

Monographie BG-MUN

Wissenschaftlicher Hintergrund

Pharmazeutische Entwicklung

Erfahrungsberichte

Inhaltsverzeichnis:

1. Geschichte der BG-MUN – Entwicklung.....	3
2. Wissenschaftlicher Hintergrund.....	3
2.1. Immodulatoren – Hitzeschockproteine.....	4
2.2. Entdeckung der Hitzeschock-Reaktion.....	5
2.3. Nomenklatur der Hitzeschockproteine.....	5
2.4. Funktionen der Hitzeschutz-Proteine.....	7
2.4.1 Neusynthese von Proteinen.....	7
2.4.2 Rückfaltung aggregierter Proteine.....	9
2.4.3.Funktionen beim Membrandurchtritt.....	9
2.4.4.Regulation der Hitzeschutz-Antwort.....	9
2.4.5 Immunologische Funktionen.....	11
2.4.6 Andere Funktionen.....	12
3. Anwendungen.....	13
3.1 Einsatz der Stressantwort in der Toxikologie.....	13
3.2 Einsatz von HSP bei der Tumorerkennung.....	13
3.3 Einsatz von HSP in der Tumorthherapie.....	13
3.4 Verhinderung von Abstoßungsreaktionen nach Organtransplantationen....	14
3.5 Einsatz von HSP zur Immunisierung.....	14
3.6 Immunologie.....	14
3.6 Einsatz von HSP in der Diagnostik.....	15
3.7 Einsatz von HSP bei der Infarktprophylaxe.....	16
3.8 Einsatz von HSP zur Therapie und Prophylaxe anderer Erkrankungen.....	16
4. Weitere Beobachtungen:.....	16
5. Bestandteile und Wirkungen von Bg-MUN.....	16
6. Zusammenfassung.....	20
7. Literaturverzeichnis.....	21

Geschichte der BG-MUN – Entwicklung

Bereits seit Mitte der siebziger Jahre wird, beginnend am Friedrich-Loeffler-Institut für Tierseuchenforschung Insel Riems der Akademie der Landwirtschaftswissenschaften der DDR, an der Entwicklung des therapeutischen Konzeptes „BG-MUN“ gearbeitet. Erst nach 1994 wurden die zwischenzeitlich unterbrochenen Arbeiten von den Wissenschaftlern in Zusammenarbeit mit der BREITER-GROUP wieder aufgenommen. Im Ergebnis dieser Forschungen wurde ein Präparat patentiert, das grundlegende Erkenntnisse aus den Riemser Arbeiten mit neuen Ergebnissen in sich vereint. Geschützt ist ein Stoffgemisch aus somatischen Zellen, vorzugsweise aus Zelllinien, die international seit Jahrzehnten für die Herstellung von Virusimpfstoffen genutzt werden. Ein neuer Denkansatz erlaubte es, das Herstellungsverfahren so zu ändern, dass es überraschender Weise nicht mehr auf die Nutzung von primären Zellkulturen und die Präsenz partikulärer Proteinkonglomerate angewiesen war. Das wirksame Prinzip konnte durch proteinchemische Arbeiten eindeutig charakterisiert werden. Umfangreiche vorklinische und klinische Versuche, im Rahmen des Zulassungsverfahrens für den veterinärmedizinischen Einsatz, erwiesen die hervorragende Wirksamkeit des Präparates. Durch Bau eines eigens für die BG-MUN-Herstellung konzipierten Reinraumkomplexes verfügt die BREITER-GROUP über eine eigene moderne Fertigungsstätte für das Produkt, die die Forderungen der GMP, der Betriebsverordnung pharmazeutischer Unternehmer (PharmBetrV) und des Arzneimittelgesetzes erfüllt.

Wissenschaftlicher Hintergrund

Seit langem ist bekannt, dass Schutzimpfungen neben der Stimulation der spezifischen Abwehr und der Antikörperbildung auch paraspezifische Wirkungen hervorrufen und die unspezifischen Abwehrvorgänge stimulieren. Nach den Pionierarbeiten von Edward Jenner und Robert Koch wurden gegen Ende des 19. Jahrhunderts in kurzer Zeit eine Vielzahl von Impfstoffen entwickelt und eingeführt. Im 20. Jahrhundert erfolgten Versuche zur therapeutischen Nutzung der Schutzimpfung über die Stimulation unspezifischer Abwehrmechanismen. Diese Untersuchungen wurden bedingt durch die Entdeckung der Chemotherapie und die Einführung der Antibiotika praktisch eingestellt. Erst die Fortschritte und der Erkenntniszuwachs in der Immunologie, Infektiologie und Zellbiologie sowie das Auftreten von Antibiotikaresistenzen und therapieresistenten Erregern führten in den letzten 20 Jahren zu einer erneuten experimentellen Bearbeitung unspezifischer Therapiestrategien.

Mittlerweile sind bei einer Vielzahl von Schutzimpfungen paraspezifische Hemmwirkungen auf nichterreger- und nicht-antigenverwandte Infektionen bekannt. Diese Effekte werden heute u.a. bei der Therapie von Herpes simplex Infektionen durch Pockenschutzimpfung, der Tumorthherapie durch die BCG-Impfung oder den Einsatz von IBR-IPV-, PI-3- und Newcastle-Vaccinen gegen Rinder Grippe oder infektiöse Faktorenkrankheiten ausgenutzt. Als Ursachen dieser paraspezifischen Wirkungen konnten experimentell eine Reihe von Vorgängen nachgewiesen werden. Eine exakte Analyse der dabei ablaufenden Regelmechanismen fehlt jedoch nach wie vor.

Die Beobachtung, dass ein Lebewesen über eine Schutzimpfung eine erhöhte Abwehr gegen nichterregerverwandte Infektionen erwerben kann, ist eine faszinierende Tatsache, die zur Entwicklung von BG-MUN führte. Grundlage war dabei die Beobachtung von praktizierenden Ärzten und Tierärzten, dass homöopathische Verdünnungen von Impfstoffen (bis D6) eine gute immunstimulierende Wirkung haben und eine belastbare Immunität erzeugen. Bei der Suche nach den in den Vaccinen vorhandenen Substanzen, welche die unspezifischen Abwehrvorgänge stimulieren könnten, zeigte sich, dass die

Mehrzahl der so verdünnten Impfstoffe mit Rindernieren–Zellkulturen wie der Zelllinie MDBK (Madin Darby Bovine Kidney) produziert werden. Diese somatischen Zellen bilden im Rahmen des Zellwachstums und der Zelldifferenzierung eine Vielzahl von Proteinen. Neben den eigentlichen zellulären Proteinen und den für die Zellvermehrung gebildeten Strukturen entstehen in Abhängigkeit vom Stadium des Zellzyklus auch regulatorisch wirksame Proteine, die u.a. als Lymphokine (Zytokine), Hitzeschockproteine oder Wachstumsfaktoren freigesetzt werden und bei anderen Zellen eine Vielzahl, teils gegensätzlicher Reaktion, auslösen. Diese Effekte werden bereits in der Zellkultivierung ausgenutzt. In der Zellzucht werden seit Jahrzehnten für die Anzüchtung empfindlicher bzw. anspruchsvoller Zellen "konditionierte" Medien, also Mischungen von Zellkulturüberständen und Medien, verwendet. Auch der Einsatz von "Feeder-Zellen" bei der Etablierung von Hybridoma-Zelllinien erfüllt den gleichen Zweck, die Bereitstellung von biologisch aktiven Substanzen, um die Entwicklung anderer Zellen positiv zu beeinflussen. Viele dieser zellulären und nukleären Proteine wurden bisher identifiziert und beschrieben.

Da das Arzneimittel BG-MUN aus der Zelllinie MDBK produziert wird, sind die neben den strukturellen zellulären Proteinen auch entsprechende Regulations-Proteine im Präparat vorhanden. Ziel der Präparatentwicklung war die Nutzung somatischer Zellen als Produzent von Stoffen, die dazu geeignet sind, am Tier oder Menschen als Immunmodulator prophylaktisch, metaphylaktisch oder therapeutisch eingesetzt werden zu können.

Bei der Entwicklung des Präparates wurde davon ausgegangen, dass die Stimulation der Paramunität durch Syntheseprodukte somatischer Zellen erfolgt. Diese Zellprodukte werden im Verlauf der Antwort auf exogene Stressoren wie Virusinfektion, Temperaturveränderungen, Nahrungsmangel u.a. biologische, chemische oder physikalische Reize als Schutzmechanismen der Zellintegrität und Funktion von der Zelle gebildet und z.T. in die Umgebung freigesetzt. Durch den Einsatz von definierten Stressoren und anschließendem Aufschluss der Zellen ist es möglich, die an der Stressantwort beteiligten Substanzen zu gewinnen und auf ihre Wirksamkeit *in vitro* und *in vivo* zu testen.

Bei den wirksamen Stoffen im BG-MUN handelt es sich um Mediatoren und Wachstumsfaktoren mit mehr oder minder bekannter Funktion in der Abwehr extrazellulärer Stressoren.

2.1. Immodulatoren – Hitzeschockproteine

Zellen ergreifen bei Veränderungen von Umweltbedingungen Schutzmaßnahmen, indem sie vermehrt eine bestimmte Klasse von Proteinen produzieren, die sie vor Schäden bewahren. Dies gilt für alle Arten und Typen von Zellen, sowohl bei Pro- als auch bei Eukaryoten. Dieses Phänomen wurde Anfang der sechziger Jahre zuerst beobachtet und als Hitzeschock-Antwort, die gebildeten Proteine als Hitzeschockproteine (HSP) bezeichnet, die von sogenannten Hitzeschock-Genen kodiert werden. Hitzeschock-Gene gehören zu den ersten Genen, die kloniert und sequenziert wurden und deren Induktion studiert wurde. Mittlerweile ist bekannt, dass Zellen in dieser Art und Weise auch auf andere Umwelteinflüsse und Situationen reagieren. Da der zelluläre Abwehrmechanismus dabei immer derselbe ist, spricht man heute von der zellulären Stressantwort und von Stressproteinen. Die Stressproteine schützen die Zellen vor den negativen Einflüssen des Stress und erlauben eine Erholung und ein Überleben unter diesen Bedingungen. Stressproteine unterstützen den Aufbau der endgültigen Proteinkonformation und gewährleisten, dass die Faltung der Proteine schnell und präzise abläuft. Die Einhaltung einer vorgeschriebenen Sekundär- und Tertiärstruktur ist entscheidend für die biologische Funktion der Proteine. R.J. Ellis prägte dafür 1991 den Begriff Chaperone (molekulare

Behüter). Molekulare Chaperone begleiten die Proteine auf ihrem gesamten Lebensweg von der Neusynthese bis zu ihrem Abbau [Mogk et al., 2001].

Unter Stresssituationen wird die Synthese von Chaperonen stark erhöht. Es gibt einen direkten Zusammenhang zwischen der Expression von HSP und dem programmierten Zelltod (Apoptose). Durch die verstärkte Synthese von HSP unter Stresssituationen kann die Zelle irreparabel geschädigte Proteine schneller erkennen, beseitigen und sich damit regenerieren. Zudem kann ein größeres Angebot an Stressproteinen eine weitere Zerstörung von Proteinen unterbinden oder wesentlich einschränken. Die HSP haben aber nicht nur eine Zellschutzfunktion. Viele haben Anteil an grundlegenden Stoffwechselvorgängen wie der Zellproteinsynthese, beeinflussen die Regulation von Zellwachstum und -differenzierung und stehen in enger Wechselwirkung mit Faktoren des Immunsystems. Aufgrund der vielfältigen Funktionen der HSP ergibt sich eine Vielzahl von Anwendungsmöglichkeiten.

2.2. Entdeckung der Hitzeschock-Reaktion

Zufällig wurde Anfang der sechziger Jahre von F. Ritossa beobachtet, dass suboptimale Wachstumstemperaturen zu Schwellungen (engl. puffs) der Chromosomen der Taufliege (*Drosophila melanogaster*) führten. Diese Aufblähungen waren innerhalb von 1 bis 2 Minuten nach Temperaturerhöhung sichtbar und wuchsen bis zu 40 Minuten lang. A. Tissieres und H.K. Mitchell wiesen 1974 nach, dass zeitgleich mit diesen Schwellungen eine bestimmte Gruppe von Proteinen gebildet wurde, die sie als Hitzeschock-Proteine (HSP) bezeichneten.

Gegen Ende der siebziger Jahre wurde in vielen Experimenten nachgewiesen, dass es sich bei der Hitzeschock-Reaktion um einen allgemeinen zellulären Schutz- und Abwehrmechanismus handelt. Der Nachweis von Hitzeschock-Proteinen gelang bei Bakterien, Hefen, Pflanzen- und Tierzellen. Verschiedenste Arten von Stress (physikalischer, chemischer, oxidativer Stress, Infektionen) konnten die Reaktion auslösen. Die genetische Basis dieser Abwehrreaktion konnte in den folgenden Jahren eingengt werden, da die Gene verschiedener Stressproteine identifiziert und isoliert wurden. Bei Mutation der entsprechenden Gene traten Zellanomalien auf. So kam es zu Störungen der RNA- und DNA-Synthese bei Bakterien, die physiologische Zellteilung und der Abbau von Proteinen waren gestört. Bei hohen Temperaturen stellten die Mutanten ihr Wachstum vollständig ein. Tierische Zellen können durch die Induktion der Stressantwort einen ansonsten letalen Temperaturanstieg überleben.

1980 beobachtete L.E. Hightower, dass bei Stress immer Zellproteine denaturieren. Die Zellen stellen u.a. nach einem Hitzeschock die Produktion von Ribosomen ein und deren Zerfallsprodukte reichern sich in den Nukleoli an. Durch die Änderung der normalen Konformation können diese Proteine ihre biologische Funktion nicht mehr ausüben. Er vermutete daher, dass die Stressantwort durch die Häufung denaturierter oder abnorm gefalteter Proteine ausgelöst wird und dass die Stressproteine helfen, derartige Moleküle aufzuspüren und zu beseitigen. Diese These wurde in den folgenden Jahren experimentell bestätigt als es gelang, durch die Injektion denaturierter Proteine in lebende Zellen eine Stressantwort auszulösen.

2.3. Nomenklatur der Hitzeschockproteine

Bei Eukaryoten werden die Hitzeschockproteine aufgrund ihrer relativen Molekülmassen in verschiedene Klassen eingeteilt. HSP mit einer molaren Masse von 100 kDa heißen HSP 100. Eine Zuordnung der wichtigsten eukaryotischen und prokaryotischen Hitzeschockproteine ist in Tabelle 1 dargestellt. Neben den derart klassifizierten gibt es

weitere HSP, die keiner dieser Klassen zugeordnet werden, wie z.B. das Ubiquitin. Es existieren auch Proteine mit hoher Homologie der Aminosäuresequenz zu bekannten HSP, die selbst aber keine HSP sind. Derartige homologe Proteine werden als HSC (heat-shock cognate) bezeichnet. Außerdem konnte nachgewiesen werden, dass viele Hitzeschockgene in mehreren Kopien existieren, woraus unterschiedliche Translationsprodukte resultieren.

TAB. 1 | CHAPERONFAMILIEN: STRUKTUR UND FUNKTION

Chaperon-familie	Struktur	ATP	Vertreter prok. euk.	Co-Chaperon	Funktion
Hsp100	6-7-mer 	+	ClpB ClpA Hsp104		- Disaggregation zusammen mit Hsp70 - Proteolyse zusammen mit der Protease ClpP - Thermoresistenz - Disaggregation zusammen mit Hsp70
Hsp90	Dimer 	+	HtpG Hsp90	Hop, p23, CDC37	- Resistenz gegen extremen Hitzeschock - Stressresistenz, Kontrolle der Faltung und Aktivität von Steroidrezeptoren, Proteinkinasen u. a.
Hsp70	Monomer 	+	DnaK Hsp70 Hsc70	DnaJ, GrpE Hsp40 Bag1 Hip Chip Hop HspBP1	- De-novo-Proteinfaltung - Aggregationsverhinderung von Hitze-denaturierten Proteinen - Auflösung von Proteinaggregaten zusammen mit ClpB - Regulation der Hitzeschockantwort - De-novo-Proteinfaltung - Aggregationsverhinderung von Hitze-denaturierten Proteinen - Auflösung von Proteinaggregaten zusammen mit Hsp104 - Regulation der Hitzeschockantwort - Regulation der Aktivität gefalteter Regulatorproteine (z. B. Transkriptionsfaktoren und Kinasen)
Hsp60	14-mer 	+	GroEL	GroES	- De-novo-Proteinfaltung - Aggregationsverhinderung von Hitze-denaturierten Proteinen
	16-mer		CCT/TRIC	Prefoldin	- De-novo-Faltung von Actin und Tubulin
sHsp	8-24-mer 		IbpA IbpB Hsp25 Crystallin		- Aggregationsverhinderung von Hitze-denaturierten Proteinen - Bindung an Inclusion Bodies - Aggregationsverhinderung von Hitze-denaturierten Proteinen - Bestandteil der Linse des Wirbeltierauges
Trigger-Faktor	Monomer 		Trigger-Faktor	-	- Ribosomen-assoziiertes Chaperon mit Funktion in der De-novo-Proteinfaltung
NAC	Heterodimer 		NAC		- Ribosomen-assoziiertes Chaperon mit potentieller Funktion in der De-novo-Proteinfaltung
SecB	Tetramer 		SecB		- Sekretion von Proteinen

[Mogk et al., 2001]

Eines der wichtigsten Chaperone ist das Hitzeschockprotein HSP 70. Die Kurzbezeichnung HSP 70 steht für Hitzeschockprotein mit einer relativen Molekülmasse 70 Kilodalton. HSP 70 ist eine Familie aus ATP-bindenden Proteinen. In den meisten Organismen existieren eine Reihe von Proteinen, die zur HSP 70 Familie zählen. Einige von ihnen werden auch unter physiologischen Bedingungen gebildet. HSP 70 wurde in verschiedenen zellulären Kompartimenten nachgewiesen, so im Zellkern, im Zytosol, in Mitochondrien, im endoplasmatischen Retikulum u.a. Sie können gezielt durch definierte Reize induziert werden, so dass eine Unterscheidung zwischen stressregulierten, glukoseregulierten u.a. HSP 70 möglich ist.

HSP 70 ist auch eines der am Besten untersuchten Hitzeschockproteine. Die an der Stressantwort beteiligten Gene sind bei vielen Organismen auffallend ähnlich. Es konnte nachgewiesen werden, dass z.B. die Nukleotidsequenz für das HSP 70 bei Bakterien, Hefen und der Taufleie zu >50% identisch ist. Offenbar wurden diese Sequenzen in der Evolution konserviert und die Genprodukte haben in allen Organismen eine ähnliche funktionelle Bedeutung. Bei den HSP 70 wurden drei Consensus-Sequenzen nachgewiesen, die bei allen Proteinen dieser Familie bei fast allen Organismen

übereinstimmend vorhanden sind (Datenbank Swiss Prot):

1. (IV)-D-L-G-T-(ST)-x-(SC)
2. (LIVMF)-(LIVMFY)-(DN)-(LIVMFS)-G-(GSH)-(GS)-(AST)-x(3)-(ST)-(LIVM)-(LIVMFC)
3. (LIVMY)-x-(LIVMF)-x-G-G-x-(ST)-x-(LIVM)-P-x-(LIVM)-x-(DEQKRSTA)

Das HSP 70 reichert sich nach einem Hitzeschock besonders im Zellkern in den Nukleoli an. Die Nukleoli sind ebenfalls der Fabrikationsort für die Ribosomen, mit deren Hilfe die Proteine translatiert und zusammengebaut werden. Da bei Hitzeschock die Synthese der Ribosomen eingestellt wird, wurde angenommen, das HSP 70 die denaturierten Ribosomen erkennt, ihre korrekte Faltung wiederherstellt und dadurch die biologisch aktive Struktur und die Funktion gewährleistet. H. R. B. Pelham und S. Munro isolierten 1986 mehrere Gene, die mit HSP 70 verwandt sind. Eines dieser Proteine ist mit dem Schwerketten-Bindeprotein (BiP) identisch, welches sich an Antikörper und andere Proteine anlagert und für die Sekretion bereit macht. Treten bei der Synthese oder Faltung Fehler auf, bleibt BiP gebunden und die Proteine werden abgebaut. Dadurch wird anscheinend gewährleistet, dass nur korrekt gefaltete Proteine sezerniert werden. Mittlerweile wurden zahlreiche weitere Gene isoliert, deren Produkte zur HSP 70 Familie gerechnet werden.

2.4. Funktionen der Hitzeschutz-Proteine

Chaperone werden nicht nur unter Stressbedingungen gebildet. Auch unter normalen Wachstumsbedingungen sind sie in Zellen nachweisbar und erfüllen physiologische Funktionen. Aufgrund ihrer Funktion können die meisten HSP in zwei Gruppen eingeteilt werden, molekulare Chaperone und Proteasen.

Funktionen der Hitzeschockproteine :

- Proteinfaltung / -entfaltung
- Auflösung von Proteinaggregaten
- Proteolyse von Proteinen
- Kontrolle der Ribosomenfunktion
- Steuerung zellulärer Proteine
- Transkription
- Reparatur von Nukleotiden
- Differenzierung von Stammzellen
- Präsentation und Bildung von Antigenen
- Transmitter von Zytokinen

2.4.1 Neusynthese von Proteinen

Die von den Ribosomen translatierten Proteinketten müssen zur Gewährleistung der biologischen Funktion eine bestimmte dreidimensionale Struktur (3D) einnehmen. Die Proteinfaltung, bei der die lineare Aminosäuresequenz nach der Proteinbiosynthese in die spezifische dreidimensionale Struktur überführt wird, ist ein sehr störanfälliger Prozess. Ein Protein kann von vielen entfalteten Zuständen aus über seine Faltungsintermediate die native Form erhalten, ist nicht an einen spezifischen Faltungsweg gebunden. Die Geschwindigkeit der Faltung und die Ausbeute an korrekt gefaltetem Protein unterscheiden sich stark. Während Proteine mit sehr kleinem Molekulargewicht vermutlich eigenständig in ihre native Struktur fallen, haben größere Proteine, die aus mehreren Domänen (funktionelle Faltungseinheiten von 100-200 Aminosäuren) bestehen, Faltungsprobleme und sind oft in nicht nativen, aggregationsgefährdeten Konformationen gefangen. Aggregate stellen unlösliche Produkte dar, welche für die Zellen

lebensbedrohlich sind.

Die Hitzeschockproteine der HSP70 (DnaK)- oder HSP 60 (groEL)-Proteinfamilie unterstützen als molekulare Chaperone diese Proteinfaltung und gewährleisten, dass die Faltungsprozesse schnell und präzise ablaufen. Sie interagieren mit teilweise oder vollständig entfalteten Proteinen und verhindern die Aggregation der Faltungs-intermediate oder denaturierter Proteine, die durch hydrophobe Proteinbereiche, falsche Protonisierung oder falsche Disulfidbrückenverbrückung verursacht wird [Schiene, Fischer, 2000].

Gezielt untersucht wurden zwei Klassen von Translationsmaschinen, die DnaK-Chaperon-Maschine, bestehend aus den HSP DnaK, DnaJ und GroE, und die GroE-Chaperon-Maschine, bestehend aus den HSP GroES und GroEL. GroEL kann erst nach Ablösen der Proteinkette vom entfalteten Protein assoziieren, DnaK vermutlich sowohl mit der wachsenden Proteinkette am Ribosom als auch mit dem freigesetzten Protein [Bukau et al. 2000, Deuring et al. 1999].

Bei der Bildung der Polypeptidketten an den Ribosomen bindet DnaK-ATP an die entstehende Kette. Nach Bindung von DnaJ wird ATP hydrolysiert und das Protein teilweise gefaltet. Der Austausch von ADP gegen ATP bei gleichzeitiger Freisetzung von DnaK wird von GrpE katalysiert. Das teilgefaltete Protein wird durch GrpE anschließend in seine native Form versetzt und freigesetzt. Ist das gebildete Protein nicht vollständig entfaltet, kann es in einen zweiten Reaktionszyklus mit der GroE-Chaperon-Maschine eintreten.

DnaK-Chaperon-Maschine

Das HSP DnaK besitzt zwei funktionelle Domänen, eine Nukleotidbindungs-Domäne zur Bindung von ATP und eine Substratbindungs-Domäne, die hydrophobe Proteinbereiche erkennt. Die Domänen beeinflussen sich durch die räumliche Anordnung gegenseitig. Erst durch ATP-Bindung wird die Substratbindung von Proteinen ermöglicht. Im Gegensatz zu GroEL schließt DnaK sein Substrat nicht vollständig ein, sondern bindet nur ein kurzes Peptidsegment von ungefähr 5 Aminosäuren [Mogk et al. 2001]. Ein entfaltetes Protein bindet an DnaK-ATP bzw. an DnaJ, welches das Protein an DnaK übergibt. Nach Bindung wird ATP zu ADP hydrolysiert, wodurch das Protein fest gebunden wird. GrpE vermittelt anschließend den Austausch von ADP mit ATP. Dadurch verändert sich die Substratbindungs-Domäne, wodurch das gebundene Protein frei wird. Dieses faltet sich dadurch vollständig in die native Form. Gelingt dies nur teilweise, wird das Protein erneut an DnaK-ATP oder an die GroE-Chaperon-Maschine gebunden. Die Zyklen des Bindens und Loslassens des Substrats sind nach neueren Berechnungen sehr kurz, etwa eine Sekunde pro Zyklus [Bukau and Horwich, 1998].

Die GroEL-Chaperon-Maschine

Das tonnenförmige HSP GroEL, welches in allen Prokaryonten, Mitochondrien und Chloroplasten vorkommt, bildet zwei Ringe aus jeweils sieben Molekülen (siehe Tab.1). Beide Ringe können Substrate phasenverschoben falten, wobei der Faltungszyklus eines Rings etwa 15 Sekunden dauert. Jedes der Moleküle GroEL bindet ein Molekül ATP. Die Ringe bilden einen Zylinder, in dessen Hohlraum etwa zwei Proteine mit einer molaren Masse bis ca. 60 kDa passen. Die vollständige Faltung der bereits partiell gefalteten Proteine erfolgt in diesem Zylinder. Das HSP GroES ist an die eine Seite des Zylinders gebunden. Das zu faltende Protein dringt auf der GroES gegenüberliegenden Seite in den Zylinder ein und bindet an bestimmte Stellen der GroEL-Untereinheiten. Nach Hydrolyse von ATP zu ADP, der durch GroES beschleunigt werden kann, werden die korrekt gefalteten Proteine freigesetzt.

HSP 70

HSP 70 besitzt Funktionen bei der Fertigstellung und Weiterleitung von Proteinen. Zytoplasmatisches HSP 70 bindet an Proteinstränge, die an Ribosomen entstehen, wodurch ein vorzeitiges Zusammenknäulen verhindert wird. Anschließend sind verschiedene Reaktionswege möglich. Bei ausreichendem ATP-Gehalt der Zelle binden HSP 70 nur kurzzeitig an unreife Proteine. Es löst sich von dem frischen Protein, so dass dieses sich in die biologisch aktive Struktur falten kann oder sich mit anderen Strängen zu einem mehrteiligen Gebilde zusammenschließt. Mitunter wird das neue Protein auch erst an ein anderes Stressprotein (TCP-1) weitergereicht, bevor es seine endgültige Konformation einnimmt. Proteine, die sezerniert werden sollen, werden im endoplasmatischen Retikulum von BiP oder einem verwandten Stressprotein übernommen, die die Faltung überwachen. Auch mitochondriale Proteine werden von HSP 70 in der korrekten Faltung unterstützt. An HSP 70 gebundene Proteine können auch an einen Komplex aus HSP 10 und HSP 60 übergeben werden. Dieser Komplex ist anschließend für die korrekte Faltung verantwortlich. Bei Stresssituationen dagegen bleiben die HSP an den Proteinen fest gebunden.

Zellen verfügen für die Faltung neu synthetisierter Proteine als auch für deren Aggregatsverhinderung unter Stressbedingungen über ein Arsenal an Chaperonen, die ein funktionelles Netzwerk bilden und sowohl für die Faltung neu synthetisierter Proteine konkurrieren als auch bei deren Rückfaltung kooperieren können.

2.4.2 Rückfaltung aggregierter Proteine

Veränderte Proteine können durch Chaperone rückgefaltet oder abgebaut werden. Möglicherweise entscheiden der Grad der Denaturierung und die Funktion des denaturierten Proteins den Reaktionsweg. Bekannt ist, dass zunächst die für das Überleben der Zelle essentiellen Proteine durch Chaperone reaktiviert werden.

Wie die Chaperone zwischen wichtigen und unwichtigen Proteinen unterscheiden können, ist unbekannt.

Die Verhinderung der Aggregation über Chaperone erfolgt durch Bindung an ein oder mehrere kurze Peptidssegmente im Protein. Diese auch als „Halter“-Funktion bezeichnete Aktivität der Chaperone ist ATP- unanhängig (z.B. sHSP). (Die als „Falter“ agierenden Chaperonmaschinen sind die o.g.HSP 70 und HSP 60).

Neuere Untersuchungen zeigen, dass Aggregationen, die lange als totes Gleis im Lebenszyklus von Proteinen betrachtet wurden, in vivo und in vitro, gesteuert von einem Chaperonsystem aus Dnak (HSP70) und ClpB (HSP 104), disaggregiert und zur aktiven Form zurückgefaltet werden können [Glover et al., 1998].

2.4.3 Funktionen beim Membrandurchtritt

Damit Proteine Membranen passieren können, müssen sie in einer langgestreckten entfalteten Form vorliegen. Diese translokationskompetente Form wird durch Chaperone gewährleistet. Diese Funktion ist am Beispiel von Hefe-Mitochondrien relativ gut untersucht worden. An den für den Durchtritt bestimmten Proteinen bindet das zytoplasmatische HSP 70 (ct-HSP 70) und das DnaJ-Homolog YDJ. Dadurch wird eine Faltung der Proteine nach der ribosomalen Synthese verhindert. Unter ATP-Hydrolyse dissoziieren beide Chaperone von der entfalteten Peptidkette, die dann durch einen Translokationskanal in das Mitochondrium transportiert wird. Hier wird das Peptid von mitochondrialem HSP 70 (mt-HSP 70) empfangen. Eine Peptidase spaltet die N-terminale Sequenz ab. Die Faltung der Peptidkette erfolgt durch Bindung von GrpE- und DnaJ-Homologen. Die Erstellung der endgültigen Konformation im Mitochondrium erfolgt im HSP 60, die Freisetzung des Proteins wird durch HSP 10 vermittelt.

2.4.4 Regulation der Hitzeschutz-Antwort

Die Regulation der Hitzeschock-Antwort bei Pro- und Eukaryoten besitzt Ähnlichkeiten, die wahrscheinlich auf die evolutionäre Entwicklung der Zellschutz-Mechanismen zurückzuführen sind. In beiden Fällen wird die Induktion der Hitzeschock-Gene durch einen Aktivator reguliert. Die Aktivität dieses Regulators wird durch DnaK bzw. HSP 70 moduliert. In Bakterien wird dieser Aktivator abgebaut, bei Eukaryoten in eine inaktive Form überführt.

Bei Eukaryoten wird die Hitzeschock-Antwort über ein als Hitzeschockfaktor (HSF) bezeichnetes Aktivatorprotein reguliert. Während bei niederen Organismen wie der Taufliege nur ein HSF-Gen vorkommt, wurden bei Pflanzen und Tieren mehrere HSF-Gene nachgewiesen, die durch unterschiedliche Stressfaktoren aktiviert werden. Ein Tier kann dadurch auf einen definierten Reiz mit einer spezifischen Hitzeschock-Antwort reagieren. Der HSF besteht aus fünf räumlich getrennten Domänen, die entsprechend ihrer Funktion als DNA-Bindungsdomäne (hochkonserviert, Kontakt mit DNA), Trimerisierungsdomäne, Anti-Trimerisierungsdomäne, Aktivatordomäne (aktiviert RNA-Polymerase) und Phosphorylierungsdomäne (Feinregulierung der HSF-Aktivität) bezeichnet werden. Dieses Protein findet sich im Zytoplasma und im Zellkern aller Zellen als Monomer. Nach einem Hitzeschock oder einem anderen Reiz bildet der HSF Trimere, akkumuliert im Zellkern und bindet an einen definierten Bereich der DNA-Sequenz, das als HSE (heat shock element) bezeichnet wird. HSE ist zwischen Promotor und Hitzeschock-Gen in mindestens drei Kopien lokalisiert. Die Promotoren der Hitzeschock-Gene befinden sich in ständiger Alarmbereitschaft, um nach Hitzeschock sofort mit der Synthese der HSP beginnen zu können. Im Promotorenbereich der Hitzeschock-Gene sind bereits verschiedene Proteine gebunden, der GAGA-Faktor, das TATA-Bindungsprotein TBP und die RNA-Polymerase II. Die Transkription wird initiiert, stoppt aber nach etwa 25 Nukleotiden, wobei die RNA-Polymerase in dieser Position verharret. Durch die Bindung des HSF-Trimers an der nachgeschalteten HSE-Sequenz wird die pausierende RNA-Polymerase durch die Aktivierungsdomäne des HSF aktiviert und die Transkription des Hitzeschock-Genes eingeleitet.

Die Bindung von HSF an HSE erfolgt etwa 30 Sekunden nach Hitzeschock. Zusätzlich wird der HSF an unterschiedlichen Aminosäuren phosphoryliert, wodurch wahrscheinlich die Aktivität moduliert wird. Wie bei Prokaryoten nimmt die Expression der Hitzeschock-Gene nach bestimmter Zeit ab, da der HSF in seine Monomere dissoziiert und z.T. den Zellkern verläßt. Die negative Regulation des HSF wird durch HSP 70 realisiert. Bei physiologischen Umweltbedingungen bindet HSP 70 an HSF und verhindert so die Trimerisierung und DNA-Bindung. Bei Einwirkung eines Stressors bindet HSP 70 bevorzugt an die verstärkt auftretenden denaturierten Proteine. Die dadurch freiwerdenden HSF-Monomere bilden Trimere, binden an HSE und werden nach Phosphorylierung als Aktivator der Transkription aktiv. Infolge der Hitzeschutz-Antwort kommt es zu einem Anstieg der HSP 70, die wiederum an HSF binden. Dies bewirkt nach einer Lösung vom HSE den Zerfall in die HSF-Monomere und damit die Inaktivierung der Transkription. An welcher Stelle die Dephosphorylierung des HSF stattfindet, ist ungeklärt.

HSP sind im Rahmen der Replikation der DNA an der Aktivierung der Helikase beteiligt. Die HSP DnaK, DnaJ und GrpE binden im Bereich des ori (Ursprung der Replikation) an einen Komplex bestehen aus dem P-Protein und dem DnaB-Protein. Um die Helikasefunktion von DnaB zu aktivieren, lösen sich die HSP unter ATP-Hydrolyse vom ori-Komplex und nehmen das P-Protein mit. Dadurch wird DnaB aktiviert und beginnt mit der Entfaltung der DNA.

HSP 70 besitzt Funktionen bei der Transkription. In Abhängigkeit vom Zellzyklus wird ein nukleärer Transfer von HSP 70 durchgeführt. Es wurde nachgewiesen, daß der Transfer von HSP 70 in den Zellkern mit der Transkriptionsaktivität embryonaler Zellen in der frühen

S-Phase gekoppelt ist (Moreau et al., 1998). HSP gewährleisten damit das Zellwachstum, die Zellteilung und die Regeneration der Zellproteine.

Molekulare Chaperone sind an der Nukleotid Reparatur beteiligt, indem sie die biologisch aktive Form der Reparaturproteine gewährleisten. Das bakterielle HSP 70 Homolog DnaK stabilisiert nach Hitzeschock das Protein UvrA, ein Schlüsselprotein zur Reparatur von DNA-Schäden, und besitzt dadurch entscheidende Bedeutung bei der Beseitigung von DNA-Schäden, der Reparatur der Nukleotide und damit der Wiederherstellung der korrekten genetischen Information.

HSP 70 ist an der Kontrolle des Zellzyklus von Stammzellen des Knochenmarks beteiligt. Es fördert die Differenzierung dieser Stammzellen und ist an der Ausprägung des Phänotypes der zu differenzierenden Zelle beteiligt. Die Induktion von HSP 70 nach Hitzeschock verhindert die Apoptose der Stammzellen und verlängert so deren Lebenszeit. Durch die Funktionen bei der Kontrolle von Entwicklung und Differenzierung myeloider Stammzellen beeinflusst HSP 70 entscheidend die Abwehrleistung des Organismus, da gezielt die Differenzierung in Zellen des weißen und roten Blutbildes induziert werden kann (Kwak et al., 1998).

Damit Proteine Membranen passieren können, müssen sie in einer langgestreckten entfalteten Form vorliegen. Diese translokationskompetente Form wird durch Chaperone gewährleistet. Diese Funktion ist am Beispiel von Hefe-Mitochondrien relativ gut untersucht worden. An den für den Durchtritt bestimmten Proteinen bindet das zytoplasmatische HSP 70 (ct-HSP 70) und das DnaJ-Homolog YDJ. Dadurch wird eine Faltung der Proteine nach der ribosomalen Synthese verhindert. Unter ATP-Hydrolyse dissoziieren beide Chaperone von der entfalteten Peptidkette, die dann durch einen Translokationskanal in das Mitochondrium transportiert wird. Hier wird das Peptid von mitochondrialem HSP 70 (mt-HSP 70) empfangen. Eine Peptidase spaltet die N-terminale Sequenz ab. Die Faltung der Peptidkette erfolgt durch Bindung von GrpE- und DnaJ-Homologen.

2.4.5 Immunologische Funktionen

HSP werden nicht nur als Reaktion auf Umweltreize verstärkt synthetisiert, sondern auch bei Infektionen, Entzündungen, Fieber, Durchblutungsstörungen, Sauerstoffschädigungen, Zell- oder Gewebstraumata und Tumoren induziert. Mittlerweile sind verschiedene Interaktionen von HSP mit dem Immunsystem beschrieben worden:

- Bestimmte HSP sind an der Bildung und Präsentation von Antigenen beteiligt. In Untersuchungen konnte nachgewiesen werden, dass HSP 70 spezielle Funktionen bei der Antigenprozessierung und –präsentation wahrnimmt. Einige Mitglieder der HSP 70 Familie besitzen eine hohe Ähnlichkeit in Struktur und Funktionsweise mit dem Haupt-Histokompatibilitäts-Antigen I (major histocompatibility complex, MHC I). Wie diese MHC I binden auch HSP 70 an kleinere Peptide. Diese Bindungsstellen sind bei MHC I und HSP 70 analog. Dies deutet darauf hin, dass HSP 70 integrale Komponenten des Immunsystems sein könnten.
- Einige HSP gehören zu immunodominanten Antigenen. Vor allem HSP 60 und HSP 70 sind wirksame Immunogene. Stressproteine sind vielfach die hauptsächlichen Antigene, an denen das Immunsystem die Infektion auslösenden Mikroorganismen erkennt und die es nutzt, um gegen sie vorzugehen.
- Es konnte nachgewiesen werden, dass HSP über spezifische Rezeptoren an die Oberfläche von Antigen-präsentierenden Zellen (antigen presenting cells, APC) wie Monozyten und dendritische Zellen gebunden werden. Über eine Rezeptorvermittelte Endozytose werden die gebundenen HSP internalisiert. Auch in endosomalen

Strukturen konnten aufgenommene HSP und MHC I Moleküle nachgewiesen werden. Dadurch können auch die an HSP gebundenen Proteine oder Antigene von APC aufgenommen und die HSP-Antigen-Komplexe den MHC I präsentiert werden. Dieser Vorgang erklärt die Immunogenität von HSP-Peptid-Komplexen [Arnold-Schild et al., 1999].

- Bei einer Vielzahl bakterieller Infektionen sind bakterielle HSP die Ziele der immunologischen Antwort des Wirtsorganismus. Diese immunologische Antwort kann zur Elimination der Erreger führen.
- HSP werden nach intrazellulärer Infektion unterschiedlich reguliert und sind von großer Bedeutung bei der Reaktion auf parasitäre Infektionen. Nach Infektion mit Leishmanien werden HSP von Makrophagen nur durch virulente Stämme des Parasiten induziert [Adhuna et al., 1997].
- HSP der Wirtszellen werden bei einigen Virusinfektionen für die korrekte Faltung und den Zusammenbau viraler Proteine genutzt [Hwang et al., 1998].
- Es konnte nachgewiesen werden, dass die Induktion von HSP bei Prionen-Erkrankungen verändert ist. Die Ursache von Erkrankungen wie Kuru, CJD (Creutzfeld-Jakob-disease) oder BSE (bovine spongiform encephalopathy) ist die Konversion des zellulären Prionenproteins (PrPC) in die korrespondierende Scrapie-Isoform (PrPSc). Es wird angenommen, dass Störungen der HSP-Funktion oder -Synthese deren Einsatz als molekulare Chaperone beeinträchtigen und damit die Fehlfaltung des PrPC verursachen [Tatzelt et al., 1998].
- HSP stimulieren spezifisch bestimmte Populationen von T-Zellen. So werden Antigen-spezifische zytotoxische T-Lymphozyten durch verschiedene Klassen von HSP über MHC I stimuliert.
- HSP stimulieren spezifisch Zellen der unspezifischen Abwehr wie Makrophagen und NK-Zellen.
- HSP 60 und 70 sind an der Stabilisierung von Interferon-gamma (IFN- γ) beteiligt und gewährleisten dadurch die biologische Wirkung von IFN- γ . Bei der Einwirkung von Stressoren verhindern die von HSP 60, 70 und GrpE gebildeten Chaperonmaschinen durch Anlagerung und Komplexbildung die Entfaltung von IFN- γ und damit die Inaktivierung [Vandenbroeck und Billau, 1998].
- HSP sind bei der Entzündungsreaktion an der Übermittlung von Zytokinsignalen und der Kontrolle der Genexpression von proinflammatorischen und inflammatorischen Zytokinen beteiligt. Durch die Lokalisation auf Zelloberflächen sind sie mitverantwortlich für die Erkennung durch zytotoxische Zellen wie Makrophagen und T-Lymphozyten und sind beteiligt an der Antigenpräsentation. HSP können unter bestimmten Bedingungen an TNF binden. Experimentell wurde nachgewiesen, dass eine kurze Hitzebehandlung zu einer Induktion von HSP 70 führt, welches mit TNF interagiert und dieses dadurch inaktiviert. HSP 70 schützt mit diesem Mechanismus Makrophagen vor der TNF α -Wirkung im Entzündungsherd und gewährleistet dadurch deren immunologische Funktion. Sie besitzen somit entscheidende Funktionen bei der Auslösung der Entzündungsreaktion und bei der Erkennung und Beseitigung der veränderten Zellen [Moseley, 1998].
- Möglicherweise sind körpereigene HSP die Ursache von Autoimmunerkrankungen. Der Organismus bildet in einigen Fällen Antikörper gegen körpereigene Stressproteine. Dieser Zusammenhang zwischen Autoimmunerkrankung und Stressproteinen scheint bei rheumatoider Arthritis, der Bechterewschen Krankheit und dem systemischen Lupus erythematoses zu existieren.
- HSP binden Proteine der Onkogene und Tumor-Suppressor-Gene. Tumore entstehen bei Mutationen dieser Gene, die ein unkontrolliertes Zellwachstum verursachen. HSP binden sehr effizient an Produkte mutierter Gene. Wahrscheinlich sind mutierte Proteine teilweise entfaltet und exponieren dadurch verstärkt hydrophobe

Aminosäuren, wodurch eine hohe Affinität zu HSP verursacht wird. HSP 70 bildet mit mutierten Onkoproteinen unlösliche Aggregate. Durch die Bindung von HSP 90 werden Onkoproteine inaktiviert. Durch die Bindung an HSP und die Wechselwirkungen von HSP und MHC kann daher ein für den Organismus potentiell bedrohliches Onkoprotein ausgeschaltet und damit das Tumorwachstum in der Anfangsphase verhindert werden.

- Hohe Level an HSP fungieren als immunstimulatorisches Signal und induzieren einen Apoptose-unabhängigen Zelltod von Tumorzellen.

2.4.6 Andere Funktionen

- HSP wurden als extrazelluläre Wachstumsfaktoren identifiziert. Der EPF (early pregnancy factor) ist ein Homolog von CPN 10. Dieser Faktor ist im frühen Stadium der Gravidität verantwortlich für das Überleben des Embryo und wirkt als Wachstumsfaktor und Immunsuppressivum. EPF wurde aber ebenfalls in proliferierenden neoplastischen Zellen nachgewiesen, wo er als autokriner Wachstumsfaktor fungiert. Es wird angenommen, dass dieser Faktor an der Ausprägung der Multiplen Sklerose beteiligt ist [Morton, 1998].
- Molekulare Chaperone sind an der Nukleotid-Reparatur bei DNA-Schäden beteiligt, indem sie die biologisch aktive Form der Reparaturproteine gewährleisten.

Anwendungen

HSP werden nicht nur als Reaktion auf Umweltreize verstärkt synthetisiert, sondern auch bei Infektionen, Entzündungen, Fieber, Durchblutungsstörungen, Sauerstoffschädigungen, Stoffwechselveränderungen, Zell- oder Gewebstraumata und Tumoren induziert.

Aufgrund der vielfältigen Funktionen der HSP bei grundlegenden Stoffwechselvorgängen (Zellproteinsynthese, Zellwachstum und –differenzierung) und dem Schutz in Stresssituationen ergibt sich eine Vielzahl von Anwendungsmöglichkeiten:

- Toxikologie
- Diagnose / Therapie von Tumorerkrankungen
- Organtransplantationen
- Infektionsdiagnostik
- Therapie von Viruserkrankungen
- Immunologie
- Kardiologie / Herzchirurgie
- Wundheilung

3.1 Einsatz der Stressantwort in der Toxikologie

Veränderte Level an Stressproteinen könnten als toxikologische Marker für Aussagen über die Toxizität von Pharmaka, Kosmetika oder Lebensmittelsusätzen eingesetzt werden. In diesem Zusammenhang gelang es Reportergenen, also Kombinationen von Stressgenen und Indikatorgenen wie β -Galactosidase, gentechnisch herzustellen. Bei Einfluss von Stressoren auf Zellen mit diesen Gensequenzen kann über das Reportergen die Stärke des Reizes mit verschiedenen Methoden dargestellt und quantifiziert werden. Derartige Systeme können zur Substanzprüfung auf Teratogenität eingesetzt werden (Patent US5346812). Versuche zur Messung von Umweltschadstoffen mit genetisch veränderten Organismen wurden von der Firma Stressgene Biotechnologies in Zusammenarbeit mit der University of British Columbia erfolgreich durchgeführt. Auch andere Arbeitsgruppen konnten mit transgenen Organismen Schadstoffprüfungen durchführen. Derartige Anwendungen wurden mehrfach in Patenten beschrieben (Patent EP651825, EP680517,

US5464750, EP559770, US7617901).

3.2 Einsatz von HSP bei der Tumorerkennung

HSP können bei der Diagnose und Prognose von Tumoren eingesetzt werden. Die Prognose für Krebspatienten kann durch die induzierte Expression von HSP 60 gestellt werden (Patent US5434046). Die Diagnostik neoplastischer Veränderungen und deren Klassifizierung kann durch die Erkennung von p53-HSP 70-Komplexen erfolgen (Patent EP636248, EP576476).

3.3 Einsatz von HSP in der Tumorthherapie

Grundlage dieser Therapie ist die Beteiligung der HSP bei der Prozessierung und Präsentation von Antigenen. Nach chirurgischer Entfernung eines Tumors wird aus dem lysierten Material HSP isoliert. Wird der Patient mit dem isolierten HSP behandelt, bindet es an die Oberflächenproteine der Tumorzellen. Der HSP-Tumor-Komplex wird von den Makrophagen erkannt und die Tumorproteine über Antigen-präsentierende Zellen den T-Zellen präsentiert. Nach Erkennung der immunogenen Peptide wird eine Antikörperantwort induziert. Eine derartige Therapie mit HSP 27 ist bereits beschrieben (Patent EP630404). Die Erwartung ist, dass es nicht nur zur Eliminierung der vorhandenen Tumoren kommt, sondern dass diese Therapie einen lebenslangen Schutz vor der Tumorart vermittelt und auch einer Metastasierung entgegenwirkt [Menoret et al., 1998]. Ein anderer Ansatzpunkt ist die Funktion der HSP bei der Inaktivierung von Onkoproteinen. Eine Applikation von HSP könnte die mutierten Onkoproteine binden und inaktivieren und so eine wirksame Begleittherapie darstellen. Eine derartige Applikation unter Beteiligung von Metallen wurde erprobt und patentiert (Patent WO9421288).

HSP binden sehr effizient an Produkte mutierter Gene. HSP 70 bildet mit mutierten Onkoproteinen unlösliche Aggregate. Durch die Bindung an HSP und die Wechselwirkungen von HSP und MHC kann daher ein für den Organismus potentiell bedrohliches Onkoprotein ausgeschaltet und damit das Tumorwachstum in der Anfangsphase verhindert werden.

3.4 Verhinderung von Abstoßungsreaktionen nach Organtransplantationen

Die Stressantwort des Organismus ist möglicherweise ein Mechanismus für Abstoßungsreaktionen. Die Abstoßung des Transplantates wird anscheinend durch HSP-induzierte autoreaktive T-Zellen verursacht. Die Blockade von HSP soll bei Organtransplantationen eine Immunantwort gegen das Transplantat verhindern. Immunsuppressiva wie Desoxyspergualin (DSG) supprimieren sowohl die humorale als auch die zelluläre Immunität. DSG bindet an HSC 70 und verhindert dadurch die Interaktion mit HSP 40. Diese Blockade hemmt die ATPase-Aktivität von HSC 70 und verhindert so die Freisetzung der an HSP gebundenen Proteine. Damit wird die Prozessierung und in der Folge die Präsentation von Antigenen verhindert. Erste Einsätze bei Nieren- und Lebertransplantationen wurden mit gutem Erfolg durchgeführt [Duquesnoy et al., 1999].

3.5 Einsatz von HSP zur Immunisierung

Da das Immunsystem HSP erkennt und eine adäquate Immunantwort auslöst, können Immunisierungen mit in HSP eingebauten spezifischen Antigenen durchgeführt werden. Experimentell gelang die Induktion einer Immunantwort gegen in HSP eingebaute Malaria-Antigene. Derzeit werden zahlreiche Untersuchungen mit verschiedenen Antigenen zu dieser Immunstrategie durchgeführt, eine Reihe von allgemeinen und speziellen Patenten existieren bereits (WO9429459, EP632727, US5288639 (Candida albicans), WO9426901 und EP643770 (Helicobacter pylori), EP556248 (Mycobacterium tuberculosis)). Auch die

Induktion einer zytotoxischen T-Zell-Antwort durch die Applikation von HSP (Patent WO9524923) oder der Einsatz von HSP als Adjuvanz (Patent EP658120) ist möglich.

3.6 Immunologie

- HSP 70
- ◇ Antigenprozessierung und –präsentation
 - ◇ Wechselwirkungen mit den humoralen Bestandteilen der Abwehr
 - ◇ Stabilisierung von Interferon-gamma (IFN- γ)
 - ◇ Der Stimulation von zellulären Bestandteilen der Abwehr:

Durch die Funktionen bei der Kontrolle von Entwicklung und Differenzierung myeloider Stammzellen beeinflusst HSP 70 entscheidend die Abwehrleistung des Organismus, da gezielt die Differenzierung in Zellen des weißen und roten Blutbildes induziert werden kann. Es ist beteiligt an der Antigenprozessierung und –präsentation sowie an Wechselwirkungen mit den humoralen Bestandteilen der Abwehr. Dies deutet auf darauf hin, dass HSP 70 integrale Komponenten des Immunsystems sind. Sie sind vielfach die hauptsächlichen Antigene, an denen das Immunsystem die Infektion auslösenden Mikroorganismen erkennt und die es nutzt, um gegen sie vorzugehen.

HSP 70 ist an der Stabilisierung von Interferon-gamma (IFN- γ) beteiligt und gewährleistet dadurch dessen biologische Wirkung. Bei der Einwirkung von Stressoren verhindern die Chaperon-Maschinen mit Beteiligung von HSP 70 die Entfaltung von IFN- γ und damit dessen Inaktivierung. Körperfremdes HSP 70 induziert aber auch die Bildung von IFN- γ der Zielzellen und stimuliert dadurch die Immunantwort des Organismus.

HSP können unter bestimmten Bedingungen an TNF binden. HSP 70 schützt Makrophagen vor der TNF α -Wirkung im Entzündungsherd und gewährleistet dadurch deren immunologische Funktion. Sie besitzen somit entscheidende Funktionen bei der Auslösung der Entzündungsreaktion und bei der Erkennung und Beseitigung der veränderten Zellen. HSP 70 schützen nach Induktion bei Sepsis auch periphere mononukleäre Blutzellen (PBMC) vor der zytotoxischen Wirkung von TNF α .

HSP 70 stimulieren die zelluläre Synthese proinflammatorischer Zytokine wie Interleukin (IL)-1 β und IL-6. HSP 70 ist dadurch ein entscheidender Bestandteil der Entzündungsreaktion und der Akute-Phase Antwort des Organismus auf Entzündungsreize.

HSP stimulieren spezifisch bestimmte Populationen von T-Zellen. So werden Antigen-spezifische zytotoxische T-Lymphozyten (CTL) durch verschiedene Klassen von HSP über MHC I stimuliert. Die Applikation von HSP 70 mit Virusproteinen induziert eine protektive Immunität, welche durch CTL und Memory-Zellen vermittelt wird.

HSP 70 aktiviert bei bakteriellen Infektionen CD4⁺ T-Zellen. Durch die Produktion der Zytokine TGF- β und IL-10 dieser aktivierten Zellen wird die Th 1 vermittelte Entzündungsantwort reguliert. HSP schützen dadurch den Organismus vor einer exzessiven Entzündungsreaktion nicht nur durch die Zellschutzmechanismen sondern auch durch die Induktion immunregulatorischer T-Zellen.

HSP 70 sind beteiligt am Zusammenbau und der Herstellung einer biologisch aktiven Struktur von MHC II. Bei allergischen Reaktionen stimulieren HSP 70 über die Antigenpräsentation und Bindung an MHC II Strukturen die Ausprägung einer adäquaten T-Zell-Antwort.

HSP stimulieren spezifisch Zellen der unspezifischen Abwehr wie Makrophagen und NK-Zellen. Es wird angenommen, daß Monozyten die Hauptorte der HSP 70 Produktion nach einer Stressreaktion sind. Damit ist HSP 70 die Grundlage der unspezifischen NK-vermittelten Immunantwort, z.B. gegen Tumorzellen, aber auch gegen andere Antigene.

3.6 Einsatz von HSP in der Diagnostik

- Zur Diagnostik bakterieller Infektionen wie der Chlamydiose können HSP's eingesetzt werden. Es wurde nachgewiesen, dass Patientinnen mit einer Chlamydieninfektion ungewöhnlich viele Antikörper gegen das Stressprotein GroEL von Chlamydien besitzen. Untersuchungen an anderen Mikroorganismen werden derzeit durchgeführt.
- HSP wurden in der Humanmedizin zur Bestimmung des Schweregrades von Infarkten oder Schlaganfällen eingesetzt. Eine Induktion von Stressproteinen wurde bei Hypoxie nachgewiesen. Der auftretende Mangel an Sauerstoff und ATP kann dadurch kurzzeitig toleriert werden. Wahrscheinlich besitzen HSP aber auch Funktionen beim Zellschutz, wenn infolge der Normalisierung der Sauerstoffversorgung freie Radikale gebildet werden. Die Stärke der Synthese von HSP infolge Hypoxie korreliert mit der Schwere der Durchblutungsstörung und ist ein Indiz für die Stärke der Gewebsschädigung.
- Die genetische Information von HSP sind die Grundlage verschiedener Nachweissysteme. So werden Abschnitte der Nukleinsäure-Sequenz von HSP 70 als Sonden zur Diagnose von Mycobacterium paratuberculosis (Patent EP619375) und Abschnitte der Aminosäure-Sequenz von HSP 71 zum Nachweis von Mycobacterium tuberculosis (Patent WO9314118) eingesetzt.
- Durch gegen Epitope von HSP 60 gerichtete monoklonale Antikörper kann Pseudomonas aeruginosa nachgewiesen werden (Patent EP543091).
- Die Diagnose von Autoimmunerkrankungen über HSP wurde beschrieben (Patent JP07181180).
- Der Einsatz von HSP 65 zur Diagnostik Diabetes-assoziiierter Antikörper wurde in Patent WO9221979 beschrieben.

3.7 Einsatz von HSP bei der Infarktprophylaxe.

In Tierversuchen wurde nachgewiesen, dass eine verstärkte Produktion von HSP 70 die Herzscheiden nach Infarkt um 40-50% reduzierte. Derzeit zeichnen sich zwei therapeutische Strategien ab, die selektive Erhöhung der körpereigenen HSP 70 Produktion in gefährdeten Organen durch Gentherapie und die medikamentelle Induktion einer Hitzeschutzantwort. Von Präparaten wie Acetylsalicylsäure ist seit langem bekannt, dass sie bei regelmäßiger Einnahme das Infarktrisiko senken, der Wirkmechanismus ist bislang aber unbekannt.

3.8 Einsatz von HSP zur Therapie und Prophylaxe anderer Erkrankungen.

In Untersuchungen wurde nachgewiesen, daß HSP die Synthese von Prokollagen in Osteoblasten stimulieren und damit die Knochenbildung fördern. Dies kann für die Therapie von Osteoporose u.ä. Erkrankungen ausgenutzt werden (Patent JP07233083). Ein monoklonaler Antikörper gegen HSP 47 kann zur Therapie der Leberzirrhose eingesetzt werden (Patent JP 07061936). Zur Therapie von Entzündungskrankheiten wurde ein Proteingemisch aus HSP (Patent WO9525744) und ein Abschnitt des HSP 65 (Patent EP503055) beschrieben. Verschiedene Untersuchungen beschäftigten sich mit der immunoregulatorischen Wirkung bakterieller HSP. Zur Verhinderung von Autoimmunerkrankungen können Abschnitte bakterieller oder parasitärer HSP eingesetzt werden (Patent GB 2251186). Weitere Untersuchungen beschäftigen sich mit dem Zellschutz. Dazu wird HSP 70 verschiedenen Ursprungs zur Reduktion der Zellmortalität eingesetzt. Dies könnte zur Therapie von verschiedenen Erkrankungen wie Arteriosklerose oder Verletzungen eingesetzt werden (Patent EP527783, US5348945).

Weitere Beobachtungen:

Es konnte nachgewiesen werden, dass die Induktion von HSP bei Prionen-Erkrankungen

verändert ist. Die Ursache von Erkrankungen wie Kuru, CJD (Creutzfeld-Jakob-Disease) oder BSE (bovine spongiform encephalopathy) ist die Konversion des zellulären Prionenproteins (PrPC) in die korrespondierende Scrapie-Isoform (PrPSc). Es wird angenommen, daß Störungen der HSP-Funktion oder -Synthese deren Einsatz als molekulare Chaperone beeinträchtigen und damit die Fehlfaltung des PrPC verursachen (Tatzelt et al., 1998).

Möglicherweise sind körpereigene HSP die Ursache von Autoimmunerkrankungen. Der Organismus bildet in einigen Fällen Antikörper gegen körpereigene Stressproteine. Dieser Zusammenhang zwischen Autoimmunerkrankung und Stressproteinen scheint bei rheumatoider Arthritis, der Bechterewschen-Krankheit und dem systemischen Lupus erythematoses zu existieren.

Bestandteile und Wirkungen von BG-MUN

Das Präparat BG-MUN wird aus der Zelllinie MDBK produziert. Folglich sind in Abhängigkeit vom Stadium des Zellzyklus neben den strukturellen zellulären Proteinen und den für die Zellvermehrung gebildeten Strukturen auch entsprechende Regulations-Proteine im Präparat vorhanden. Im Einzelnen handelt es sich um die im folgenden aufgelisteten Proteine mit teilweise bekannter Funktion:

Tab. 2: Regulations-Proteine im BG-MUN

Abkürzung / Bezeichnung	Funktion
Cdc37	Proteinkinase mit Bindung an Subunit HSP 90, generelle Bedeutung für Stabilisierung von Kinasen postuliert
Cdc42	kleine GTPase, strukturell verwandt mit Proto-Onkogen p21-ras, Bedeutung für Kontrolle von Zellwachstum und -differenzierung sowie intrazelluläre Organisation
Cdk1-8	zyklusabhängige Kinase, Proteinkinasen, Funktionen bei Regulation in der G1- und S-Phase des Zellzyklus Die Aktivierung der cdc2 Kinase (Cdk1, p34cdc2, MPF) führt zum Einsetzen der Mitose, Die Aktivierung durch Fas- oder ICE-Proteasen vermittelt den Zelltod
Cyclin D1	steuert Übergänge zwischen den Phasen des Zellzyklus durch Regulation der cdk's
DNA-Topoisomerase II	entscheidende Bedeutung bei der Zellproliferation, reguliert die Formation und Entwindung der DNA
GAK	Cyclin G-assoziierte Kinase
Histone	Bindung von DNA im Komplex mit den Histonen H2A, H2B, H3 und H4
Kip1	p27, Cyclin abhängiger Kinase-Inhibitor 1B, beteiligt an der G1 Arretierung, bindet an Nuklearkomplexe aus Cyclin E-cdk2, Cyclin A-cdk2 und Cyclin-cdk4 und inhibiert Aktivität von cdk
KKIALRE	Proteinkinase, wahrscheinlich Funktion bei Phosphorylierung
Mcm3/ 7	Minichromosome maintenance (Mcm), Bestandteil der regulatorischen Komplexe zur Steuerung der DNA-Replikation in der S-Phase
Mek	MAP Kinase Kinase, aktiviert durch MAPKKK und

	Rückkopplung auf Aktivierung von MAPK-Protein durch verschiedene Signalkaskaden
Mos	Proto-Onkogen (c-Mos), aktiviert MAP-Kinasen, zytostatischer Faktor, arretiert Zellzyklus in M-Phase und reguliert Oozyten-Maturation
p53	bindet an DNA, reguliert Zellzyklus durch Aktivierung der Transkription von Genen, arretiert Zyklus bei DNA-Schäden in G1
PCNA	proliferating cell nuclear antigen (PCNA), Kofaktor von DNA-Polymerase δ
PSTAIRE	Domäne von cdc2, Kontrolle Zellzyklus, erforderlich für Eintritt in die S-Phase und die Mitose
S6Kinase	ribosomales Protein
Wee1	Kinase
WAF-1	downstream Effektor für p53, vermittelt den Zyklusarrest bei DNA-Schäden

Durch Tierversuche im Infektionsmodell *B. bronchiseptica* und proteinanalytische Untersuchungen konnte nachgewiesen werden, dass Präparationen aus den physiologisch während der Zellvermehrung der Zelllinie MDBK gebildeten zellulären und regulatorischen Proteine keine Wirksamkeit auf die bakterielle Nierenbesiedlung besitzen. Die immunmodulatorische Wirkung des Präparates BG-MUN ist daher auf Proteine zurückzuführen, die im Verlauf der zellulären Antwort auf Stressbedingungen während der Herstellung (Nahrungsentzug, Toxifizierung) gebildet werden und Bestandteil der zellulären Hitzeschutz-Antwort sind. Die vergleichende Untersuchung der Proteinmuster zwischen BG-MUN und anderer, sowie die Ergebnisse der Versuche zur Bestimmung der mRNS-Populationen, zeigen entsprechende Unterschiede sowohl im Protein- als auch im Nukleinsäuremuster.

Durch den Herstellungsprozess von BG-MUN werden bestimmte Proteinfractionen verstärkt gebildet. So wird im ersten Schritt die weitere Vermehrung der Zellen verhindert. Die Mitose wird im G1-Restriktionspunkt unterbrochen (ALBERTS et al., 1995). Durch Gabe Erhaltungsmedium mit essentiellen Aminosäuren wird der Zelle trotz des Mitosestopps aber eine weitere Proteinsynthese ermöglicht. Die suboptimale Versorgung der Zelle führt zu einer Stressreaktion und damit zu einer verstärkten Synthese von zellulären Schutzproteinen wie den Hitzeschockproteinen. Die anschließende Supplementation der Zellen mit Natriumselenit-Pentahydrat kann durch die zelluläre Schutzreaktion nicht ausreichend kompensiert werden. Im Verlauf der zellulären Reaktion auf die Toxifizierung schaltet die Zelle den Stoffwechsel von der Hitzeschutzreaktion auf den programmierten Zelltod (Apoptose) um. Zahlreiche der mit der Hitzeschutzreaktion und der Apoptose assoziierten Proteine besitzen immun-modulatorische Eigenschaften. Die Funktionen dieser Proteine und deren Auswirkung auf den Makroorganismus sind nur zum Teil bekannt. Für einige der Apoptose-assoziierten Proteine konnten Wechselwirkungen mit dem Immunsystem nachgewiesen werden. Beispiele für derartige Proteine sind:

Tab. 3 : Mögliche immunmodulierende Proteine im BG-MUN

Abkürzung / Bezeichnung	Funktion
4-1BB	CD137, TNFR-Familie, kostimuliert IL-2
3pk	MAPKAPK-3, aktiviert durch Wachstumsfaktoren,

	Mitogene, Stress
Annexin	Expression auf Zelloberflächen bei Apoptose
Apaf-1	apoptosis protease-activating factor
Bad	aktiviert Apoptose
Bcl-w	fördert Überleben der Zellen bei Toxifizierung
Bim/BOD	induziert Apoptose
CRP	Akute Phase Protein, erhöht nach Entzündung oder Gewebstrauma
Calnexin	Interaktion im endoplasmatischen Retikulum mit MHC I, T-Zell-Rezeptor und IgG's
Calcineurin A	beteiligt an T-Zell-Aktivierung und Apoptose
Calreticulin	Chaperon-Aktivität
Caspasen	Caspase 2 bis 10, Regulation Apoptose
CLIP	schützt MHC II Bindungsstellen
Cpn10	Chaperonin (HSP10), identisch mit early pregnancy factor
CXCR4	Chemokin, Korezeptor von CD4 für HIV-1
Cytochrome P450	Ursache für oxidativen Stress in der Leber, Bestandteil des MFO-Systems
Daxx	Adaptormolekül, bindet an Fas-Rezeptor, beteiligt an stressaktivierter JNK-Kaskade
DcR2	Mitglied der TNF-Liganden Familie, induziert Apoptose DJ-1 beteiligt an Ras-Signal Transduktion
DR5	Mitglied TNF-R Familie
Erk2	Endprodukt MAP-Kinase-Kaskade, aktiviert T-Zellen
ERp57	Komponente MHC I Protein-Komplex
FADD	vermittelt Apoptose über Caspasen
Fas	Rezeptor für Cytokin-Ligand FasL
FKBP54	Immunophilin
FRAP	Immunophilin
Glutathion	in allen Zellen Funktion bei Hemmung der Formation freier Radikale nach oxidativem Stress und bei der Entgiftung
Grp58	Bestandteil MHC I Protein-Komplex
Grp78	Immunglobulin bindendes Protein
Grp94	HSP100
GrpE	HSP24
HIF-1	beteiligt an Genregulation Apoptose
HLA-DM	MHC-Molekül
HS1	beteiligt an Signaltransduktion zur Initiierung von Antigenrezeptoren
Hsc70	HSP73
HSF1	reguliert mit HSE Hitzeschock-Gene
HSP25	zytoplasmatische HSP
HSP27	Funktion nicht bekannt
HSp30, HSP65	Funktion unbekannt
HSP40	homolog zu DnaJ
HSP74	lokalisiert im endoplasmatischen Retikulum
HSP60	Cpn60
HSP70	Siehe Pkt. 2
HSP70B'	nur nach Stress exprimiert

HSP90	zytosolisches HSP
HSP104	HSP100-Familie
HSP110	
IL-1Racp	Interleukin-Rezeptor
Il-3R	Interleukin-Rezeptor
IRAK	beteiligt an Il-1 vermittelter Entzündung
IRAK2	erforderlich für Il-1 induzierte Aktivierung von NFκB
JAK2	Kinase, Signaltransduktion von Zytokinrezeptoren
JKK1	Kinase, beteiligt an Stressantwort und Antwort auf inflammatorische Zytokine
MAPKAPK-2	p45HSP27 Kinase, aktiviert durch Stress, Il-1 und TNF
Methallothionin	induziert Lymphozyten-Proliferation
MyD88	beteiligt an Entzündungsantwort, induziert durch Il-1, Il-8 und Endotoxin
iNOS	inducible nitric oxid synthetase, vermittelt tumorizide und bakterizide Effekte
p60	beteiligt an Stressantwort
Rac1	GTP bindendes Protein, beteiligt an Funktion neutrophiler Granulozyten
RAIDD	vermittelt Apoptose durch Fas und TNF R1
RICK	reguliert Apoptose
SAPK α - γ	durch Stress aktivierte Proteinkinase
SOD	superoxid dismutase, eliminiert zytotoxisch aktiven Sauerstoff
STAT	signal transducer and activators of transcription, regulieren Transkription, Induktion u.a. durch Zytokine, STAT 4 = γ Interferon
TAP1	Transmembran-Protein, Komponente der MHC I Antigen-Präsentation
Tapasin	Transmembran-Glycoprotein, Komponente der MHC I Antigen-Präsentation
TNF-R1/R2	tumor necrosis factor receptor, vermittelt Apoptose
TRAF 1-6	mit TNF-R assoziierte Faktoren
TRAIL	Mitglied TNF-Familie

Viele der im Rahmen von Apoptose bzw. Zellschutz nachgewiesenen Proteine besitzen Rezeptorfunktionen für humorale oder zelluläre Komponenten des Immunsystems bzw. sind an immunologischen Signalkaskaden beteiligt. Für die Hitzeschutzproteine wurden immunologische Wirkungen beschrieben (siehe Punkt 2).

Das produzierte Präparat enthält immunmodulierende Proteine. Durch experimentelle Untersuchungen konnte im Infektionsmodell „*Bordetella bronchiseptica*“ durch die Applikation von BG-MUN eine Reduktion der bakteriellen Nierenbesiedlung um 2 bis 3 lg (99,9-99,99%) erreicht werden. Bei vergleichenden Untersuchungen mit bekannten immunmodulierenden Substanzen wie Freund'schem Adjuvanz zeigten experimentell die Überlegenheit bzw. Gleichwertigkeit von BG-MUN. Die Applikation von BG-MUN führte zu einer nachweisbaren Beeinflussung von humoralen Faktoren der unspezifischen Abwehr. Die Erhöhung der Aktivität des Gesamtkomplementes sowie die Stimulation proinflammatorischer Zytokine konnten nachgewiesen werden. Auch hämatologische Parameter konnten nach Applikation von BG-MUN beeinflusst werden.

Das Präparat BG-MUN besteht nach der Herstellung aus Mischproteinen, die eine nachweisbare immunmodulierende Wirkung besitzen und die Ausprägung einer Paramunität unterstützen.

Als Leitsubstanz für die Kontrolle der Wirkung des Präparates wurde das Hitzeschockprotein HSP 70 festgelegt, da der Nachweis von HSP 70 ein eindeutiger Parameter für eine zelluläre Stressreaktion ist und die eindeutigen Beziehungen zwischen HSP und immunologischen Parametern nachgewiesen sind. HSP 70 wird quantitativ mittels Enzymimmunoassay, Dot Blot und PAGE bestimmt.

Die Wirksamkeit von BG-MUN konnte in Laborversuche bzw. Feldstudien an 5 Tierarten (Maus, Hund, Katze, Rind, Schwein) nachgewiesen werden. Die GMP- und GCP-konform durchgeführten Untersuchungen mit BG-MUN^{vet} belegen die lokale und allgemeine Verträglichkeit bis zur dreifachen therapeutischen Dosis sowie nach wiederholter Anwendung. Entsprechende Gutachten liegen vor.

Erste Ergebnisse von BG-MUN-Applikationen (1,5 – 2 ml / Injektion i.m. 1-2 x wöchentlich) in humanen Einzelfallstudien bei HCV und HIV bestätigen die immunregulative Wirkung und deutliche Verbesserung des Allgemeinzustandes des Patienten [Literatursammlung Einzelfallstudien).

Zusammenfassung

Bei Veränderungen von Umweltbedingungen ergreifen Zellen Schutzmaßnahmen, indem sie vermehrt eine bestimmte Klasse von Proteinen produzieren, die sie vor Schäden bewahren. Dieses Phänomen wird als Hitzeschock-Antwort, die gebildeten Proteine als Hitzeschockproteine (HSP) bezeichnet. Mittlerweile ist bekannt, dass Zellen in dieser Art und Weise auch auf andere Umwelteinflüsse und Situationen reagieren. Da der zelluläre Abwehrmechanismus dabei immer derselbe ist, spricht man heute von der zellulären Stressantwort und von Stressproteinen oder Chaperonen. Die Stressproteine schützen die Zellen vor den negativen Einflüssen des Stress und erlauben eine Erholung und ein Überleben unter diesen Bedingungen. Durch die verstärkte Synthese von HSP unter Stresssituationen kann die Zelle irreparabel geschädigte Proteine schneller erkennen, beseitigen und sich damit regenerieren. Die HSP haben aber nicht nur eine Zellschutzfunktion. Viele stehen in enger Wechselwirkung mit Faktoren des Immunsystems.

Der Immunmodulator „BG-MUN“, produziert aus MDBK-Zellen unter Stressbedingungen, enthält immunmodulierende und regulatorische Proteine. Neben Zellkulturmedium, Spuren von FKS, Natriumselenit-Pentahydrat sind Stressproteine (Hsp 70, HSP 60, GrpE) die wirksamen charakterisierten Hauptbestandteile.

Literaturverzeichnis

Adhuna; Salotra, P.; Mukhopadhyay, B. und R. Bhatnagar. 1997. Modulation of macrophage heat shock proteins (HSPs) expression in response to intracellular infection by virulent and avirulent strains of leishmania donovani. Biochem. Mol. Biol. Int.; 43:1265-1275.

Arnold-Schild, D.; Hanau, D. et al. 1999. Cutting edge: Receptor-mediated endocytosis of heat shock proteins by professional antigen-presenting cells. J. Immunol.; 162:3757-3760.

Ashburner, M. und J. J. Bonner. 1979. The induction of gene activity in Drosophila by heat

shock. *Cell*; 17:241-254.

Bertorelli, G.; Bocchino, V.; Zhuo, X. et al. 1998. Heat shock protein 70 upregulation is related to HLA-DR expression in bronchial asthma. *Clin. Exp. Allergy*;28:551-560.

van Bogelen, R. A. und F. C. Neidhardt. 1990. Ribosomes as sensors of heat and cold shock in *E.coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*; 87:5589-5593.

Botzler, C.; Li, G.; Issels, R.D.; Multhoff, G. 1998. Definition of extracellular localized epitopes of HSP 70 involved in an NK immune response. *Cell. Stress. Chaperones*.;3:6-11.

Bromuro, C.; La Valle, R.; Sandini, S. et al. 1998. A 70-kilodalton recombinant heat shock protein of *Candida albicans* is highly immunogenic and enhances systemic murine candidiasis. *Infect. Immun.*;66:2154-2162.

Bukow, B. et.al. 2000: Getting newly synthesized proteins into shape. *Cell* 101, 119-122.

Bukow, B. and A.L. Horwich, 1998: The Hsp70 and the Hsp60 chaperone machines. *Cell*, 92, 351-366.

Delogu, G.; Lo Bosco, L.; Marandola, M. et al. 1997. Heat shock protein (HSP 70) expression in septic patients. *J. Crit. Care*.;12:188-192.

Deuerling, E. et al. 1999. Trigger-factor and DnaK cooperate in folding of newly synthesized proteins. *Nature* 400, 693-696.

Duquesnoy, R.J.; Liu, K. et al. 1999. Evidence for heat-shock protein immunity in a rat cardiac allograft model of chronic rejection. *Transplantation*; 67:156-164.

Edenhofer, F.; Rieger, R.; Famulok, M. et al. 1996. Prion protein PrP^C interacts with molecular chaperones of the HSP60 family. *J. Virol.*; 70:4724-4728.

Ellis, R. J. und S. M. van der Vries. 1991. Molecular Chaperones. *Ann. Revi. Biochem.*; 60:321-347.

Georgellis, D.; Sohlberg, B.; Hartl, F.U.; von Gabain, A.; 1995. Identification of GroEL as a constituent of an mRNA-protection complex in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.*; 16:1259-1268.

Glover, J.R. and S. Lindquist, 1998: A novel chaperone system that rescues previously aggregated proteins, *Cell*, 94, 73-82

Hwang, D. J.; Tumer, N. E. und T. M. Wilson. 1998. Chaperone protein GrpE and the GroEL/GroES complex promote the correct folding of tobacco mosaic virus coat protein for ribonucleocapsid assembly in vivo. *Arch. Virol.*; 143:2203-2214.

Kwak, H.J.; Jun, C.D.; Pae, H.O. et al. 1998. The role of inducible 70-kDa heat shock protein in cell cycle control, differentiation, and apoptotic cell death of the human leukemic HL-60 cells. *Cell. Immunol.*;187:1-12.

Langer, T. et al. 1992. Successive action of DnaK, DnaJ and GroEL along the pathway of chaperone-mediated protein folding. *Nature*. 356:683-689.

- Mayer, M. P., Rüdiger, S. and B. Bukau, 2000: Molecular basis for interactions of the DnaK chaperone with substrates, *Biol. Chem.* 381, 877-885
- Mendez-Samperio, P.; Badillo-Flores, A.; Nunez-Vazquez, A. et al. 1997. Interleukin-4 inhibits secretion of interleukin-1 beta in the response of human cells to mycobacterial heat shock proteins. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*; 4:665-670
- Menoret, A.; Chandawarkar, R. 1998. Heat-shock protein-based anticancer immunotherapy: An idea whose time has come. *Semin. Oncol.*; 25:654-660.
- Mogk, A., Mayer, M.P., Deuerling, E., 2001, Molekulare Chaperone und ihr biotechnologisches Potential, *Biologie in unserer Zeit*, 31. Jahrgang, Nr. 3, 182-192
- Moreau, N.; Prudhomme, C. und N. Angelier. 1998. Cell-cycle dependent nuclear translocation of HSP 70 in amphibian embryonic cells. *Int. J. Dev. Biol.*; 42:633-636.
- Morimoto, R. I.; Tissieres, A. und C. Georgopoulos. 1990. Stress proteins in biology and medicine. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Morton, H. 1998. Early pregnancy factor: An extracellular Chaperon 10 homologue. *Immunol. Cell. Biol.*; 76:483-496.
- Moseley, P.L. 1998. Heat shock proteins and the inflammatory response. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*; 856:206-213.
- Schiene, C., Fischer G. 2000. Enzymes that catalyse the restructuring of proteins. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 10, 40-45
- Schumann, W. 1997. Die molekulare Antwort auf Stress. *Mannheimer Forum* 1996/97. 56-104.
- Stevens, M.G.; Olsen, S.C.; Pugh, G.W.; Mayfield, J.E. 1997. Role of immune response to a GroEL heat shock protein in preventing brucellosis in mice vaccinated with *Brucella abortus* strain RB51. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.*; 20:147-153.
- Tabona, P.; Reddi, K.; Khan, S. et al. 1998. Homogeneous *Escherichia coli* Chaperon 60 induces IL-1 beta and IL-6 gene expression in human monocytes by a mechanism independent of protein conformation. *J. Immunol.*; 161:1414-1421.
- Tatzelt, J.; Voellmy, R. und W.J. Welch. 1998. Abnormalities in stress proteins in prion diseases. *Cell. Mol. Neurobiol.*; 18:721-729.
- Vandenbroeck, K. und A. Billiau. 1998. Interferon-gamma is a target for binding and folding by both *Escherichia coli* chaperone model systems GroEL/GroES and DnaK/DnaJ/GrpE. *Biochimie*; 80:729-737.
- Voellmy, R. 1996. Review of patents in the cell stress and chaperone field. *Cell Stress Chaperones*. 1: 29-32.
- W. J. Welch. 1992. Mammalian stress response: Cell physiology, Structure/function of stress proteins, and implications for medicine and disease. *Physiological Reviews*. 72:1063-1081.
- W. J. Welch. 1993. Stress Proteine. *Spektrum der Wissenschaft*. 40-47.
-

