hsp70 nucleotide exchange factors. *Science*, 291(5508):1553–1557.
- [Steinman *et al.*, 2000] Steinman, R. M., Turley, S., Mellman, I., und Inaba, K. (2000). The induction of tolerance by dendritic cells that have captured apoptotic cells. *J Exp Med*, 191(3):411–416.
- [Stout-Delgado *et al.*, 2007] Stout-Delgado, H. W., Getachew, Y., Miller, B. C., und Thiele, D. L. (2007). Intrahepatic lymphocyte expression of dipeptidyl peptidase I-processed granzyme B and perforin induces hepatocyte expression of serine proteinase inhibitor 6 (Serp1b9/SPI-6). *J Immunol*, 179(10):6561–6567.
- [Szeto *et al.*, 2006] Szeto, J., Kaniuk, N. A., Canadien, V., Nisman, R., Mizushima, N., Yoshimori, T., Bazett-Jones, D. P., und Brumell, J. H. (2006). ALIS are stress-induced protein storage compartments for substrates of the proteasome and autophagy. *Autophagy*, 2(3):189–199.
- [Thress *et al.*, 2001] Thress, K., Song, J., Morimoto, R. I., und Kornbluth, S. (2001). Reversible inhibition of Hsp70 chaperone function by Scythe and Reaper. *EMBO J*, 20(5):1033–1041.
- [Thrower *et al.*, 2000] Thrower, J. S., Hoffman, L., Rechsteiner, M., und Pickart, C. M. (2000). Recognition of the polyubiquitin proteolytic signal. *EMBO J*, 19(1):94–102.
- [Todde *et al.*, 2009] Todde, V., Veenhuis, M., und van der Klei, I. J. (2009). Autophagy: principles and significance in health and disease. *Biochim Biophys Acta*, 1792(1):3–13.
- [Trombetta und Mellman, 2005] Trombetta, E. S. und Mellman, I. (2005). Cell biology of antigen processing in vitro and in vivo. *Annu Rev Immunol*, 23:975–1028.
- [Vabulas und Hartl, 2005] Vabulas, R. M. und Hartl, F. U. (2005). Protein synthesis upon acute nutrient restriction relies on proteasome function. *Science*, 310(5756):1960–1963.
- [Varshavsky, 2005] Varshavsky, A. (2005). Regulated protein degradation. *Trends Biochem Sci*, 30(6):283–286.

- [Vyas *et al.*, 2008] Vyas, J. M., der Veen, A. G. V., und Ploegh, H. L. (2008). The known unknowns of antigen processing and presentation. *Nat Rev Immunol*, 8(8):607–618.
- [Walters *et al.*, 2002] Walters, K. J., Kleijnen, M. F., Goh, A. M., Wagner, G., und Howley, P. M. (2002). Structural studies of the interaction between ubiquitin family proteins and proteasome subunit S5a. *Biochemistry*, 41(6):1767–1777.
- [Wang *et al.*, 2009] Wang, J., Farr, G. W., Zeiss, C. J., Rodriguez-Gil, D. J., Wilson, J. H., Furtak, K., Rutkowski, D. T., Kaufman, R. J., Ruse, C. I., Yates, J. R., Perrin, S., Feany, M. B., und Horwich, A. L. (2009). Progressive aggregation despite chaperone associations of a mutant SOD1-YFP in transgenic mice that develop ALS. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106(5):1392–1397.
- [Winzler *et al.*, 1997] Winzler, C., Rovere, P., Rescigno, M., Granucci, F., Penna, G., Adorini, L., Zimmermann, V. S., Davoust, J., und Ricciardi-Castagnoli, P. (1997). Maturation stages of mouse dendritic cells in growth factor-dependent long-term cultures. *J Exp Med*, 185(2):317–328.
- [Xie und Klionsky, 2007] Xie, Z. und Klionsky, D. J. (2007). Autophagosome formation: core machinery and adaptations. *Nat Cell Biol*, 9(10):1102–1109.
- [Xu *et al.*, 2008] Xu, Y., Liu, X.-D., Gong, X., und Eissa, N. T. (2008). Signaling pathway of autophagy associated with innate immunity. *Autophagy*, 4(1):110–112.
- [Yewdell, 2005] Yewdell, J. W. (2005). The seven dirty little secrets of major histocompatibility complex class I antigen processing. *Immunol Rev*, 207:8–18.
- [Yewdell *et al.*, 2001] Yewdell, J. W., Schubert, U., und Bennink, J. R. (2001). At the crossroads of cell biology and immunology: DRiPs and other sources of peptide ligands for MHC class I molecules. *J Cell Sci*, 114(Pt 5):845–851.
- [Young *et al.*, 2004] Young, J. C., Agashe, V. R., Siegers, K., und Hartl, F. U. (2004). Pathways of chaperone-mediated protein folding in the cytosol. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 5(10):781–791.

# Abkürzungsverzeichnis

3MA	E-Methyladenin
°C	Grad Celsius
A. bidest	Doppelt destilliertes Wasser <i>Aqua bidestillata</i> )
Abb.	Abbildung
AdLOG	Adenovirus, das Luciferase, Ovalbumin-Peptid und GFP codiert
ADP	Adenosindiphosphat
AdOVA	Adenovirus, das Ovalbumin codiert
ALIS	<i>Aggresome-Like Induced Structures</i>
APC	<i>Antigen presenting cell</i>
APS	Amoniumperoxidisulfat
ATP	Adenosintriphosphat
BAG	<i>Bcl-2 associated athanogene</i>
BMDC	<i>Bone marrow derived dendritic cell</i>
BSA	Rinderserumalbumin ( <i>bovine serum albumine</i> )
bzw.	beziehungsweise
CHIP	<i>carboxyl terminus of hsc70-interacting protein</i>
C-terminal	carboxyterminal
C-Terminus	Carboxylterminus
DALIS	<i>Dendritic Cell Aggresome-Like Induced Structures</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure ( <i>Desoxyribonucleicacid</i> )
DRiPs	<i>Defective ribosomal proteins</i>
EDTA	Di-Natriumsalz der Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	<i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i>
EPS15	<i>epidermal growth factor substrate 15</i>
et. al.	<i>et aliter</i>
FCS	Fötale Rinderkälberserum ( <i>fetal calf serum</i> )
g	Gramm
GFP	<i>green fluorescence protein</i>
h	Stunde/n ( <i>hora</i> )
HCl	Salzsäure ( <i>hydrogen chloride</i> )

---

HEPES	N-[2-Hydroxyethyl]piperazin-N'-[2-Ethansulfonsäure]
Hsc70	70 kDA heat shock cognate
HSJ1	Heat shock protein J1
Hsp70	70 kDA heat shock protein
Hsp90	90 kDA heat shock protein
HspBP1	Heat shock protein binding protein 1
Kap.	Kapitel
kDA	Kilodalton
l	Liter
LB-Medium	Luria-Bertani-Medium
LC3	Light Chain 3
LIR	LC3 interacting region
LPS	Lipopolysaccharid
Lys	Lysin
m	Meter
M	Molar
mA	Milliampere
3-MA	3-Methyladenin
$\mu$ g	Mikrogramm
MHC	Major Histocompatibility Complex
min	Minute
ml	Milliliter
$\mu$ l	Mikroliter
mm	Millimeter
mRNA	messenger RNA
msek	Millisekunde/n
N-terminal	aminoterminal
N-Terminus	Aminoterminus
NBR1	<i>neighbor of BRCA1 gene 1</i>
p.a.	<i>pro analysis</i>
PAGE	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PAMPs	<i>Pathogen-Associated Molecular Patterns</i>
PBD	Peptid-Binde-Domäne
pH	<i>Potentia hydrogenia</i>
PLIC-1	<i>protein linking IAP to the cytoskeleton</i>

PolyQ	Poly-Glutamin
RING	<i>really interesting new gene</i>
RNA	Ribonukleinsäure ( <i>Ribonucleic acid</i> )
rpm	Umdrehungen pro Minute ( <i>rounds per minute</i> )
RNA	RNA-Interferenz
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat ( <i>sodium dodecyl sulfate</i> )
sek	Sekunde/n
siRNA	<i>small interfering ribonucleic acid</i>
Tab.	Tabelle
TBST	Tris-Puffer ( <i>tris-buffered saline</i> ) mit Triton x-100 versetzt
TE	Tris-EDTA
TEMED	N,N,N,N-Tetramethylethyldiamin
TLR	<i>Toll-Like Receptors</i>
TMB	Tetramethylbenzidinbase
TPR	<i>Tetratricopeptide repeat</i>
Tris	Tris-(hydroxymethyl-)aminoethan
Tween 20	Polyoxyethylensorbitan-Monolaurat
U	Mengeneinheit für Restriktionsenzyme ( <i>units</i> )
ubl	Ubiquitin-ähnliche Domäne ( <i>ubiquitin like domain</i> )
UbcH5	<i>Ubiquitin-conjugating enzyme E2D 2</i>
UIM	Ubiquitin-interagierendes Motiv
ü. N.	über Nacht
V	Volt
vgl.	vergleiche
WT	Wildtyp
z. B.	zum Beispiel