

Institut für Medizinische Mikrobiologie, Immunologie und Hygiene der
Technischen Universität München
Klinikum rechts der Isar
(Direktor: Univ.-Prof. Dr. Dr. h.c. H. Wagner, Ph.D. (Melbourne))

**TOLL-LIKE REZEPTOR-ABHÄNGIGE
STIMULATION DES IMMUNSYSTEMS DURCH
HSP60 VON CHLAMYDIA PNEUMONIAE
IN VIVO**

NINA WANTIA

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines Doktors der Medizin genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. D. Neumeier

Prüfer der Dissertation:

1. apl. Prof. Dr. Th. Chr. Miethke
2. Univ.-Prof. Dr. D. Busch

Die Dissertation wurde am 03.04.2006 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 14.06.2006 angenommen.

FÜR MEINE FAMILIE

ERKLÄRUNG

Hiermit versichere ich, die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe angefertigt zu haben. Die verwendete Literatur und sonstige Hilfsmittel sind vollständig angegeben.

München, März 2006

INHALTSVERZEICHNIS

ABBILDUNGSVERZEICHNIS	1
1 EINLEITUNG	5
1.1 Das angeborene Immunsystem des Menschen	5
1.2 Toll-like Rezeptoren	6
1.3 Atherosklerose	11
1.4 Chlamydiale Infektion und Atherosklerose	12
1.5 Chlamydiales HSP60	14
1.6 Ziel der Arbeit	17
2 MATERIAL	18
2.1 Geräte	18
2.2 Chemikalien	19
2.3 Zellmedien	20
2.4 Lösungen und Puffer	21
2.5 SDS Gele	23
2.6 Mäuse	23
2.7 Antikörper	24
2.8 Sonstige Materialien	25
3 METHODEN	26
3.1 HSP60 Aufreinigung	26
3.2 Weitere Aufreinigung von HSP60 über die Polymyxin B-Säule	28
3.3 Proteinbestimmung mit der Bradford-Methode	28

3.4	Immunisieren von Mäusen	29
3.5	Hybridomfusion	29
3.6	Western Blot	32
3.7	Isotypisieren der Antikörper	33
3.8	Antikörperaufreinigung durch Affinitätschromatographie	33
3.9	ELISA	34
3.10	Zellgewinnung aus Knochenmark	35
3.11	Peritoneallavage bei Mäusen	35
3.12	Durchflußzytometrie - FACS	36
3.13	Intrazelluläre Färbung	36
3.14	Giemsafärbung	37
4	ERGEBNISSE	38
4.1	Chlamydiales HSP60 induziert <i>in vivo</i> das CXC-Chemokin KC, aber kein TNF	38
4.2	Chlamydiales HSP60 induziert eine Einwanderung von PMN in Peritonealhöhle und Blut	41
4.3	Chlamydiales HSP60 wird durch TLR2 und TLR4 <i>in vivo</i> erkannt	42
4.4	HSP60-induzierte Veränderungen <i>in vivo</i> sind MyD88-abhängig	44
4.5	Herstellung eines Antikörpers gegen chlamydiales HSP60	46
5	DISKUSSION	49
5.1	Chlamydiales HSP60 als PAMP	49
5.2	Chlamydiales HSP60 induziert KC und eine Einwanderung von PMN in die Bauchhöhle	50
5.3	Erkennung von HSP60 durch Toll-like Rezeptoren und MyD88	52
5.4	Antikörper gegen HSP60	54
6	ZUSAMMENFASSUNG	55
7	SUMMARY	56
	LITERATURVERZEICHNIS	57

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

1.1	Übersicht über die Toll-like Rezeptoren	8
1.2	Der Entwicklungszyklus der Chlamydien	13
4.1	Induktion von Zytokinen durch HSP60	39
4.2	Dosisabhängige Zytokininduktion	40
4.3	Intrazelluläre Färbung auf Zytokine	40
4.4	Polymyxin B aufgereinigtes HSP60 <i>in vitro</i>	41
4.5	Polymyxin B aufgereinigtes HSP60 <i>in vivo</i>	43
4.6	Vergleich mit anderen PAMP	43
4.7	TLR-Abhängigkeit <i>in vivo</i>	44
4.8	TLR-Abhängigkeit nach Aufreinigung	45
4.9	Serumtest nach Immunisierung	46
4.10	Hybridomtestung	47
4.11	Western Blot mit Hybridomüberständen	47
4.12	Neutralisationstest von Hybridomüberständen	48

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Abb.	Abbildung
AG8	Myelomzelllinie
APC	Antigen Presenting Cell
APS	Ammoniumpersulfat
BCA	Biocinchonic Acid
BSA	Bovine Serum Albumine (engl.) = Rinderserumalbumin
CD	Cluster of Differentiation
CD ₄₀ -L	CD ₄₀ -Ligand
CpG	DNA Motiv mit wiederkehrenden CG Sequenzen
CM	Complete Medium
CMV	Cytomegalievirus
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleid Acid (engl.) = Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
E.coli	Escherichia coli (gram-negatives Bakterium)
EDTA	Ethylen Diamin Tetraacetat
ELISA	Enzyme Linked Immuno Sorbant Assay
ERK	Extracellular Signal-Regulated Protein Kinase
ESL-1	E-Selectin Ligand 1
EtOH	Ethanol
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorting
FCS	Fetal Calf Serum
FITC	Fluorescein Iso-Thio-Cyanat
FPLC	Fast Protein, Peptide and Polynucleotide Liquid Chromatography
g	Gramm
GM-CSF	Granulocyte Monocyte-Colony Stimulating Factor
HAT	Hypoxanthin-Aminopterin-Thymidin-Medium
HFCS	Hybridoma Fusion and Cloning Supplement
HGPRT	Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase
HRP	Horseradish Peroxidase
HSP60	Heat Shock Protein 60
ICAM	Intercellular Adhesion Molecule

IFN	Interferon
IgG	Immunglobulin G
IL	Interleukin
i.p.	intraperitoneal
IPTG	Isopropyl-1-thio- β -D-galactosid
IRAK	IL-1-Rezeptor assoziierte Kinasen
IRF-3	Interferon Regulatory Factor-3
i.v.	intravenös
JNK	cJun N-terminal kinase
kDa	Kilodalton
LB-Medium	Luria Broth, Bakterienmedium
LDL	Lipoprotein of Low Density
LBP	LPS-Binding Protein
LGB	Lower Gel Buffer
LPS	Lipopolysaccharide
M	Molarität [g/mol]
MAPK	Mitogen Activated Protein Kinase
Mac-1	;Macrophage Receptor-1
MACS	Magnetic Cell Sorting
mAK	monoklonaler Antikörper
M-CSF	Macrophage Colony Stimulating Factor
ME	β -Mercaptoethanol
MHC	Major Histocompatibility Complex
min	Minute
MOMP	Major Outer Membrane Protein
MyD88	Myeloid Differentiation Factor 88
NaCl	Natriumchlorid
NF κ B	Nuclear Factor κ B
NO	Stickstoffmonoxid
OD_{450}	optische Dichte bei 450nm
PAGE	Polyacrylamid Gelelektrophorese
PBS	Phosphate Buffered Saline (engl.) = Phosphat-gepufferte Salzlösung
PE	Phycoerythrin

PEG	Polyethylenglykol
PMB	Polymyxin B
PMN	Polymorphonuclear Neutrophils (engl.) = neutrophile Granulozyten
P/S	Penicillin/Streptomycin
PSGL-1	P-Selectin Glykoprotein Ligand-1
rpm	revolutions per minute (engl.) = Drehzahl 1/min
RPMI	Roswell Park Memorial Institute, Zellmedium
RT	Raumtemperatur
SDS	Sodium Deodecyl Sulfat
SIGIRR	Single Ig IL-1R-related Molecule
SOCS	Suppressor of Cytokine Signaling
TAK1	Transforming Growth Factor Beta Activated Kinase
TBS	Tris-buffered saline (engl.) = Tris gepufferte Salzlösung
TCR	T Cell Receptor (engl.) = T-Zell Rezeptor
TEMED	N,N,N,N,-Tetremethyl-ethylendiamin
TIR	Toll-IL-1-Rezeptor
TIRAP	TIR domain-containing adapter protein
TLR	Toll-like receptor (engl.)=Toll ähnlicher Rezeptor
TNF	Tumor Nekrose Faktor
TNFR	Tumor Nekrose Factor Receptor
TRAF-6	TNF-Rezeptor assoziierter Faktor-6
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
UGB	Upper Gel Buffer
VCAM	Vascular Cell Adhesion Molecule
VLA-4	Very Late Antigen-4

EINLEITUNG

1.1 DAS ANGEBORENE IMMUNSYSTEM DES MENSCHEN

Die Wichtigkeit des menschlichen Immunsystems steht evolutionsgeschichtlich gesehen außer Frage. Eine entscheidende Komponente ist die Fähigkeit, eigene Strukturen und Proteine von fremden zu unterscheiden. Nur durch diese Fähigkeit des Immunsystems kann sichergestellt werden, dass eine Bekämpfung von eigenen Strukturen und Proteinen verhindert wird, fremde Organismen jedoch schnell und effektiv bekämpft werden. Das Immunsystem des Menschen besteht aus zwei Teilen, dem angeborenen Immunsystem und dem erworbenen Immunsystem. Das angeborene Immunsystem erkennt als erstes eine potentielle Infektion und kann dann das erworbene Immunsystem aktivieren. Während für eine erworbene Immunität gegen bestimmte Pathogene ein vorheriger Kontakt mit diesem oder seinen Antigenen erfolgt sein muss, kann der Körper sich mit dem angeborenen Immunsystem auch ohne vorherigen Kontakt gegen Pathogene wehren. Wichtig ist hier vor allem die Aktivität der Zellen, die zu diesem System gehören; Makrophagen, dendritische Zellen, Granulozyten und NK-Zellen spielen eine wichtige Rolle als diejenigen Zellen, die durch Zytokinproduktion andere Zellen anlocken, die den T-Zellen Antigene präsentieren und die tote oder infizierte Zellen phagozytieren können. Erst durch die Aktivierung des angeborenen Immunsystems wird eine lokale Kontrolle der Infektion und eine Aktivierung des erworbenen Immunsystems möglich, so dass nur so eine effektive und schnelle Immunantwort stattfinden kann. Da die Zellen des angeborenen Immunsystems keine spezifischen Antigenrezeptoren haben, muss eine Erkennung von ›selbst‹ und ›fremd‹ über andere Strukturen erfolgen. Hier war die Entdeckung der Funktion der Toll-like Rezeptoren von sehr wichtiger Bedeutung.

1.2 TOLL-LIKE REZEPTOREN

Historisch gesehen kommt der Begriff Toll-like Receptor (TLR) von dem Toll Receptor der Fruchtfliege (*Drosophila melanogaster*). Dieser Toll Receptor reguliert die embryonale Entwicklung der Fliege. Solche Fliegen, die diesen Receptor nicht besitzen, zeigen sich jedoch auch anfälliger für Pilzinfektionen als normale Fliegen. Es konnte gezeigt werden, dass bei diesen Fliegen, die nur ein angeborenes Immunsystem haben, die Toll Rezeptoren wichtig für die Kontrolle der Pilzinfektion sind (35).

Schließlich wurden ähnliche Rezeptoren auch bei Säugetieren entdeckt, die deswegen Toll-like Rezeptoren genannt wurden. Durch diese recht gut im Laufe der Evolution konservierten Rezeptoren erkennen Makrophagen und andere Zellen des angeborenen Immunsystems Pathogene wie Bakterien oder Viren, ohne dass vorher ein Kontakt mit diesen Pathogenen notwendig gewesen ist. Diese Rezeptoren erkennen z.B. Bakterien an Endotoxin oder einer Häufung von CpG Motiven in der DNA (41). Diese verschiedenen strukturellen Komponenten aktivieren verschiedene Toll-like Rezeptoren, die dann eine Immunantwort induzieren. Mittlerweile sind über zehn verschiedene Toll-like Rezeptoren bekannt, die jeweils verschiedene, meist mikrobielle Substanzen erkennen. Die Moleküle, die über einen TLR erkannt werden, werden allgemein als PAMP (Pathogen Associated Molecular Pattern) bezeichnet. Die Toll-like Rezeptoren können somit ›fremde‹ nicht-eigene Moleküle entdecken, da die PAMP spezifisch für Erreger sind und nicht im Wirtsorganismus vorkommen. Somit wird eine Aktivierung durch eigene Strukturen verhindert. Eine Immunantwort gegen endogene Liganden könnte natürlich auch gefährlich für den Wirtsorganismus sein, da es dann gegen wirtseigene Strukturen oder Zellen vorgeht. Dennoch sind in letzter Zeit einige möglicherweise endogene Aktivatoren der TLR gefunden worden. Zu ihnen zählen die Hitzeschockproteine HSP60, HSP70 und HSP96, aber auch β -defensin und Oligosaccharide, die aus extrazellulärer Matrix entstehen. Hitzeschockproteine könnten TLR aktivieren, nachdem sie aus nekrotischen Zellen freigesetzt wurden. Es wird spekuliert, ob diese endogenen Stimulatoren dann auch Gene aktivieren, die für die Reparatur beschädigter Gewebe verantwortlich sind (37).

MYELOID DIFFERENTIATION FACTOR 88 (MYD88)

Der MyD88-abhängige Signalweg ist wichtig für die Produktion von inflammatorischen Zytokinen wie IL-1 β , TNF und IL-6. In einer Infektion spielt das Vorhandensein von MyD88 eine große Rolle. Bei Infektionen mit grampositiven Erregern, die hauptsächlich über TLR $_2$, 6 und 9 die Immunantwort aktivieren, zeigten MyD88 knock-out Mäuse eine geringere Resistenz gegenüber diesen Erregern. MyD88 spielt *in vivo* eine entscheidende Rolle bei der Bekämpfung von *Staphylococcus aureus* und *Listeria monocytogenes* (61)(65).

TOLL-LIKE REZEPTOR 2 (TLR $_2$)

TLR $_2$ signalisiert als Heterodimer zusammen mit TLR $_1$ oder TLR $_6$ und erkennt verschiedene Moleküle aus gram-negativen und gram-positiven Bakterien, Pilzen, Spirochäten und Mykobakterien. TLR $_2$ reagiert auf viele verschiedenen Moleküle, wie zum Beispiel Peptidoglykane, Lipoteichonsäure, Mannuronsäure, auf manche LPS-Arten oder auf das Hämagglutinin des Masernvirus. Für manche dieser Antworten braucht TLR $_2$ die Unterstützung von CD14. Man nimmt an, dass es hier zu einer direkten Interaktion von Molekülen und Rezeptor kommt, dies konnte man bei Peptidoglykanen zeigen (21). TLR $_2$ -defiziente Mäuse sind bei manchen Infektionen, zum Beispiel mit *S. aureus* oder *Streptococcus pneumoniae*, weniger resistent. Bei Borreliosen haben TLR $_2$ -defiziente Mäuse höhere Bakterienmengen, obwohl sie eine normale Antikörperbildung haben. Das könnte heißen, dass an der Erkennung von Borrelien noch andere TLR beteiligt sind (72). Auch bei Menschen suchte man nach TLR $_2$ und dessen Funktion. Man fand einen Genpolymorphismus im TLR $_2$ Gen, das in einem Teil von Patienten, die an Lepra litten, nachweisbar war, während dies in der gesunden Kontrollgruppe nicht vorhanden war (24). Somit ist ein funktionierender TLR $_2$ wichtig für eine gute Immunantwort auch beim Menschen.

TOLL-LIKE REZEPTOR 4 (TLR $_4$)

Ein wichtiger Durchbruch war die Entdeckung, dass Mäuse, die einem Endotoxinschock gegenüber resistent waren, natürliche Mutationen in ihrem TLR $_4$ aufwiesen (54). Da TLR $_4$ als natürliche Mutation bei Mäusen vorkommt, wurden diese genauer untersucht. Es hat sich gezeigt, dass diese Mäuse auf Endotoxine wie LPS nicht reagieren konnten, auf die normalerweise das angeborene Immunsystem

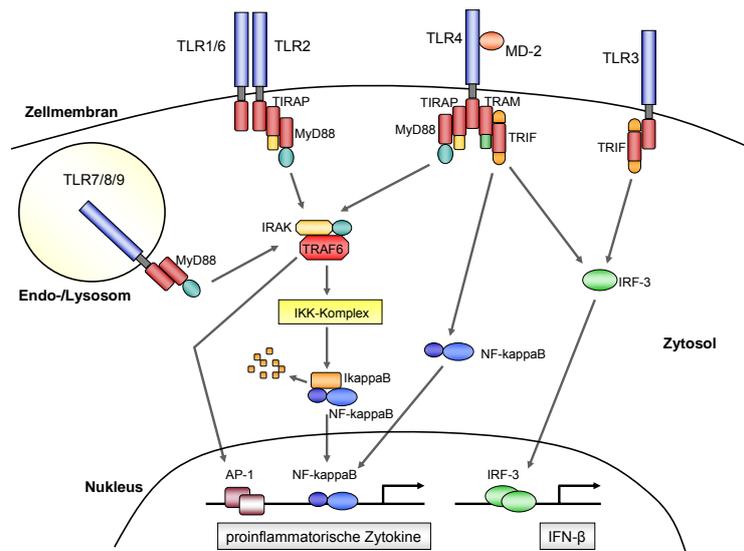


Abbildung 1.1. Übersicht über die Toll-like Rezeptoren

reagiert. TLR₄ spielt eine wichtige Rolle in der Immunantwort auf eine große Anzahl von Molekülen wie LPS, bakterielles HSP60, Teichonsäure, Pneumolysin von *S. pneumoniae* oder auch ein Hüllenprotein vom *Respiratory Syncytial Virus* (RSV) (64). TLR₄-defiziente Mäuse sezernieren weniger proinflammatorische Zytokine und sind anfälliger für Erkrankungen mit Salmonellen (3) oder *Haemophilus influenzae* (71). Bisher konnte man keine Ähnlichkeiten in der Struktur der Moleküle, die über den TLR₄ Signalweg gehen, ausmachen. Möglicherweise gibt es spezielle extrazelluläre Rezeptoranteile, die an verschiedene Agonisten binden, dies konnte allerdings bisher noch nicht gezeigt werden. Von TLR₄ wurden auch bei Menschen viele Polymorphismen entdeckt, von denen ein bekannterer mit einem erhöhten Risiko für einen septischen Schock (39) und einem erniedrigten Risiko für Atherosklerose (26) behaftet ist.

Viele Agonisten für Toll-like Rezeptoren sind nicht unbedingt auf der Zelloberfläche zu finden, wie z.B. doppelsträngige RNA, die an TLR₃ bindet (2). Möglicherweise muss hier zunächst Phagozytose und intrazelluläres Prozessieren stattfinden, damit die Agonisten an ihren TLR binden können. Bekannt ist, dass Heterodimere aus TLR₂ und TLR₆ sich in der Membran der Phagolysosomen verbinden (53). Auch TLR₉, der bakterielle DNA mit CpG Motiven erkennt, erkennt diese nicht an

der Zelloberfläche (1). Jedoch erklären auch die verschiedenen Adaptermoleküle nicht vollständig, warum die Signale, die eine TLR Aktivierung auslösen, so unterschiedlich sein können. Bei der Aktivierung von neutrophilen Granulozyten wird dies bei TLR₂ und TLR₄ deutlich. I. Sabroe et al. haben gezeigt, dass sowohl TLR₂ und TLR₄ für eine Aktivierung von neutrophilen Granulozyten nötig sind. Sie verändern die Expression von Adhäsionsfaktoren und induzieren die Bildung von IL-8. Aber vor allem TLR₄ sendet ein anti-apoptisches Signal, so dass eine Aktivierung von TLR₄ und die Anwesenheit von Monozyten für ein verlängertes Überleben der Granulozyten benötigt wird (59).

Die verschiedenen Immunantworten, die TLR auslösen können, werden zur Beseitigung der unterschiedlichen Mikroorganismen genutzt. Die Beseitigung von intrazellulären Mykobakterien erfordert z.B. eine erhöhte NO-Synthese, die TLR-abhängig aktiviert wird. Die Beseitigung von Viren dagegen benötigt IFN- β , das ebenfalls TLR abhängig über IRF-3 aktiviert wird.

SIGNALWEG

Der TLR Signalweg ist eine sehr wichtige Kaskade in der Reaktion des angeborenen Immunsystems auf mikrobielle Substanzen. Innerhalb der Zelle schreitet der Signalweg über viele andere Signalproteine weiter fort. In humanen Zellen wurde entdeckt, dass ein konstant exprimierter und aktivierter TLR über eine Aktivierung von NF- κ B die angeborene Immunantwort aktiviert (42). Bakterien wie *S. pneumoniae* werden gleich durch mehrere TLR erkannt. Sie aktivieren TLR₄ über Pneumolysin und gleichzeitig den Heterodimer aus TLR₂/TLR₆ über Peptidoglykane und Lipoteichonsäuren sowie TLR₉ über ihre DNA. TLR haben einen gemeinsamen Signalweg über die Toll-IL-1-Rezeptor (TIR) Domäne, dies resultiert schließlich in der Aktivierung von NF- κ B. Die Adaptermoleküle Myeloid Differentiation Factor 88 (MyD88) und TIRAP formieren einen Signalkomplex mit den TLR, wobei auch IL-1-R-assoziierte Kinasen (IRAK) und TNFR-assoziiertes Faktor 6 (TRAF6) eine Rolle spielen (22). Wenn dieser frühe Signalkomplex dissoziiert, kommt es zur Interaktion mit Proteinen, wie MAP3K und TAK1, dies spielt wieder eine Rolle in der IKK-Aktivierung und aktiviert die MAPK Signalkaskade (34). Der aktivierte IKK-Komplex aktiviert nun den NF- κ B Signalweg (11). Dieser Signalweg kann allerdings auch anders ablaufen. So kann TLR₄ auch MyD88-unabhängig eine Aktivierung von Interferon regulatory factor 3 (IRF-3) veranlassen, dies endet dann in der Ausschüt-

tung von Typ-1 Interferonen (68). Auch eine TLR₃- und TLR₉-Aktivierung kann zur Freisetzung von IFN- β führen. Das Interferon kann wiederum auf eine autokrine Weise von Interferon abhängige Signalwege aktivieren. TLR₄ ist auch nicht der einzige Rezeptor, der für die LPS Erkennung wichtig ist. LPS bindet an LBP (LPS-binding protein), und dieser Komplex wird dann von CD₁₄ erkannt. Hierdurch kommt es zu einer Annäherung von TLR₄ und CD₁₄, in der Zelle assoziiert MD-2 dann mit TLR₄. MD-2 scheint wichtig für den Transport von TLR₄ zur Zelloberfläche zu sein (49). Auch der Scavenger Receptor A ist in die Signalübertragung von LPS involviert. Die Abbildung 1.1 zeigt einen Überblick über die verschiedenen TLR mit ihren Liganden und den Signalwegen innerhalb der Zelle (33).

Eine Aktivierung der TLR kann auf verschiedene Weise beendet werden. Es gibt lösliche Formen von TLRs, die sogenannten sTLR, die TLR Signale blockieren können. sTLR₂ und sTLR₄, also die Antagonisten von TLR₂ und TLR₄ sind bereits bekannt. sTLR₄ scheint die Interaktion von TLR₄ und MD₂ zu verhindern, die genaue Funktion von sTLR₂ ist bisher nicht bekannt. Auch intrazellulär gibt es Faktoren, die eine TLR Aktivierung beenden können, z.B. MyD88s, das durch seinen Antagonismus zu MyD88 die IL-1- und LPS-abhängige, aber nicht die TNF-abhängige Aktivierung von NF- κ B stoppt. Auch bei den Mitgliedern der IRAK-Familie, also Adapterproteinen, die durch MyD88 aktiviert werden, gibt es Moleküle, die diese Aktivierung verhindern oder stoppen. Sie heißen IRAKM, IRAK_{2c} und IRAK_{2d}. Während IRAKM-defiziente Zellen oder Mäuse durch viel höhere Entzündungsmarker auffielen, sah man bei Zellen, die IRAK_{2c} oder IRAK_{2d} überexprimiert hatten, eine verringerte Aktivierung von NF- κ B nach Stimulation mit LPS. Bei Stimulation von TLR₄ und TLR₉ durch LPS beziehungsweise CpG DNA, kann SOCS₁ eine Aktivierung verhindern; ob dies auch für andere TLRs gilt, ist bisher unklar. Neben diesen Molekülen, die im Inneren der Zelle agieren, gibt es auch membrangebundene Strukturen, wie z.B. ST₂ und SIGIRR, die den Signalweg schon direkt am oder nach dem Toll-like Rezeptor stören. Auch die TLR Expression selbst kann durch anti-entzündliche Zytokine wie TGF- β und IL-1 α reduziert werden. Dies könnte auch bei der Toleranz von Normalflora eine Rolle spielen, da gezeigt wurde, dass Darmepithelien wesentlich geringere Level an TLR₂ und einen fast völligen Mangel an MD₂ zeigen. Zusammengefasst gibt es also auf verschiedenen Wegen der Signalkette die Möglichkeit, eine TLR Aktivierung zu minimieren oder ganz zu verhindern. Bei den meisten Molekülen kennt man die genaue Regulation in der Infektion noch nicht (38).

Das Vaccinia Virus zum Beispiel kodiert für ein Protein, das die NF- κ B Aktivierung verhindert, indem es die Interaktion von IRAK und TRAF 6 behindert (17). Auch Yersinien können eine Protease, YopJ, sezernieren, die den TLR-aktivierten anti-apoptotischen Signalweg stoppt, aber nicht ebenfalls aktivierte pro-apoptotische Signale (77). Auch Mykobakterien können eine TLR-abhängige Aktivierung von dendritischen Zellen verhindern, indem sie Lipoarabinomannan an die DC binden lassen (10).

1.3 ATHEROSKLEROSE

Herz- und Kreislauferkrankungen sind die häufigste Todesursache in Deutschland, jedes Jahr sterben daran in Deutschland etwa 400.000 Frauen und Männer daran (Quelle: Statistisches Bundesamt 1999). Atherosklerose ist die häufigste Ursache für diese Erkrankungen. Dabei handelt es sich um eine Erkrankung der Arterien, die zu zunehmender Verengung und Versteifung der Gefäße führt und so Herzinfarkte, Schlaganfälle und andere Durchblutungsstörungen verursacht. Es wird angenommen, dass es sich bei der Pathogenese der Atherosklerose um eine Reaktion des menschlichen Körpers auf chronische fibroproliferative und entzündliche Reize handelt. Diese Reaktion führt dann zu einem Schaden der Subendothelialschicht der Arterie.

Zu Anfang der Entwicklung der Atherosklerose kann man eine Aktivierung des Endothels beobachten, die durch viele Risikofaktoren wie Rauchen, Hyperglykämie oder Hyperlipidämie begünstigt wird. Dadurch wird das angeborene Immunsystem aktiviert, und Monozyten und Makrophagen wandern in das Endothel und die Intima des Gefäßes ein. Diese Prozesse werden durch Adhäsionsmoleküle wie Mac-1, VLA-4, ESL-1 und PSGL-1 unterstützt, die dann an die entsprechenden Rezeptoren der Endothelzellen, wie ICAM-1 und VCAM-1, binden (19). Hierdurch ist ein Eindringen der Makrophagen in das Endothel möglich. Andere Rezeptoren sind für das Durchwandern des Endothels bis zur Intima verantwortlich. Hier nehmen die Makrophagen oxidiertes Lipoprotein geringer Dichte (LDL) auf und werden zu Schaumzellen. Diese Zellen kennzeichnen das frühe Stadium der Atherosklerose. Sie sezernieren Zytokine, die wiederum die Adhäsionsmoleküle in den Endothelzellen hoch regulieren und somit den Einwanderungsprozess weiter unterstützen. Um den Entzündungsvorgang zu beenden, wandern schließlich glatte Muskelzellen ein, die dann in der Intima proliferieren und Kollagene und Proteoglykane sezernieren

und eine fibröse Matrix formen. Der reife atheromatöse Plaque besteht nun aus einer Schicht aus glatten Muskelzellen in einer fibrösen Matrix mit einem lipidreichen Kern, der aus toten Schaumzellen gebildet wird. Durch diese Prozesse werden die Gefäße versteift und eingeengt, und es kann zu Minderdurchblutungen von Gewebe kommen. Ein tödliches Ereignis, wie z.B. ein Schlaganfall, kann durch die Ruptur eines solchen Plaques ausgelöst werden, oder durch einen Thrombus, der sich an der Plaquestelle bildet (58).

Viele Risikofaktoren, wie Rauchen und Hyperlipidämie, aber auch genetische Faktoren, sind mittlerweile bekannt. Die etablierten Risikofaktoren erklären jedoch nicht alle Fälle von Atherosklerose, so dass ein infektiöses Geschehen kausal wichtig sein könnte. Eine Reihe von Viren und Bakterien wurde verdächtigt, initial an der Entstehung der Atherosklerose beteiligt zu sein. Herpes Simplex Virus, Cytomegalovirus, Hepatitis A und Influenza sowie Bakterien wie *Helicobacter pylori*, *Poryphromonas gingivalis* oder Mykoplasmenarten und eben auch *Chlamydia pneumoniae* sind in diesem Zusammenhang untersucht worden (50). Ein Mikroorganismus, der eine Rolle bei der Entstehung der Atherosklerose spielt, sollte innerhalb der Bevölkerung weit verbreitet sein, da Atherosklerose eine sehr häufige Erkrankung ist.

1.4 CHLAMYDIALE INFektion UND ATHEROSKLEROSE

Chlamydien sind gram-negative, obligat intrazelluläre Bakterien. Der Begriff stammt von dem griechischen Wort chlamys ab, welches Mantel bedeutet; das Bakterium wurde zuerst 1907 von Prowazek in konjunktivalen Epithelzellen entdeckt. *Chlamydia trachomatis* und *Chlamydia pneumoniae* sind humanpathogene Bakterien. *C. trachomatis* verursacht Augen- und Genitalinfektionen, während *C. pneumoniae* Erkrankungen der Atemwege verursacht und für etwa 10% der Pneumonie- und für 5% der Bronchitis- und Sinusitisfälle verantwortlich ist. *Chlamydia psittaci* und *Chlamydia pecorum* verursachen Erkrankungen bei Vögeln und einigen Säugetieren, aber auch Menschen können bei engem Kontakt zu Vögeln an einer Lungenentzündung, verursacht durch *C. psittaci*, erkranken (46)(31)(14)(13)(16).

Chlamydien haben einen Entwicklungszyklus, in dem es zwei verschiedene morphologische Formen gibt, und zwar das Elementarkörperchen und das Retikularkörperchen. Die extrazelluläre Form (Elementarkörperchen) ist ein kugelförmiges Bakterium von 0,25-0,3µm Durchmesser, das von einer dreischichtigen Zellwand umgeben ist. Das Elementarkörperchen ist die infektiöse Form der Chlamydien. Bei der

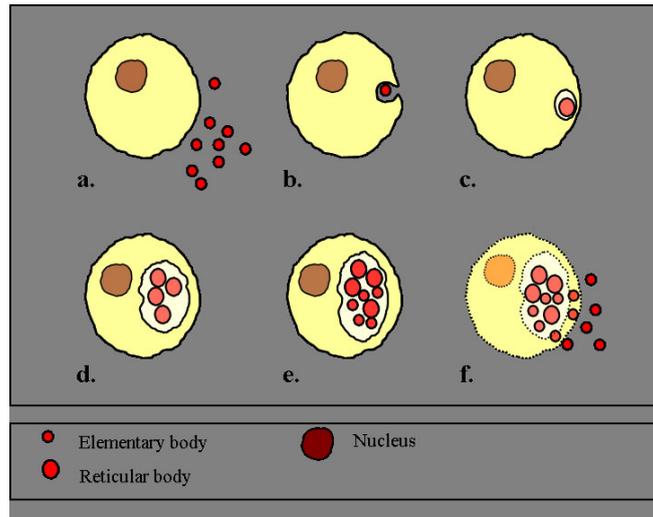


Abbildung 1.2. Der Entwicklungszyklus dauert bei *Chlamydia pneumoniae* etwa 72 Stunden. a-c: Das Elementarkörperchen dringt in die Zelle ein. d-e: Ein Retikularkörperchen wird gebildet, die Vermehrung beginnt. f: Die Zelle rupturiert und Elementarkörperchen werden frei. (Elementary body = Elementarkörperchen, Reticular body = Retikularkörperchen, Nucleus = Zellkern, Abbildung nach Hahn (16))

intrazellulären Form handelt es sich um das Retikularkörperchen, der Durchmesser beträgt etwa $1\mu\text{m}$, und es ist nicht infektiös. Das Elementarkörperchen wird wahrscheinlich durch rezeptorabhängige Endozytose in die Zelle aufgenommen (47). Wahrscheinlich spielt hierbei das chlamydiale Membranprotein MOMP eine Rolle (32). Etwa zwei Stunden nach der Infektion beginnen sich die Elementarkörperchen in Retikularkörperchen umzuwandeln, diese fangen circa zwölf Stunden nach erfolgter Infektion mit der Vermehrung an. Vermehren sich die Chlamydien, so bilden sie in einem Phagosom das Einschlusskörperchen. Es ist von einer Vakuolenmembran umgeben und häufig kernnah lokalisiert. Eine Fusion mit Lysosomen unterbleibt, dadurch kann sich die Chlamydie innerhalb des Einschlusses vermehren. Zuletzt werden aus den Retikularkörperchen wieder Elementarkörperchen, die dann durch Ruptur der infizierten Zelle freigesetzt werden und andere Zellen infizieren können. Der Vermehrungszyklus von *Chlamydia pneumoniae* dauert etwa 72 Stunden, Abbildung 1.2 zeigt den Entwicklungszyklus der Chlamydien. Wie dieser Zellzyklus reguliert wird, ist bisher noch unklar (16).

Die Durchseuchung mit *Chlamydia pneumoniae* in der westlichen Bevölkerung ist sehr hoch, fast jeder Mensch hat im Laufe seines Lebens damit Kontakt. Chlamydiale Infektionen wurden verdächtigt, den Prozess der Atherosklerose zu unterstützen. Patienten mit Atherosklerose zeigen häufig höhere Antikörperspiegel gegen chlamydiales HSP60 oder andere Proteine des Bakteriums als Gesunde (30). In einer Untersuchung von atheromatösen Aorten wurde histopathologisch in 40% der Fälle *Chlamydia pneumoniae* nachgewiesen, während in gesunden Gefäßen keine Chlamydien nachgewiesen werden konnten (62). Die Einschlusskörperchen wurden hier vor allem in Makrophagen oder Schaumzellen gefunden.

In den letzten Jahren haben sich viele Forschergruppen mit einer infektiösen Genese der Atherosklerose beschäftigt, da die atherosklerotischen Plaques selbst eine Anhäufung von Entzündungszellen und Entzündungsmediatoren aufwiesen. *In vitro*-Studien mit Endothelzellen zeigten nach Infektion eine Hochregulation von Adhäsionsmolekülen wie ICAM-1, VCAM-1, P-Selectin und E-Selektin. Dies könnte eine verstärkte Migration von Leukozyten in infizierte Gefäße begünstigen (25). Makrophagen, die in Anwesenheit von LDL mit *Chlamydia pneumoniae* infiziert wurden, zeigten eine Veränderung zur Schaumzelle, wie sie in Plaques vorkommt (23). Um den Zusammenhang zwischen Atherosklerose und chlamydialer Infektion zu zeigen, bediente man sich verschiedener Tiermodelle. In gendefizienten apoE^{-/-} Mäusen, die zu Hyperlipidämie und Atherosklerose neigen, konnte eine Infektion die Entwicklung von atheromatösen Plaques verstärken (45). In nicht genetisch veränderten Mäusen konnte *Chlamydia pneumoniae* nicht in den Gefäßwänden nachgewiesen werden (44), allerdings wurde das Bakterium in Atheromen, die durch lipidreiche Ernährung der Mäuse entstanden, gefunden (5). Diese Erkenntnisse unterstützten die Hypothese, dass *Chlamydia pneumoniae* ein ursächliches, Entzündungsprozesse auslösendes, Agens sein könnte. Falls man nun annimmt, dass dies der Fall ist, könnte man nun durch ein Abtöten der Erreger auch den Entzündungsprozess der Gefäße stoppen. Infektionen mit Chlamydien sind beim Menschen gut mit Antibiotika der Klasse der Makrolide zu behandeln, zu denen auch Azithromycin gehört. Dies wurde nun zunächst im Tierversuch getestet. Nach der Behandlung mit Azithromycin wurde die Entwicklung der Plaques, die zuvor durch diätetische Faktoren induziert worden waren, in mit *Chlamydia pneumoniae* infizierten Kaninchen gestoppt (48). In Mäusen dagegen konnte ein protektiver Effekt nicht nachgewiesen werden. Um die Antibiotikabehandlung bei Menschen mit Gefäßerkrankungen zu zeigen, wurden große prospektive Studien angelegt, von denen bisher keine zweifels-

frei einen protektiven Effekt der Therapie in Hinblick auf fortschreitende Erkrankung der Gefäße zeigen konnte (20). Zusammenfassend kann also zum heutigen Zeitpunkt ein kausaler Zusammenhang zwischen Atherosklerose und Infektion mit *Chlamydia pneumoniae* weder sicher bewiesen noch verworfen werden.

1.5 CHLAMYDIALES HSP60

Heat Shock Protein 60 ist ein über die Evolution hoch konserviertes Protein mit einer Größe von 60kDa, das sowohl in prokaryotischen als auch in eukaryotischen Zellen nachgewiesen werden konnte. HSP60 gehört zur Familie der Hitzeschockproteine, die diesen Namen erhielten, da sie in Bakterien nach Hitzebehandlung vermehrt nachweisbar sind. Sie gehören zu den Chaperonen, einer Familie von Proteinen, die eine wichtige Rolle bei der Proteinfaltung, beim Proteintransport und bei der Proteindegradation spielen. Unter Stressbedingungen können Hitzeschockproteine denaturierte Proteine aufnehmen und so vor Aggregation schützen. Im Zusammenhang mit Atherosklerose hat das chlamydiale HSP60 als möglicher Aktivator einer entzündlichen Reaktion eine besondere Bedeutung erlangt. Im Serum von Patienten, die an einer koronaren Herzerkrankung litten, jedoch auch im Serum von gesunden Kontrollgruppen, wurden Antikörper gegen chlamydiale HSP60 gefunden (60) (40). Dies könnte für das Vorliegen einer löslichen Form von HSP60 sprechen, die das angeborene Immunsystem aktiviert. Bei Patienten mit einer Stenose der A. carotis waren die HSP60 Mengen im Serum signifikant erhöht (73) (36). Auch in den atherosklerotischen Plaques wurden in Makrophagen sowohl humanes als auch chlamydiales HSP60 gefunden (29). Diese Entdeckungen lassen die Hypothese zu, dass eine Infektion der Gefäßendothelzellen mit *Chlamydia pneumoniae* zur lokalen Freisetzung von chlamydialem HSP60 und damit zu einer Entzündungsreaktion leitet und dies wiederum die Entstehung von Atherosklerose unterstützen könnte. Aufgrund dieser Erkenntnisse wurde die stimulatorische Aktivität von chlamydialem HSP60 zunächst *in vitro* untersucht. Bekannt ist, dass HSP60 von Bakterien und Säugetieren *in vitro* eine Vielzahl von verschiedenen Zelltypen, wie zum Beispiel Makrophagen, dendritische Zellen, glatte Muskelzellen und Endothelzellen stimuliert (6) (69) (27). Auch auf die Stimulationsfähigkeit von chlamydialem HSP60 gibt es bereits Hinweise. Aktivierte Makrophagen sezernieren, genau wie dendritische Zellen, nach Stimulation mit HSP60 proinflammatorische Zytokine wie TNF (7). Die dendritische Zellen erhöhen auch die Expression von Oberflächenmarkern

wie CD40, CD80 und CD86 (55), die für eine Aktivierung der Zellen stehen. Auch andere Zellen, wie Endothelzellen und glatte Muskelzellen exprimieren vermehrt Aktivitätsmarker wie E-selectin, ICAM-1 und VCAM-1 und sezernieren proinflammatorische Moleküle (56). Die Art der Erkennung des chlamydialen Proteins ist auch schon teilweise aus *in vitro* bekannt. Die Erkennung von chlamydialem HSP60 läuft bei dendritischen Zellen über TLR2 und TLR4. Dendritische Zellen, bei denen TLR2 oder TLR4 nicht funktionsfähig sind, haben eine verminderte Immunantwort auf HSP60 (7)(51). HEK293-Zellen, die mit TLR2 oder einer Kombination von TLR4 und MD2 transfiziert wurden, reagieren auf Stimulation mit HSP60 mit einer Aktivierung von NF κ B (69). Die Aktivierung der Zellen durch HSP60 hängt zudem von CD14 ab (28). Das Zusammenspiel von CD14 und TLR mit HSP60 triggert eine Signalkaskade, die mit der Aktivierung der Proteinkinasen p38 und JNK1/2, ERK1/2 und des Transkriptionsfaktors NF κ B endet. In dieser Kaskade ist MyD88 von zentraler funktioneller Bedeutung, da Zellen ohne MyD88 nur eingeschränkt durch HSP60 aktiviert werden (69). Mit der Entdeckung von TLR4 in humanen Atheromen ist zudem ein möglicher Mechanismus gefunden worden, wie HSP60 das angeborene Immunsystem aktivieren könnte (70). Zusätzlich scheint chlamydiales HSP60 die Produktion cross-reaktiver Antikörper zu stimulieren. Diese reagieren auf gemeinsame Epitope von chlamydialem und humanem HSP60, und dies könnte die Entzündungsreaktion aufrecht erhalten.

Alle Experimente, deren Ergebnisse bisher veröffentlicht wurden, sind *in vitro* generiert worden, so dass eine funktionelle Analyse der stimulatorischen Kapazität von HSP60 *in vivo* bisher nicht erfolgt ist. Eventuell kann HSP60 *in vivo* nicht stimulierend wirken, da die Endozytose des Proteins *in vitro* durch Serumkomponenten vermindert werden kann (69). Diese ist jedoch eine Voraussetzung für die anschließende zelluläre Aktivierung. Inwieweit dies auch *in vivo* gilt, muss noch geklärt werden.

1.6 ZIEL DER ARBEIT

Da eine Infektion mit *Chlamydia pneumoniae* für die Ausbildung der Atherosklerose mitverantwortlich gemacht wird, sind Erkenntnisse über die Art dieser Infektion von größtem Nutzen. Die Atherosklerose ist eine Erkrankung, an der große Teile der Bevölkerung in Deutschland und der westlichen Welt leiden. Jedes Jahr sterben in Deutschland viele Menschen an den Folgen der Atherosklerose, wie z.B. an einem Herzinfarkt oder einem Schlaganfall. Neben den Chlamydien ist auch chlamydiales HSP60 in den atherosklerotischen Plaques gefunden worden, was möglicherweise zusammen mit endogenem HSP60 eine Entzündungsreaktion hervorrufen kann. *In vitro*-Ergebnisse haben gezeigt, dass chlamydiales HSP60 eine Vielzahl an Zellen des angeborenen Immunsystems stimulieren und aktivieren kann. Nach Aktivierung durch HSP60 werden Zytokine wie TNF, IL-6 oder IL-8 induziert. Sicher ist somit, dass HSP60 neben seiner Funktion als Chaperon auch immunaktivierend wirken kann. In einem kompletten Organismus sind jedoch die Vorgänge weit komplexer als *in vitro*. Wir wissen, dass die Immunaktivierung durch HSP60 von Serumkomponenten gemindert werden kann. Somit stellt sich die Frage, ob HSP60 auch in einem komplexen Organismus immer noch immunaktivierend wirkt. Dazu sind bisher keine Daten erhoben worden.

Es galt daher zu prüfen, ob chlamydiales HSP60 *in vivo* als TLR-Rezeptor abhängiges PAMP agiert, somit das angeborene Immunsystem stimuliert und eine entzündliche Reaktion, wie für Atherosklerose beschrieben, vorantreiben oder sogar initiieren kann. Auch bei einer chlamydialen Entzündung durch *Chlamydia pneumoniae*, wie zum Beispiel einer Pneumonie, ist das frühzeitige Erkennen des Bakteriums von großer Bedeutung für den Organismus. Da chlamydiales LPS nicht sehr immunstimulatorisch ist, der CpG-Gehalt seiner DNA sehr niedrig ist und somit eine Erkennung über diese Faktoren nicht wahrscheinlich ist, sollte es einen weiteren Faktor geben, der auf einen menschlichen Organismus immunstimulatorisch wirkt. Auch hier könnte HSP60 eine wichtige Rolle spielen. Eine Untersuchung der Wirkungen von chlamydialem HSP60 *in vivo* erscheint daher hilfreich, um die Immunogenität von *Chlamydia pneumoniae* zu beschreiben.

MATERIAL

2.1 GERÄTE

Blotkammer	Trans-Blot SD, Semi-Dry Transfer Cell, Bio-Rad, München
Brutschrank	Hera cell 240, Heraeus, Langenselbold
Durchflußzytometer	FACSCalibur, Becton Dickinson, USA
Elektrophorese	Electrophoresis Power Supply EPS600, Pharmacia Biotech, Amersham, Freiburg
Mikroplatten-Leser	Sunrise, Tecan, Männedorf, Schweiz
Entwickler	AGFA Curix 60, Röntgen Bender, Augst, Schweiz
FPLC	FPCL System UV MII, Pharmacia Biotech, Amersham, Freiburg
Heizblöcke	Thermomixer compact, Eppendorf, Hamburg
Kühlzentrifugen	Biofuge fresco, Heraeus, Hanau Multifuge 3 S-R, Heraeus, Hanau
Mikroskope	Axiovert 100, Zeiss, Jena
pH-Meter	pH-Meter pH526, WTW, Weilheim
Plattenschüttler	Rocky, Rothhaar & Schröder Laborgeräte
Sterilbank	LaminAir, HLB247265, Heraeus, Hanau
Tischzentrifugen	Zentrifuge 5415 C, Eppendorf, Hamburg
Überkopfschüttler	Mixing Rotor, Variotim, Renner GmbH, Dannstadt

Ultrazentrifuge	Sorvall RC 26 Plus, Sorvall, über Kendro, Langenselbold
Vortex	MS2 Minishaker, IKA, USA
Waage	610-E2, Sartorius, Göttingen
Wasserbad	GFL, Gesellschaft für Labortechnik, Burgwedel
Zentrifugen	Megafuge 1.0, Heraeus, Hanau
Zytospin	Cytospin 3, Shandon, Pittsburgh, Pennsylvania, USA

2.2 CHEMIKALIEN

MATERIAL	HERSTELLER
10x Tris/Glycine	
2-Mercaptoethanol	Gibco, Invitrogen Corporation, Karlsruhe
Acrylamid 30%	Biorad, München
Acrylamid 40%	Roth, Karlsruhe
Alum	Biorad, München
anti-CD43 microbeads	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach
Bromphenolblau	Sigma, Taufkirchen
BSA (Rinderserumalbumin)	Sigma, Taufkirchen
CpG	TIB MolBiol, Berlin
Desoxycholic acid	Sigma, Taufkirchen
DMEM	PAA Laboratories, Pasching, Österreich
DNase, RNase frei	Roche, Mannheim
DTT (Dithiothreitol)	Sigma, Taufkirchen
ECL-Lösung Western Lightning	PerkinElmer über NEN, Köln
Ethanol	Merck, Darmstadt
FCS	BiochromAG, Berlin
Glycine	Sigma, Taufkirchen
H ₂ SO ₄	Merck, Darmstadt
HAT Media Supplement (50x)	Sigma, Taufkirchen

HFCS,	
Hybridoma Fusion and Cloning Supplement	Roche, Mannheim
Imidazol	USB, Cleveland, Ohio, USA
Imject Alum	Pierce, Perbio, Bonn
IPTG	AppliChem GmbH, Darmstadt
Isotonische Natriumchlorid-Lösung	DeltaSelect GmbH, Pfullingen
LPS (E.coli)	Sigma, Taufkirchen
Lysozym	Sigma, Taufkirchen
Magermilchpulver	Fluka, Steinheim
Methanol	Roth, Karlsruhe
Na-Acetat APS (Ammoniumpersulfat)	Sigma, Taufkirchen
Ni-NTA Agarose Beads	Qiagen, Hilden
Ovalbumin	Sigma, Taufkirchen
PBS low-tox	Sigma, Taufkirchen
PBS Pulver	Biochrom AG, Berlin
PEG 1500	Roche, Mannheim
Penicillin/Streptomycin	Biochrom AG, Berlin
RPMI	PAA Laboratories, Pasching, Österreich
SeeBlue2	Invitrogen, Karlsruhe
Substrate A	BD Pharmingen, Heidelberg
Substrate B	BD Pharmingen, Heidelberg
Sucrose	Sigma, Taufkirchen
TEMED	Pierce, Perbio, Bonn
Tris SDS (Natriumdodecylsulfat	Roth, Karlsruhe
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan	Roth, Karlsruhe
Triton X-100	GibcoBRL, Eggenstein
Tween 20	Sigma, Taufkirchen
Water for Embryo Transfer (low-tox)	Sigma, Taufkirchen

2.3 ZELLMEDIEN

Als Mediengrundlage wurde RPMI der Firma PAA benutzt. Folgende Zellmedien fanden Verwendung:

CM (komplettes Medium)	RPMI 1640	500 ml
	P/S ($10^4/10^4U/ml$)	5 ml
	ME (50mM)	5 ml
	FCS	50 ml
HAT-Medium	RPMI 1640	500 ml
	P/S ($10^4/10^4U/ml$)	5 ml
	ME (50mM)	5 ml
	FCS	50 ml
	HAT(50x)	10 ml
	HFCS(50x)	10 ml
Hybridom-Waschmedium	RPMI 1640	500 ml
	P/S ($10^4/10^4U/ml$)	5 ml
	ME (50mM)	5 ml
MACS-Puffer	PBS	500 ml
	FCS	15 ml

2.4 LÖSUNGEN UND PUFFER

UGB	Tris	30 g
	SDS	2 g
	H_2O	ad 500 ml
	auf pH 6,8 einstellen	
LGB	Tris	182 g
	SDS	4 g
	H_2O	ad 1 l
	auf pH 8,8 einstellen	
Laufpuffer	H_2O	400 ml
	Laufpuffer 5x	100 ml
Transfer Puffer	Methanol	200 ml
	10xTris/Glycine	80 ml
	H_2O	720 ml
1M DTT	DTT	1,54 g

	0,01M Na-Acetat	ad 10 ml
	auf pH 5,2 einstellen	
Trislösung (für Antikörper)	Tris-OH	50 mM
	NaCl	150 mM
	in H_2O	
	auf pH 8,0 einstellen	
Glycinlösung (für Antikörper)	Glycin	100 mM
	in H_2O	
	auf pH 3,0 einstellen	
Ammoniumchlorid-Lysepuffer	NH_4Cl	8,02 g
	KCO_3 1 g	
	Na_2EDTA	37,2 g
	dd H_2O	ad 800 ml
	auf pH 7,2-7,4 einstellen	
4x Lämmli Puffer	Tris-HCl (1M)	6,25 ml
	SDS	2 g
	Glycerol	50 g
	EDTA	58,44 g
	Bromphenolblau	100 ng
	dd H_2O	ad 100 ml
TBST	NaCl	8,8 g
	KCl	0,2 g
	Tris	3 g
	dd H_2O	ad 800 ml
	Tween 20	500 μ l
	auf pH 7,4 einstellen	
	dd H_2O	ad 1000 ml
FPLC Puffer	20mM Tris-HCl (1M)	3,14 g
	50mM NaCl	2,32 g
	dd H_2O	ad 1 l
	auf pH 8 einstellen und	

	filtrieren	
Lysepuffer	50mM Hepes	10 ml
(HSP60-Aufreinigung)	150mM NaCl	1,75 g
	1% Triton X-100	2 ml
	ddH ₂ O	ad 200 ml
	auf pH 8 einstellen und filtrieren	
kurz vor Benutzung:	Lysozym 2mg/ml	400 mg
ELISA Waschpuffer	PBS	95,5 g
	ddH ₂ O	ad 10 l
	Tween 20	5 ml
Giensa-Lösung	Giensa-Stammlösung	0,8 ml
	Weise-Puffer pH 7,2	10,0 ml

2.5 SDS GELE

Trenngel 10%	LGB	2,5 ml
	Acrylamid 40%	2,5 ml
	H ₂ O	5ml
	APS 10%	40 µl
	Temed	7 µl
Sammelgel	UGB	1,9 ml
	Acrylamid 30%	1,2 ml
	H ₂ O	6,9 ml
	APS 10%	35 µl
	Temed	15 µl

2.6 MÄUSE

1. C57/BL6 Mäuse von Harlan Winkelmann GmbH, Borchem, Deutschland
2. Balb/c Mäuse von Harlan Winkelmann GmbH, Borchem, Deutschland
3. C3H/HeN und C3H/HeJ Mäuse von Charles River, Sulzfeld, Deutschland
4. C57/BL6 TLR2^{-/-} Mäuse sind von Tularik, San Francisco, Kalifornien, USA und wurden bei uns weiter gezüchtet. Sie sind neunfach rückgekreuzt.

5. TLR2^{-/-}TLR4^{def}. Mäuse wurden von uns selbst gezüchtet, hierzu wurden die C57/BL6 TLR2^{-/-} Mäuse mit C3H HEJ Mäusen verpaart und sechsfach rückgekreuzt.
6. MyD88^{-/-} Mäuse wurden uns von Dr. S. Akira (Osaka, Japan) zur Verfügung gestellt und bei uns weiter gezüchtet. Der Rückkreuzstatus ist neunfach.

Alle Mäuse wurden unter SPF (Special Pathogen Free) Bedingungen gehalten.

2.7 ANTIKÖRPER

ANTIKÖRPER	MARKIERUNG	HERSTELLER
anti-CD11b	APC	PharMingen, Hamburg
anti-GR1	FITC	PharMingen, Hamburg
anti-IgG2b	FITC	PharMingen, Hamburg
anti-IgG2b	APC	PharMingen, Hamburg
anti-CD16/32		PharMingen, Hamburg
anti-F4/80	FITC	Serotec, Düsseldorf
anti-KC	biotin	Becton Dickinson, Heidelberg
anti-TNF	PE	Becton Dickinson, Heidelberg
Streptavidin	PE	Becton Dickinson, Heidelberg
anti-mouse IgG	biotin	Serotec, Düsseldorf

2.8 SONSTIGE MATERIALIEN

MATERIALIEN	HERSTELLER
Plastikwaren	NUNC, Wiesbaden Falcon, BD Biosciences Pharmingen, Heidelberg TPP, Trasadingen, Schweiz Alpha Laboratories Ltd., Hampshire, Großbritannien Beckman, Kalifornien, USA
Gel-Blotting-Papier	Schleicher und Schuell, Dassel
Nitrozellulosemembran Protan BA85	Schleicher und Schuell, Dassel
BCA Protein Assay Kit	Pierce, Perbio, Bonn
Parafilm M	American National Can, Chicago, Illinois, USA
Dialyseschlauch	SpectraPor Membrane, Spectrum Lab., Rancho Dominguez, USA
Konzentrationsröhrchen	Amicon Ultra 10,000, Millipore, Schwalbach
DuoSet ELISA Development System	R&D Systems GmbH, Wiesbaden
Affinity Pak Detoxi Gel	Pierce, Perbio, Bonn
MACS Column L S	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach
Mouse Monoclonal Antibody Isotyping Kit	Amersham Biosciences, Freiburg
HiTrap Protein G Column	Amersham Biosciences, Freiburg
Cytofix/Cytoperm Plus (with GolgiPlug)	BD Bioscience Pharmingen, Heidelberg

KAPITEL 3

METHODEN

3.1 HSP60 AUFREINIGUNG

Prinzip: Chlamydiales HSP60 wird rekombinant in Bakterien produziert und dann aus dem Bakterienlysate aufgereinigt. Hierzu wurde ein prokaryotischer Expressionsvektor (pTrcHis C, Invitrogen) in *E. coli* (Stamm BL-21) eingebracht. Dieser Vektor kodiert für chlamydiales HSP60, an das N-terminal ein Tag aus sechsfachem Histidin hinzugefügt wird. Nickelbeads bilden mit diesem einen Komplex, wodurch das Protein aufgereinigt werden kann.

ERSTER TAG

Zunächst werden 6l autoklaviertes LB-Medium mit 60ml 40% Glucose (10ml/l) und 30mg/l Chloramphenicol (1ml/l) sowie 100mg/l Ampicillin (1ml/l) versetzt, und je 1l in große Glaskolben gegeben. Hierin werden die Bakterien über Nacht bei 37°C auf einem Schüttler inkubiert.

ZWEITER TAG

Nach ca. 12-13 Stunden Inkubation, wenn die Suspension beim Messen der Absorption bei OD_{600} zwischen 0,7 und 0,8 liegt, kann mit IPTG 0,4mM (entspricht 1g/l) für vier Stunden induziert werden. Jetzt wachsen die Bakterien nicht mehr, produzieren aber das Protein. Danach müssen die Bakterien bei 3750 rpm und 4°C zwanzig Minuten zentrifugiert werden. Die Pellets werden dann wieder mit sterilem PBS gewaschen und erneut wie beschrieben zentrifugiert. Das gewaschene Pellet wird in

30ml Lysepuffer (siehe Kapitel 2.4) resuspendiert und bei Raumtemperatur für 60 Minuten lysiert, schließlich wird es über Nacht bei -20°C eingefroren.

DRITTER TAG

Das Bakterienlysat wird langsam auf Eis aufgetaut. In der Zwischenzeit werden 12ml Ni-NTA-Agarose Beads dreimal mit PBS gewaschen (1500rpm, 4°C, 15min.) und in 10ml PBS aufgenommen.

80µl DNase wird dann zum aufgetauten Lysat pro Röhrchen hinzugegeben und für 60 Minuten inkubiert, die Pellets müssen dabei flüssig werden. Die Suspension wird nun erneut bei 12.000 rpm und bei 4°C zwanzig Minuten zentrifugiert. Die Bakterienreste sammeln sich nun im Pellet, während das Protein sich im Überstand befindet. Der Überstand wird gesammelt (ca. 180ml) und 3,6ml 1M Imidazol hinzugegeben (= 20mM), dann werden die bereits vorbereiteten Beads hinzugegeben. Die Lösung wird nun im Überkopfschüttler bei 4°C für zwei Stunden inkubiert.

Die Beads, an die nun das Protein gebunden ist, werden erneut mit PBS 10mM Imidazol dreimal gewaschen (1500rpm, 4°C, 15min), dabei werden die Pellets gepoolt. Schließlich werden die beladenen Beads in 20ml PBS aufgenommen. Die Suspension wird in eine Spritze geladen und dann mit hochkonzentriertem Imidazol eluiert. Die Imidazolösung mit dem Protein wird dann mittels FPLC nach ihrer Größe auf einer HR10 Säule (Pharmacia) fraktioniert. Aufgefangen wird die Proteinlösung in Eppendorf-Röhrchen, die einzelne Fraktionen auffangen. Gleichzeitig wird die Konzentration der Lösung bei einer OD von 280nm bestimmt.

Die Fraktionen mit dem höchsten Proteingehalt werden gepoolt. Diese werden dann in Konzentrationsröhrchen (Millipore) gegeben und bei 4°C und 3000rpm zentrifugiert, um sie auf eine Menge von ca. 500µl zu konzentrieren. Hierdurch wird dann der Pufferwechsel ermöglicht. Das Protein wird in 10ml FPLC-Puffer aufgenommen und erneut auf 2-3ml konzentriert. Das Protein wird jetzt steril filtriert, in flüssigen Stickstoff getaucht und bei -80°C eingefroren.

VIERTER TAG

Am nächsten Morgen werden die Einfrierröhrchen auf Eis aufgetaut. Die Proteine werden nach ihrer Größe getrennt (Superdex 200HR, Pharmacia). Bei drei Millilitern Proteinlösung müssen drei Läufe gefahren werden. Je 1ml wird auf die Säule gegeben, das Eluat wird erneut in Eppendorf-Röhrchen aufgenommen und die Ab-

sorption bei 280nm bestimmt. Hier werden dann die einzelnen Fraktionen aus den verschiedenen Läufen gepoolt, erneut steril filtriert und schließlich bei -80°C weggefroren. Die Proben können nun direkt benutzt werden, oder der Endotoxingehalt der Proben wird mit der Polymyxin B-Säule reduziert.

3.2 WEITERE AUFREINIGUNG VON HSP60 ÜBER DIE POLYMYXIN B-SÄULE

Prinzip: Das Polymyxin B in der Säule ist ein Antibiotikum, das an LPS bindet. Auch Endotoxinkomplexe, die möglicherweise eng an das HSP60 gekoppelt sein könnten, sollten so herausfiltriert werden.

Die bei den Proteinfractionen gemessene Endotoxinkonzentration war in der Regel sehr niedrig (etwa bei 5ng/ μ g Protein), trotzdem sollte eine Kontamination des verwendeten Proteins möglichst verhindert oder maximal verringert werden. Zunächst werden alle benutzten Lösungen, die Säule selbst sowie das aufzureinigende Protein auf Raumtemperatur gebracht. Die Säule wird zunächst mit 5ml 1% Desoxycholsäure gespült. Dieses Detergens soll eventuell vorhandene Endotoxinkontaminationen aus der Säule entfernen. Danach wird das Detergens mit aufgereinigtem Wasser aus der Säule herausgespült. Die Säule wird nun mit 0,9% NaCl Lösung gespült, um diese zu equilibrieren. Das untere Ende der Säule wird dann verschlossen. Anschließend wird das Protein aufgetragen, die Menge sollte pro Säule 500 μ l nicht übersteigen. Das Protein inkubiert nun eine Stunde auf der Säule, um eine möglichst gute Aufreinigung zu bekommen. Schließlich wird der Stöpsel am Ende der Säule entfernt, das Protein mit 0,9%NaCl Lösung eluiert und in Fraktionen von 500 μ l aufgefangen. Nach Benutzung der Säule muss diese wieder mit Desoxycholsäure gespült und mit Wasser gereinigt werden. Bei den aufgefangenen Proteinfractionen wird dann die Konzentration mit der Bradford-Methode bestimmt. Jetzt kann das Protein für *in vitro*- und *in vivo*-Versuche benutzt werden.

3.3 PROTEINBESTIMMUNG MIT DER BRADFORD-METHODE

Prinzip: Die BCA (bicinchonic acid)-Methode ist eine schnelle und einfache Methode, um Proteine zu quantifizieren. Bei dieser Methode werden durch die Proteine Cu^{2+} -Ionen zu Cu^{1+} -Ionen reduziert. Durch die Chelatbildung von zwei BCA-Molekülen mit einem Kupfer-Ion kommt es zu einer Farbstoffbildung, die bei einer Absorption von 562nm ausgelesen werden kann. Wir benutzen hierzu einen Kit des

Herstellers Pierce.

In einer 96 Loch Platte werden $25\mu\text{l}$ der zu bestimmenden Proteinfractionen pipettiert. In den obersten zwei Reihen wird zudem ein Standard mit bekannter Proteinkonzentration durchtitriert. Die eigentliche Bestimmungslösung wird nun aus einem Teil Lösung A und 50 Teilen Lösung B zusammengemischt. $200\mu\text{l}$ werden nun in jede Vertiefung gegeben. Die Platte wird dann bei 37°C für 30 Minuten inkubiert und kann dann im ELISA-Lesegerät bei OD_{620} ausgelesen werden. Anhand des vorhandenen Standards kann nun der Proteingehalt der Testproben ermittelt werden.

3.4 IMMUNISIEREN VON MÄUSEN

Prinzip: Durch mehrmalige Injektionen eines Antigens zusammen mit einem Adjuvans will man eine möglichst hohe Anzahl an Plasmazellen, die spezifisch gegen das jeweilige Antigen sind, aktivieren, um in der nachfolgenden Fusion antigenspezifische Hybridome zu erhalten. Als Adjuvans wurde Alum benutzt, eine Aluminiumhydroxidlösung sowie CpG 1668, ein Oligonukleotid, das bakterielle DNA-Motive zeigt.

Pro Maus wird eine Lösung aus $100\mu\text{g}$ Hsp60 und 10nmol CpG (1668) in $100\mu\text{l}$ PBS hergestellt. Hierzu wird $100\mu\text{l}$ Alum gegeben. Diese Lösung wird dreißig Minuten lang auf dem Vortexer gemixt, je $200\mu\text{l}$ werden dann jeder Maus intraperitoneal injiziert. Nach vier Wochen wird erneut genauso immunisiert. Nach der zweiten Injektion können die Serumtiter der Mäuse kontrolliert werden (siehe >Klonieren und Testen< (3.5)). Der letzte Boost erfolgt dann nach weiteren vier Wochen mit einer Lösung von $100\mu\text{g}$ HSP60 und 10mmol CpG, diesmal ohne Alum, die intravenös gespritzt wird. Die Fusion kann nun nach weiteren drei Tagen erfolgen.

3.5 HYBRIDOMFUSION

Prinzip: Das Ziel ist es, eine Zelle zu generieren, die einen monoklonalen Antikörper herstellt wie eine Plasmazelle, jedoch durch Fusion mit einer Krebszelle nicht wie natürlicherweise nach ein paar Tagen in Kultur stirbt, sondern immer weiter expandiert werden kann. Fusionspartner sind hier also Plasmazellen aus einer immunisierten Maus und immortalisierte Myelomzellen, die AG8 Zellen, die keine An-

Antikörper produzieren können. Die Fusion kommt durch Polyethylenglykol (PEG) zustande, welches die Zellwände verklebt und somit das Fusionieren dieser Zellen ermöglicht. Die Myelomzellen sind gegenüber einem Hypoxanthin-Aminopterin-Thymidin-Medium (HAT) empfindlich. Nur aus Myelomzellen bestehende Fusionsprodukte können in diesem Fall nicht wachsen, da ihnen das Enzym Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase (HGPRT) fehlt. Das HGPRT-Gen wird jedoch von den Milzzellen beigesteuert und ermöglicht es den Hybridzellen, im HAT-Medium zu überleben. Und nur Hybridzellen können in Kultur kontinuierlich wachsen, da sie außerdem das maligne Potenzial der Myelomzellen besitzen. Deshalb sterben reine Myelomzellen und nichtfusionierte Milzzellen im HAT-Medium ab. Anschließend wird getestet, ob die Hybridome Antikörper erzeugen.

MILZPRÄPARATION

Die immunisierte Maus wird drei bis vier Tage nach der letzten Injektion mit CO₂ getötet. Das Blut wird aus dem Herzen entnommen, um Serum zu gewinnen, und die Milz wird entnommen. Die Milz wird nun durch ein steriles Zellsieb passiert, und mehrmals mit MACS-Puffer gewaschen. Dann wird eine Lyse der Erythrozyten mit Ammoniumchlorid-Puffer durchgeführt. Hierzu wird das Zellpellet in 5ml Lysepuffer aufgenommen und 5 Minuten lang bei Raumtemperatur belassen. Anschließend wird die Lösung mit MACS-Puffer verdünnt, zentrifugiert und erneut mit MACS-Puffer gewaschen. Im Anschluss werden B-Zellen durch Depletion von T-Zellen via magnetischer Separation (MACS) angereichert. Antikörper gegen CD43 binden an T Zellen und nicht an B Zellen. In diesem Fall ist der Antikörper an ein magnetisches Partikel (Bead) gekoppelt. Wenn nun die Zellen eine Säule in einem magnetischen Feld durchlaufen, werden die Zellen, die ein magnetisches Partikel tragen, zurückgehalten, während alle anderen Zellen die Säule durchlaufen. Die Zellen werden gezählt und in 50µl MACS-Puffer aufgenommen, 50µl MACS anti-CD43-Beads werden hinzugegeben und gut resuspendiert. Die Suspension wird nun auf Eis für 30 Minuten inkubiert. Die beladenen Zellen werden mit MACS-Puffer gewaschen und die MACS Säule wird gespült. Jetzt werden die Zellen über die Säule gegeben und mit MACS Puffer eluiert. Die eluierten Zellen, die jetzt keine T-Zellen mehr enthalten sollten, werden mit Hybridom Waschmedium dreimal gewaschen (1.500 rpm, 4°C, 5min) und bei 37°C gehalten. Die AG8 Zellen, die man schon zuvor entsprechend vermehren sollte, werden ebenso gewaschen und auch bei 37°C inkubiert.

FUSION

B-Zellen und Myelom sollten im Verhältnis 1:2 in ein spezielles abgerundetes Glasröhrchen gegeben werden. Diese werden dann gut gemischt und bei 1400 rpm für 5 Minuten bei 37°C zentrifugiert. Der Überstand wird nun bis auf einen kleinen Rest abgesaugt und das Zellpellet wird nun durch vorsichtiges Bewegen des Glasröhrchens wieder in Lösung gebracht. 1ml PEG wird langsam unter ständigem Rollen des Röhrchens über eine Minute in das Röhrchen gegeben. Dann wird langsam Waschmedium hinzugegeben und zwar 2ml in einer Minute, dann 4ml in einer Minute und schließlich 8ml in einer Minute. Es wird nun erneut zentrifugiert und zwar bei 1400 rpm für zehn Minuten. Das Zellpellet in der Restflüssigkeit ist vorsichtig durch Bewegung zu resuspendieren. Die Zellen werden nun vorsichtig mit HAT-Medium verdünnt bis zu einer Konzentration von 1×10^6 Zellen/ml. Auch die Zellen müssen dabei die ganze Zeit bei 37°C gehalten werden. Die Suspension wird nun auf 96-Loch Platten ausplattiert. Zwei Tage später werden die Zellen zum ersten Mal mit HAT-Medium gefüttert und zunächst eine Woche inkubiert.

KLONIEREN UND TESTEN

Wenn man in einzelnen Löchern wachsende Zellhaufen von kleinen runden Zellen beobachten kann, kann es sich hier um Klone handeln. Der Überstand dieser Zellen kann nun verwendet werden, um zu testen, ob dieser Zellklon die gewünschten Antikörper produziert. Zum Testen der Überstände wird eine Maxisorb Platte mit HSP60 ($1 \mu\text{g/ml}$) über Nacht beschichtet, als Negativkontrolle dient Ovalbumin in gleicher Konzentration. Die Platte wird dreimal mit ELISA-Waschlösung gewaschen und mit PBS 1% BSA und 5% Sucrose (Blocklösung) für zwei Stunden geblockt. Danach wird die Platte erneut gewaschen und die Zellüberstände werden auf die Platte gegeben, so dass von jedem Zellüberstand $50 \mu\text{l}$ in eine mit HSP60 und in eine mit OVA beschichtete Vertiefung gegeben wird. Nach zwei Stunden Inkubation wird die Platte gewaschen und $50 \mu\text{l}$ des biotinylierten Antikörpers gegen murine Immunglobuline wird dazugegeben (1:1000 in PBS 1%BSA). Nach weiteren zwei Stunden wird die Platte dreimal gewaschen und Streptavidin-Peroxidase (1:200 in PBS 1% BSA) wird auf die Platte pipettiert ($50 \mu\text{l}$ pro Vertiefung). Zwanzig Minuten später wird die Platte wieder gewaschen und das Farbagens (TMB) wird in die Platte pipettiert ($50 \mu\text{l}$); sobald sich einzelne Vertiefungen tiefblau färben, wird die Reaktion mit Stop-Solution gestoppt ($50 \mu\text{l}/\text{Vertiefung}$). Der Farbumschlag wird im ELISA-

Lesegerät bei 450/570nm ausgelesen. Die Klone, deren Überstand bei HSP60 deutlich positiv reagiert haben und die bei OVA nicht reagiert haben, werden nun weiter subkloniert und erneut getestet.

3.6 WESTERN BLOT

Prinzip: Der Western Blot ermöglicht eine Identifizierung und/oder Quantifizierung von HSP60 innerhalb eines Proteingemisches. Nach der Auftrennung der Proteine in einem speziellen Gel erfolgt die Übertragung auf eine Membran, das sogenannte Blotten. Die Detektion erfolgt gewöhnlich durch spezifische Antikörper, die an spezifische Epitope des auf der Membran fixierten Zielproteins binden.

AUFTRENNUNG DURCH GELELEKTROPHORESE

Zunächst wird in eine hierfür vorhandene Apparatur ein Trenngel zwischen zwei Glasplatten gegossen. Wir benutzten ein 10%iges Acrylamid-Trenngel (siehe Kapitel 2.5). Nachdem dies getrocknet ist, kann ein Sammelgel von ca. 2cm Höhe auf das Trenngel gegossen werden. Das Gel muss nun fest werden. In dieser Zeit werden die Proteinproben vorbereitet. Eine entsprechende Menge Protein wird in 4x Lämmli-Puffer mit 10% DTT gegeben, hierdurch werden die Disulfidbindungen der Proteine zerstört, eventuelle Dimere werden dadurch getrennt. Das Probenvolumen sollte etwa 15µl betragen, diese werden dann für fünf Minuten bei 95°C aufgeköcht und dann kurz bei 13.000rpm herunter zentrifugiert. Die Proben werden auf das Gel aufgetragen, mit Laufpuffer (siehe Kapitel 2.4) überschichtet und bei 180 Volt und 50 Milliampere für 45 Minuten getrennt. Das Trenngel wird abgetrennt, und vorsichtig auf eine Nitrocellulosemembran gelegt. Dann wird es mit Blotpapier auf beiden Seiten in eine Transferapparatur übertragen und bei 25V und 40mA 90 Minuten lang geblottet, hierbei werden die Proteine von dem Gel auf die Membran übertragen. Nach dem Blotten wird die Membran in der Milchlösung (5% Milchpulver in TBST) über Nacht bei 4°C inkubiert. Am nächsten Morgen wird die Membran dreimal in TBST gewaschen. Danach wird der erste Antikörper (anti-HSP60) in einer Konzentration von 10µg/ml oder entsprechende Hybridomüberstände in Milchlösung gegeben und die Membran darin bei Raumtemperatur für eine Stunde auf einem Schüttler inkubiert. Die Membran wird dann wieder dreimal in TBST gewaschen, der zweite Antikörper (goat anti-mouse Peroxidase gekoppelt) wird in Milchlösung aufgelöst und mit der Membran eine Stunde inkubiert. Die Membran

wird wiederum mit TBST gewaschen, danach einmal mit TBS. Die Membran wird schließlich in eine Illuminationslösung (ECL) gegeben, zwischen zwei Plastikfolien eingeschweißt und kann nun auf einem Film dargestellt werden.

3.7 ISOTYPISIEREN DER ANTIKÖRPER

Prinzip: Für die Aufreinigung der Antikörper ist es wichtig, den jeweiligen Isotypen zu wissen, da diese unterschiedlich aufgereinigt werden. Verwendet wurde der ›Mouse Monoclonal Antibody Isotyping Kit‹ des Herstellers Amersham Biosciences.

Überstände der zu testenden Hybridome werden nun mit TBST 1:10 verdünnt. Drei Milliliter davon werden in ein Röhrchen mit einem Detektionsstreifen gegeben und unter Schütteln 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Danach werden die Streifen zweimal fünf Minuten mit TBST gewaschen. $10\mu\text{l}$ des Peroxidase Antikörpers werden in 5ml TBST (jeweils pro Streifen) pipettiert. Der Streifen wird anschließend in der Antikörperlösung unter Schütteln 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Der Papierstreifen wird nach der Inkubation mit dem Erstantikörper erneut mit TBST zweimal fünf Minuten lang gewaschen, dann werden drei Milliliter der Substratlösung (ein Tropfen H_2O_2 in 50ml TBS plus eine Substratablette in 10ml kaltem Methanol) zu einem Streifen gegeben und 15 Minuten auf dem Schüttler inkubiert. Der Streifen wird dann zweimal mit destilliertem Wasser gewaschen. Auf dem Papierstreifen erscheinen die jeweiligen Isotypen als braun gefärbte Banden.

3.8 ANTIKÖRPERAUFREINIGUNG DURCH AFFINITÄTSCHROMATOGRAPHIE

Prinzip: Das Prinzip beruht auf einer spezifischen, reversiblen Bindung der Antikörper an Protein A auf der Gelmatrix. Durch pH-Veränderungen kann nun eine Bindung begünstigt oder verhindert werden.

Die jeweiligen Hybridome lässt man in CM wachsen, bis man etwa 200ml Medium gesammelt hat, die Lösung wird auf pH8 eingestellt und steril filtriert. Eine Affinitätsäule mit Protein A wird mit PBS und danach mit Glycinlösung (pH3) gewaschen und anschließend mit PBS durchgespült. Dann wird der Überstand langsam über die Säule geleitet. Nachdem der Zellüberstand komplett über die Säule gelaufen ist, kann er nun mit Glycinlösung eluiert werden. Während die Glycinlösung in die Säule läuft, fängt man am Ende der Säule je 12 Tropfen auf, durch Tris-Puffer

in den Röhrchen wird die Lösung neutralisiert. Insgesamt werden 15 Fraktionen gesammelt, aus ihnen wird dann die Proteinkonzentration mit Hilfe der Bradford-Methode bestimmt. Die Fraktionen, in denen das Protein nachgewiesen wurde, werden zusammengegeben, und in einen Dialyseschlauch gegeben. Das Protein wird dann über Nacht bei 4°C in 1l PBS dialysiert. Am nächsten Morgen wird das PBS ausgetauscht, und der Antikörper wird für weitere drei Stunden dialysiert. Dann wird die Antikörperlösung aus dem Schlauch entnommen, steril filtriert und erneut die Proteinkonzentration gemessen. Der Antikörper wird aliquotiert und bei -80°C eingefroren.

3.9 ELISA

Der hier beschriebene ELISA entspricht dem DuoSet von R&D Systems, alle Antikörper, Enzyme, Standards und Substrate wurden nach Angaben des Herstellers in Lösung gebracht und aliquotiert. Zunächst wird eine Maxisorbplatte, eine 96-Loch-Platte, mit dem ersten Antikörper (0,8µg/ml) über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert. Am nächsten Morgen wird die Platte dreimal mit der ELISA-Waschlösung gewaschen. Danach erfolgt das Blocken mit Blocklösung (1%BSA und 5%Sucrose in PBS), um unspezifische Bindungen zu verhindern. Nach zwei Stunden wird die Platte erneut gewaschen, jetzt können die Proben hinzugegeben werden. In zwei Reihen wird parallel eine Standardverdünnung des zu detektierenden Proteins gegeben. Zellüberstände werden je nach Konzentration unverdünnt oder 1:10 verdünnt; Serum wurde in der Regel 1:4 verdünnt. Die Proben inkubieren zwei Stunden bei Raumtemperatur, danach erfolgt wieder ein Waschschrift. Ein Aliquot des zweiten Antikörpers wird nun in 10ml PBS 1%BSA-Lösung (Reagenzlösung) aufgelöst und auf die Platte pipettiert. Zwei Stunden später wird gewaschen und das Enzym hinzugegeben. Hierzu werden 50µl Streptavidin-HRP in 10ml Reagenzlösung gegeben und für 20 Minuten auf die Platte gegeben. Danach wird erneut gewaschen und eine aus Lösung A und Lösung B bestehende Substratlösung (1:1 TMB Substrat BD Biosciences) hergestellt. 100µl der Substratlösung wird nun in jede Vertiefung gegeben. Die Platte wird nun im Dunkeln inkubiert, bis sich ein Farbumschlag ins Blaue zeigt. Der Farbumschlag wird dann durch die Zugabe von 50µl Stopplösung (2N H₂SO₄) gestoppt. In einem ELISA-Lesegerät wird nun die Absorption bei 450nm gemessen, als Referenz dient die Absorption bei 570nm. Von den so erhaltenen optischen Dichten (OD) können nun anhand der Standardverdünnung die Werte für die Proben

errechnet werden. Hierzu werden die Softwareprogramme Sigma Plot und Excel genutzt.

3.10 ZELLGEWINNUNG AUS KNOCHENMARK

Prinzip: Aus Vorläuferzellen des roten Knochenmarkes, das man bei Mäusen aus den Ober- und Unterschenkelknochen gewinnen kann, kann man unter Zugabe von Wachstumsfaktoren Makrophagen oder dendritische Zellen ausdifferenzieren.

Die Mäuse werden durch Genickbruch getötet, mit 70%igem Ethanol abgesprüht und Unter- und Oberschenkel frei präpariert. Unter sterilen Bedingungen wird nun mit einer mit Medium gefüllten Spritze das rote Knochenmark herausgespült. Die Knochenmarkssuspension wird nun durch mehrmaliges Pipettieren in eine Einzelzellsuspension überführt. Die Suspension wird fünf Minuten bei 1000rpm zentrifugiert, der Überstand wird verworfen, und das Pellet in 1,5ml Erythrozyten-Lysepuffer pro Maus drei Minuten lang bei Raumtemperatur gelöst. Die Zellen werden mit Medium gewaschen und in Medium aufgenommen, das aus CM mit dem Wachstumsfaktor M-CSF Medium besteht. In Zellkulturschalen inkubiert man die Zellen dann im Inkubator bei 37°C über Nacht. Am nächsten Tag werden die nicht adhärenen Zellen in einer Konzentration von $1-2 \times 10^7$ Zellen/ml in Petrischalen ausgesät. Nach drei Tagen werden die Zellen erneut mit Makrophagen-Medium gefüttert. Am Tag 7-10 können die Zellen dann für Experimente verwendet werden. Für die Herstellung von dendritischen Zellen werden die Zellen in einem Medium mit GM-CSF aufgenommen und zwei Stunden in Zellkulturschalen inkubiert, dann die nicht adhärenen Zellen in Petrischalen ausgesät. Nach sieben Tagen sind die Zellen ausdifferenziert.

3.11 PERITONEALLAVAGE BEI MÄUSEN

In der Regel wurde eine HSP60 Lösung mit 150µg in 200µl PBS oder 0,9%NaCl Lösung pro Maus injiziert. Meist wurde die Peritoneallavage zwei Stunden nach Injektion des Proteins durchgeführt. Nun wird die Maus mit CO₂ getötet. Bei der toten Maus wird nun durch einen Fellschnitt die Bauchdecke freigelegt. 7ml kaltes Medium wird mit einer Spritze in die Bauchhöhle gespritzt, verbleibt dort kurz und wird wieder herausgezogen. Danach wird der Thorax der Maus geöffnet, das Herz wird eröffnet, und man lässt das Blut in den Thoraxraum fließen, dort wird es entnom-

men. Aus dem Blut wird Serum gewonnen, indem man es ca. 2 Stunden auf Eis stehen lässt und dann bei 13.000 rpm 20 Minuten zentrifugiert. Die Peritoneallavageflüssigkeit wird zentrifugiert, ein Teil der Lavage zur späteren Zytokinkontrolle abgenommen und eingefroren, und die Zellen werden für eine FACS Analyse angefärbt (siehe Kapitel 3.12).

3.12 DURCHFLUSSZYTOMETRIE - FACS

Für die FACS (= Fluorescence Activated Cell Sorting)-Färbung werden die Milzzellen oder die Peritoneallavagezellen einer Erythrozytenlyse unterzogen und in PBS 3%FCS in einer Zellzahl von 1×10^6 Zellen pro ml aufgenommen. Zunächst wurde eine Blockierung der Fc-Rezeptoren mit anti-CD16/32 ($100 \mu\text{g/ml}$) bei 4°C 20 Minuten durchgeführt. Die Zellen werden dann zu je $100 \mu\text{l}$ in eine 96-Lochplatte gegeben. Während der ganzen Zeit der Färbung sollten die Zellen auf Eis gehalten werden. Dann folgt die Färbung der Zellen mit APC gefärbtem anti-CD11b ($1 \mu\text{g/ml}$) und FITC gefärbtem anti-Gr1 ($1 \mu\text{g/ml}$), oder den passenden Isotypkontrollen, um unspezifische Bindungen anzuzeigen. Die Zellen werden 30 Minuten lang gefärbt und dann dreimal mit PBS 3%FCS gewaschen. Anschließend werden sie in 2%iger Paraformaldehydlösung fixiert. Die Zellen können nun gekühlt aufbewahrt werden und dann im Durchflusszytometer gemessen werden.

3.13 INTRAZELLULÄRE FÄRBUNG

Für diese Färbung wurden Reagenzien der Firma PharMingen (Cytofix/Cytoperm Plus) benutzt. Bei der intrazellulären Färbung wird die Peritoneallavage dreißig Minuten nach Injektion von HSP60 vorgenommen. Die so gewonnenen Zellen wurden, um den intrazellulären Gehalt an KC bzw. TNF zu erhöhen, mit GolgiPlug (Brefeldin A $1 \mu\text{l/ml}$ Medium) in CM bei 37°C für drei Stunden inkubiert. Anschließend werden die Zellen wie oben beschrieben gewaschen, mit anti-CD16/32 geblockt und die Oberflächenrezeptoren angefärbt. Danach werden die Zellen mit Cytofix/Cytoperm Lösung fixiert und permeabilisiert. Jetzt kann der intrazelluläre Antikörper, also biotinylierter anti-KC mAb ($3 \mu\text{g/ml}$, 30 min, 4°) oder PE angefärbter anti-TNF mAb ($2 \mu\text{g/ml}$, 30 min, 4°) binden. Um den anti-KC Antikörper darzustellen, wird er in einem weiteren Färbeschritt mit PE gefärbten Streptavidin ($5 \mu\text{g/ml}$, 30 min, 4°) sichtbar gemacht. Nach intrazellulärer Färbung werden die

Zellen jeweils mit Perm/Wash gewaschen, hierdurch bleibt die Zellmembran aufgeschlossen, und die Zellen können so intrazellulär gewaschen werden. Zum Schluss wurden die Zellen wieder in PBS 3%FCS gewaschen, die Zellmembran wird hierdurch geschlossen. Die Zellen werden mit 2%igem Paraformaldehyd fixiert und bis zur Analyse im Kühlschrank aufbewahrt.

3.14 GIEMSAFÄRBUNG

Die aus der Peritoneallavage entnommenen Zellen werden gezählt, 30.000 Zellen werden durch einen Zytospin auf einen Objektträger zentrifugiert (72,3g, 5min). Die Zellen werden dann mit Methanol für zehn Minuten bei Raumtemperatur fixiert und mit Giemsalösung für zwanzig Minuten ebenfalls bei Raumtemperatur gefärbt. Die Färbelösung wird danach abgewaschen und die Präparate können mikroskopiert werden.

4.1 CHLAMYDIALES HSP60 INDUZIERT *in vivo* DAS CXC-CHEMOKIN KC, ABER KEIN TNF

In vitro stimuliert rekombinantes HSP60 von *Chlamydia pneumoniae* bei aus Knochenmark differenzierten dendritischen Zellen die Sekretion der proinflammatorischen Zytokine TNF und Il-12p40. Die stimulatorische Potenz des Proteins konnte durch Zugabe von Proteinase K oder Pronase E neutralisiert werden (7). Dies spricht für die direkte Wirkung des Proteins und schließt aus, dass diese Stimulation durch Kontaminationen wie zum Beispiel LPS entstanden ist. TNF ist als proinflammatorisches Protein wichtig für die angeborene Immunantwort, da es lokale Entzündungen unterstützt und die Immunantwort einleitet. Produziert wird es vor allem von Makrophagen, NK-Zellen und T-Zellen. In der Regel ist es einer der ersten Zytokine, die auf einen inflammatorischen Stimulus hin sezerniert werden. Von vielen PAMP, wie zum Beispiel LPS, weiß man, dass sie *in vivo* hohe Mengen an TNF induzieren.

Um das immunstimulatorische Potenzial von HSP60 *in vivo* zu erfassen, haben wir C57BL/6 Mäusen 150µg HSP60 intraperitoneal gespritzt. Überraschenderweise konnten wir im Serum der Mäuse, die HSP60 injiziert bekommen hatten, kein TNF detektieren, wie man in Abbildung 4.1 sieht. Dagegen sahen wir sehr hohe Konzentrationen des Chemokins KC im Serum von Mäusen, denen zwei Stunden vorher das Protein verabreicht worden war. KC ist als sogenanntes Chemokin ein Aktivator der Immunantwort, indem es Zellen an den Ort der Entzündung rekrutiert, es wirkt vor allem auf Polymorphkernige Neutrophile Granulozyten (PMN). Diese werden dann aktiviert und wandern entlang des Chemokingradienten zum Ort der Entzün-

dung. Auch drei Stunden nach Injektion sahen wir immer noch erhöhte Mengen des Chemokins, während 18 Stunden nach Injektion die Konzentration von KC wieder auf Normalniveau gesunken war. Da nach subkutaner Injektion das Protein Lymphknoten passieren muss, in denen es sehr viele dendritische Zellen gibt, injizierten wir unser HSP60 in die Fußballen der Mäuse (50µg/Fußballen). Doch auch jetzt konnten wir keine TNF- oder IL-12p40-Induktion erkennen, jedoch erneut erhöhte Konzentrationen von KC. Selbst nach intravenöser Injektion von HSP60 zeigte sich keine Erhöhung des TNF-Spiegels im Blut (Abb. 4.1 B). Auch hier war der KC-Wert deutlich erhöht, und wir konnten eine gewisse Sekretion von IL-12p40 beobachten. Um zu zeigen, dass wir TNF in unserem Modell prinzipiell induzieren können, injizierten wir als Positivkontrolle jeweils Endotoxin (1µg LPS/ Maus), hierbei sahen wir wie erwartet erhöhte Serumspiegel des Zytokins TNF (Abb. 4.1 D).

Auch die Erhöhung der HSP60-Menge, die wir den Mäusen injizierten, führte nicht zur Detektion von TNF. Wir sahen eine dosisabhängige Steigerung der Menge an KC und MIP-2, das wie KC auch ein CXC-Chemokin ist und ähnliche Wirkung zeigt (Abb. 4.2 A). TNF war zu keiner Zeit detektierbar, und auch hier sahen wir nur bei einer HSP60 Konzentration von 1mg eine kleine Menge IL-12p40 (Abb. 4.2 B). Zusammengefasst ergibt sich, dass HSP60 zwar CXC-Chemokine wie KC und MIP-2, aber kein TNF induziert.

Um zu sehen, ob die Peritoneallavagezellen durch HSP60 aktiviert wurden, analysierten wir die intrazelluläre Produktion von KC und TNF. Wie man aus Abbildung 4.3 erkennt, konnte man eine klare Induktion von KC in CD11b+ Zellen dreißig Minuten nach Injektion sehen. TNF konnten wir jedoch nur in sehr wenigen Zellen nachweisen. CD11b ist ein zellulärer Rezeptor, der vor allem auf Makrophagen, aber auch auf anderen Zellen, wie zum Beispiel dendritischen Zellen, zu finden ist. Diese Zellen sind die ersten, die auf einen immunologischen Stimulus reagieren.

In einem Vorexperiment konnten wir auch in der Lavageflüssigkeit zwar erhöhte Spiegel an KC gegenüber der mit PBS injizierten Kontrollgruppe sehen, jedoch kein TNF. Wenn man nun aber die Peritoneallavagezellen *in vitro* mit HSP60 stimuliert, konnten wir im Zellüberstand TNF entdecken (Abb.4.4). In einer Publikation von Gao et al. (9) wurde beschrieben, dass die Fähigkeit von HSP60, *in vitro* proinflammatorische Zytokine wie TNF zu stimulieren, darauf beruht, dass rekombinant hergestellte Proteine häufig mit Endotoxinen kontaminiert sind. Gao und seine Gruppe haben ihr rekombinant hergestelltes HSP60 über eine Polymyxin B Säule gegeben, in der Endotoxine zurückgehalten werden. Nachdem das Protein so aufgereinigt

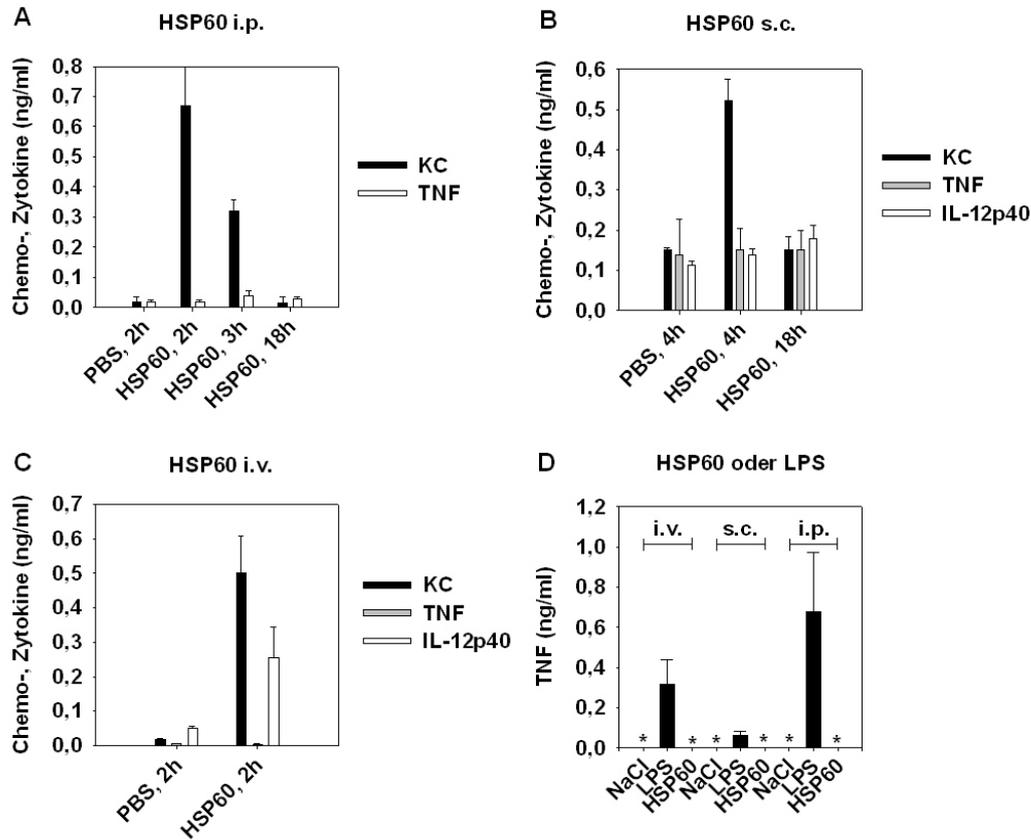


Abbildung 4.1. A: C57BL/6 Mäusen wurde HSP60 ($150\mu\text{g}/\text{Maus}$) oder PBS i.p. gegeben. Zwei Stunden später Blutabnahme und Testung des Serums auf TNF und KC
 B: Wie in A, nur wurde das HSP60 ($50\mu\text{g}/\text{Maus}$) hier subkutan in den Fuß injiziert. Hier wurde neben KC und TNF auch IL-12p40 gemessen.
 C: $200\mu\text{g}$ HSP60 wurde jeder Maus i.v. appliziert. Nach zwei Stunden wurde das Serum auf KC, TNF und IL-12p40 getestet.
 D: In diesem Experiment wurden die Mäuse mit HSP60 ($150\mu\text{g}/\text{Maus}$) oder als Kontrollen 0,9%NaCl oder LPS ($1\mu\text{g}/\text{Maus}$) intravenös, intraperitoneal oder subkutan gespritzt. Nach zwei Stunden Testung auf TNF. * :nicht nachweisbar

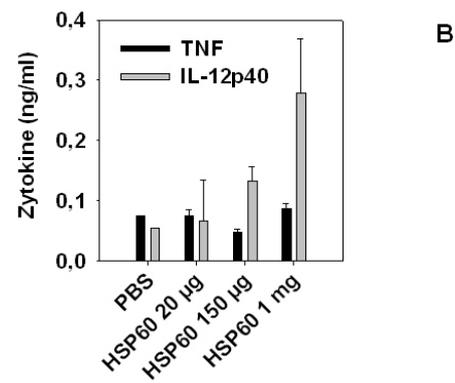
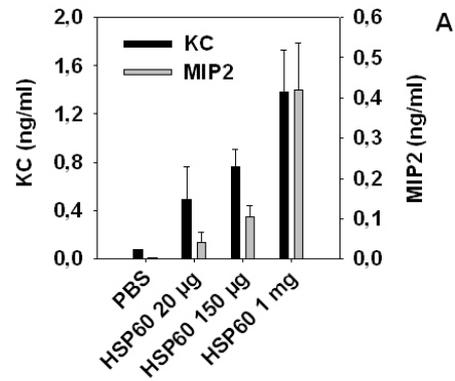


Abbildung 4.2. A: Verschiedene Konzentrationen HSP60 (20 µg, 150 µg, 1 mg) wurden intraperitoneal gespritzt, als Kontrolle diente PBS. Nach zwei Stunden wurde das Serum entnommen und auf KC und MIP₂ getestet.

B: Die Seren aus A wurden ebenfalls auf TNF und IL-12p₄₀ getestet.

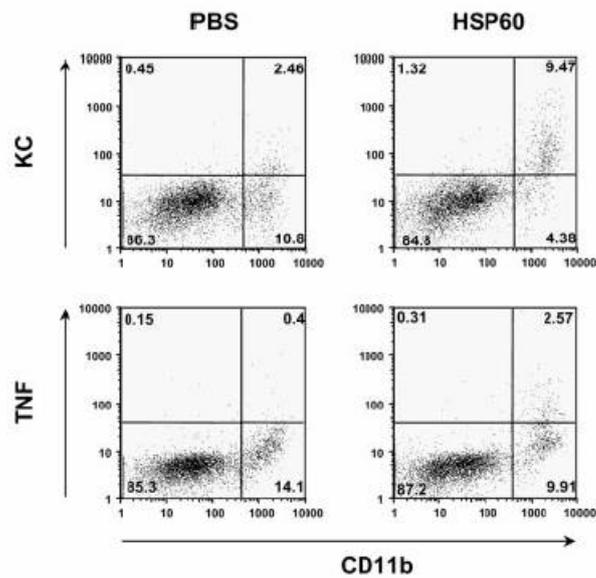


Abbildung 4.3. C57BL/6 Mäuse wurden mit 150µg HSP60 oder PBS als Negativkontrolle intraperitoneal gespritzt. Nach 30 Minuten wurden die Mäuse getötet und eine Peritoneallavage wurde durchgeführt. Die Zellen wurden oberflächlich mit APC-markiertem anti-CD11b gefärbt, danach wurde die Zelle fixiert, permeabilisiert und intrazellulär gegen KC oder TNF gefärbt.

war, konnten sie bei Stimulation von Raw Zellen, einer Makrophagen Zelllinie, kein TNF feststellen. Da HSP60 auch in seiner eigentlichen Funktion als Chaperon Proteine und Lipopeptide binden kann, konnten wir eine Verunreinigung des Proteins nicht komplett ausschließen. Um zu untersuchen, ob unsere Ergebnisse durch Kontamination beeinflusst worden waren, reinigten wir unser HSP60 ebenfalls über eine PMB Säule auf (siehe Kapitel 3.2). Wir sahen eine deutliche Verringerung von TNF im Überstand von Raw Zellen nach Stimulation mit Polymyxin B aufgereinigtem Protein im Vergleich zum einfach aufgereinigtem Protein, wie es von Gao et al. beschrieben wurde. Als wir das PMB aufgereinigte HSP60 zur peritonealen Injektion nahmen, stellten wir jedoch fest, dass es hier ebenso KC stimuliert wie vor der Aufreinigung (Abb. 4.4). Es scheint also so zu sein, dass bisher undefinierte Endotoxinkontaminanten für die *in vitro*-Induktion von TNF verantwortlich sind, die jedoch keinen Einfluss auf die stimulatorische Kapazität von HSP60 *in vivo* zu haben scheinen. Somit hatte die weitere Aufreinigung keinen Einfluss auf die Effektivität von HSP60.

4.2 CHLAMYDALES HSP60 INDUZIERT EINE EINWANDERUNG VON PMN IN PERITONEALHÖHLE UND BLUT

Da KC und MIP-2 Chemokine sind, deren Funktion unter anderem darin besteht, neutrophile Granulozyten anzulocken, wollten wir dies in unserem Modell beobachten. Deshalb wurde die Zusammensetzung der Peritonealzellen nach Injektion von HSP60 oder PBS als Negativkontrolle mit Hilfe des FACS analysiert. Wir verwendeten über eine PMB-Säule aufgereinigtes HSP60, um die Rolle möglicher Kontaminanten zu minimieren. Wir analysierten die Zellen zwei Stunden nach Injektion von 150µg unseres Proteins und färbten die Zellen mit Antikörpern gegen CD11b, einen Makrophagenmarker, der aber auch auf PMN exprimiert ist, und anti-Gr-1, einen Marker für Granulozyten. In Abbildung 4.5 sieht man, dass die Population von Zellen, die sowohl CD11b, als auch Gr-1 exprimieren, stark ansteigt. Diese doppelt positiven Zellen waren F4/80 und CD11c negativ (Abb.4.5) und waren in den Bauchhöhlen der Kontrollmäuse nur in sehr geringer Menge zu finden. Um die einwandernden Zellen auch morphologisch zu charakterisieren, färbten wir die Zellen mit einer Giemsa-Färbung. Hier sah man deutlich, dass die Zellen im Mikroskop eindeutig die Morphologie von PMN aufwiesen. Somit induziert chlamydiales HSP60 die Einwanderung von PMN in die Bauchhöhle (Abb. 4.5). In einem weiteren Expe-

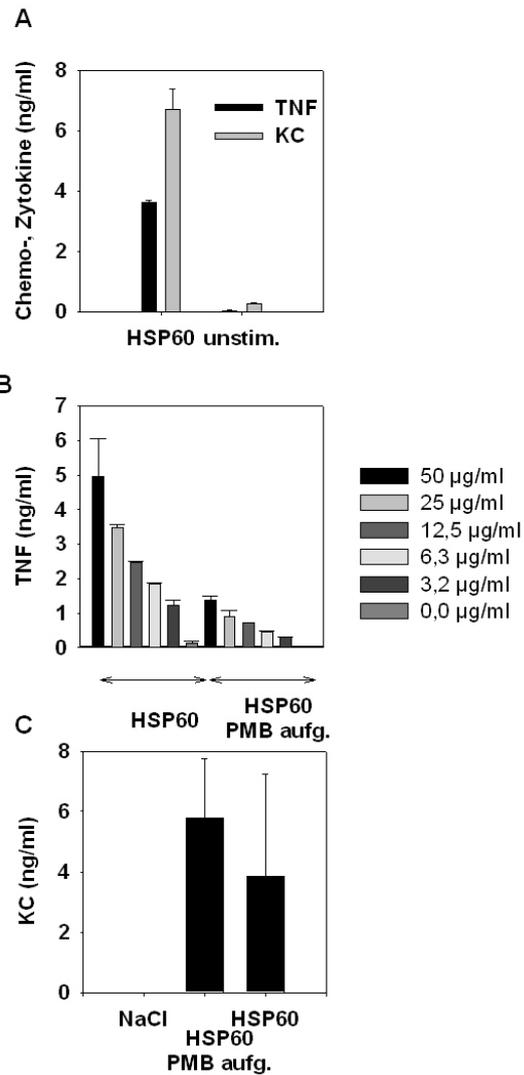


Abbildung 4.4. A: Peritonealzellen von C57BL/6 Mäusen wurden kultiviert (150.000/well in 96er Platte) und mit HSP60 (15µg/ml) stimuliert. Nach 20 Stunden Kultur wurden die Überstände auf TNF und KC getestet.

B: RAW264.7 Zellen (3×10^4 Zellen/well in 96er Platte) wurden mit HSP60 stimuliert, das entweder über die Polymyxin B Säule aufgereinigt wurde, oder ohne PolB Aufreinigung verwendet wurde. Nach 20 Stunden wurde der Überstand entnommen und auf TNF getestet.

C: C57BL/6 Mäuse wurden mit Polymyxin B aufgereinigtem HSP60 (150µg/Maus) intraperitoneal injiziert. Als Kontrolle diente nicht aufgereinigtes HSP60 (150µg/Maus) oder NaCl Lösung. Nach zwei Stunden wurde das Serum auf KC getestet.

riment überprüften wir die Blutzellen auf ihre Zusammensetzung nach peritonealer Injektion von HSP60. Auch hier sahen wir einen deutlichen Anstieg von doppelt positiven Zellen, d.h. Zellen, die sowohl CD11b als auch Gr1 exprimierten, von ca 20% auf 40% (Abb. 4.5). Somit hat man im Blut einen ähnlichen Effekt wie in der Peritonealhöhle. Um zu sehen, ob andere PAMP auch eine Einwanderung von PMNs induzierten, testeten wir das CpG Oligonukleotid 1668, das TLR9- und MyD88-abhängig das Immunsystem aktiviert. Es induzierte zwar, verglichen mit HSP60, höhere Konzentrationen von KC im Blut, jedoch war die Anzahl der PMN, die in die Bauchhöhle einwanderten, bei den mit 1668, einem stimulierenden Oligonukleotid, behandelten Mäusen deutlich geringer als bei den mit HSP60 injizierten Mäusen (Abb. 4.6). Auch die Injektion von LPS, das TLR4-abhängig stimuliert, zeigte einen hohen Anstieg an KC, jedoch auch einen weitaus geringeren Anstieg an PMN in der Bauchhöhle (Abb. 4.6).

4.3 CHLAMYDIALES HSP60 WIRD DURCH TLR2 UND TLR4 *in vivo* ERKANNT

In der wissenschaftlichen Literatur wird eine TLR-Abhängigkeit der HSP60-Stimulation *in vitro* diskutiert. Hierbei zeigen Ergebnisse aus unserem Labor TLR2- und TLR4-abhängige Stimulation von dendritischen Zellen *in vitro*. Ob diese Abhängigkeit auch *in vivo* existiert, ist bisher nicht beschrieben worden. Um unser Modell der HSP60-Wirkung im Mausmodell zu testen, bedienten wir uns verschiedener genetisch veränderter Mäuse. Zum einen verwendeten wir Mäuse mit einer Punktmutation im TLR4-Gen, die zu einem defekten Protein führt. Zum anderen benutzen wir TLR2-defiziente Mäuse. Um die HSP60-abhängige Stimulation in Mäusen zu untersuchen, die weder einen funktionsfähigen TLR2 noch TLR4 zu haben, wurden Mäuse beider Stämme verpaart und eine doppelt defiziente Maus gezüchtet.

Die Injektion von HSP60 in diese doppelt defizienten Mäuse zeigte, dass der KC-Serumspiegel wie bei Wildtyptieren erhöht wurden. Ebenso wurden PMN effizient in die Peritonealhöhle rekrutiert. Auch bei TLR4-defizienten Mäusen sahen wir nur leichte Unterschiede zu den Wildtypmäusen (Abb. 4.7). Die Injektion von HSP60 in doppelt defiziente Mäuse zeigte, dass diese Mäuse anders reagierten. Die KC-Konzentrationen im Blut wurden nicht erhöht und die Zusammensetzung der Peritoneallavagezellen wurde nicht verändert. Somit ist der in Wildtyp-Mäusen gezeigte Effekt nicht vorhanden. Um auch hier die Kontaminationskomponente unseres Proteins möglichst gering zu halten, injizierten wir auch hier HSP60, das zuvor über

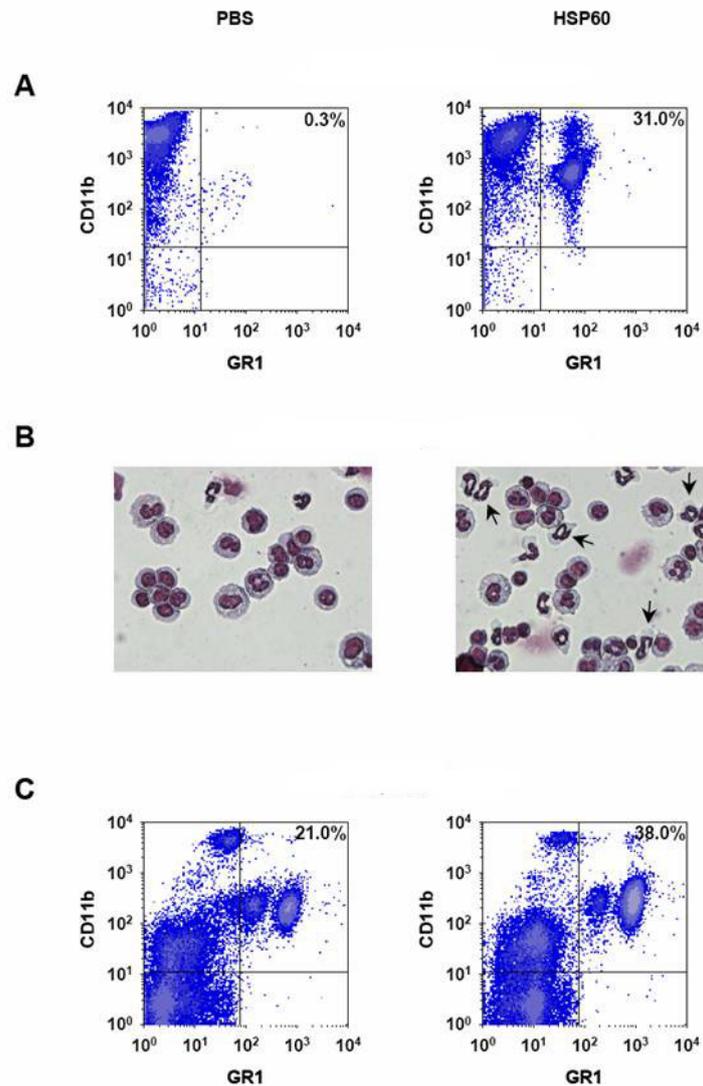


Abbildung 4.5. A: C57BL/6 Mäusen wurde Polymyxin B aufgereinigtes HSP60 ($150\mu\text{g}/\text{Maus}$) oder PBS injiziert. Nach zwei Stunden wurden die Mäuse getötet, und eine Peritoneallavage wurde durchgeführt. Die Peritonealzellen wurden mit FITC-gefärbtem anti-GR1 und APS gefärbtem anti-CD11b gefärbt oder mit FITC-gefärbtem anti-F4/80 und APC-gefärbtem anti-CD11b. Die Zellen wurden im FACS analysiert.

B: Die Durchführung erfolgte wie in A. Die Peritonealzellen wurden auf Objektträger fixiert und mit Giemsa gefärbt. Die Pfeile zeigen neutrophile Granulozyten an.

C: Die Durchführung erfolgte wie in A. Nach zwei Stunden wurde den Mäusen EDTA-Blut abgenommen, die Zellen wurden auch mit anti-GR1 und anti-CD11b gefärbt und im FACS analysiert.

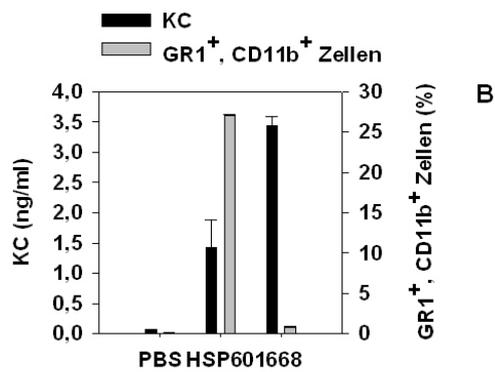
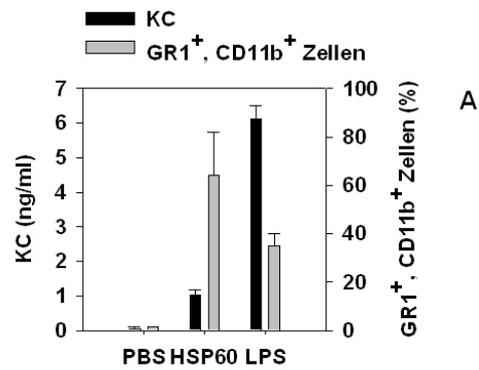


Abbildung 4.6. A: In C3H/HeN Mäuse wurde chlamydiales HSP60 (150µg/Maus), LPS (1µg/Maus) oder PBS injiziert. Nach zwei Stunden wurden die Mäuse getötet, das Serum wurde auf KC getestet und die Peritonealzellen mit anti-GR1 und anti-CD11b angefärbt.

B: In C57BL/6 Mäuse wurde chlamydiales HSP60 (150µg/Maus), das Oligonukleotid 1668 (1µmol/Maus) oder PBS injiziert. Nach zwei Stunden wurden die Peritonealzellen analysiert und der KC Gehalt im Serum bestimmt.

eine PMB-Säule aufgereinigt worden war (Abb. 4.8). Die doppelt defizienten Mäuse zeigten keine oder fast keine Reaktion auf das aufgereinigte Protein, während die Mäuse, denen nur ein funktionsfähiger TLR₄ fehlte, sowohl bei der Induktion von KC, als auch bei der Immigration von PMN ins Peritoneum ähnlich reagierten wie die Wildtypmäuse. Somit scheint Endotoxin, das TLR₄-abhängig erkannt wird, in unserem Modell keine Rolle zu spielen. Diese Ergebnisse weisen auf ein Zusammenspiel von sowohl TLR₂ als auch TLR₄ beim Erkennen von HSP60 hin. Demnach wird HSP60 möglicherweise *in vitro* ähnlich wie *in vivo* erkannt.

4.4 HSP60-INDUZIERTE VERÄNDERUNGEN *in vivo* SIND MYD88-ABHÄNGIG

MyD88 ist ein Molekül, das eine wichtige Rolle in der Signalkaskade vieler TLR spielt (43). Da wir eine TLR₂- und TLR₄-abhängige Stimulation durch chlamydiales HSP60 zeigen konnten, war eine Abhängigkeit von MyD88 als zentralem Faktor in der Aktivierung wahrscheinlich. Um dies zu untersuchen, wurden MyD88 knock-out Mäuse verwendet. Wie in den vorherigen Experimenten maßen wir nach Injektion von 150µg HSP60 die KC-Konzentration im Serum und den Einstrom von PMN in die Bauchhöhle. Wir sahen, dass die KC-Spiegel im Serum nicht erhöht wurden, es jedoch einen Einstrom von PMN in die Bauchhöhle gab, der zwar nicht so stark wie bei den Wildtypmäusen war, jedoch deutlich über dem unserer Negativkontrolle lag (Abb. 4.7). Dies zeigt, dass die Antworten der Maus auf die Stimulation mit HSP60 wenigstens in Teilen MyD88-abhängig ist.

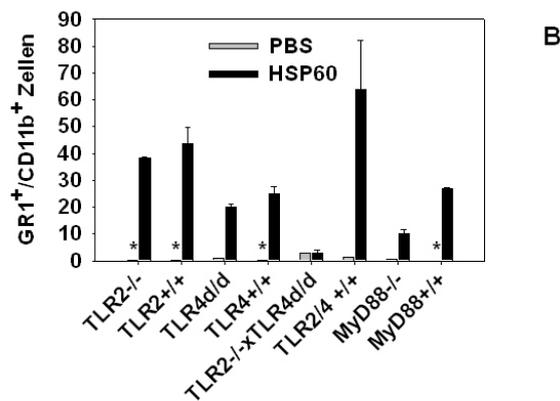
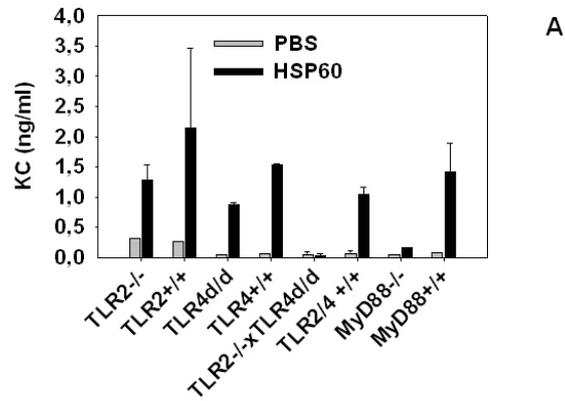


Abbildung 4.7. TLR2 knock-out Mäusen, TLR4 defizienten Mäusen und Mäusen mit beiden Defiziten sowie MyD88 knock-out Mäusen wurde chlamydiales HSP60 ($150\mu\text{g}/\text{Maus}$) injiziert, als Kontrolle diente PBS. Nach zwei Stunden wurde das Serum auf KC untersucht (A) und die Peritonealzellen wurden analysiert (B). Der Hintergrund der Mäuse war C₅₇BL/6 bei TLR2 und MyD88 knock-out Mäusen, bei TLR4 und den doppelt defizienten Mäusen war dies C₃H/HEN bzw. C₃H/HEJ. * : nicht nachweisbar

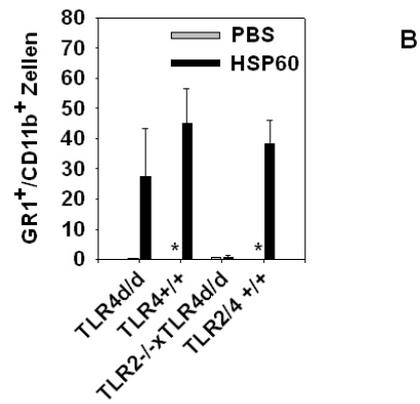
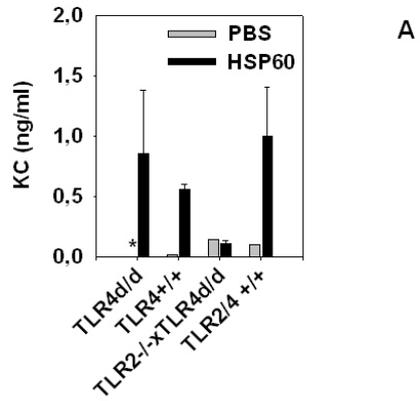


Abbildung 4.8. TLR₄ defizienten Mäusen und TLR₂ und TLR₄ defizienten Mäusen wurde chlamydiales HSP60 (150µg/Maus) oder PBS intraperitoneal injiziert. Nach zwei Stunden wurde KC im Serum gemessen (A) und die Peritonealzellen analysiert (B). * : nicht nachweisbar

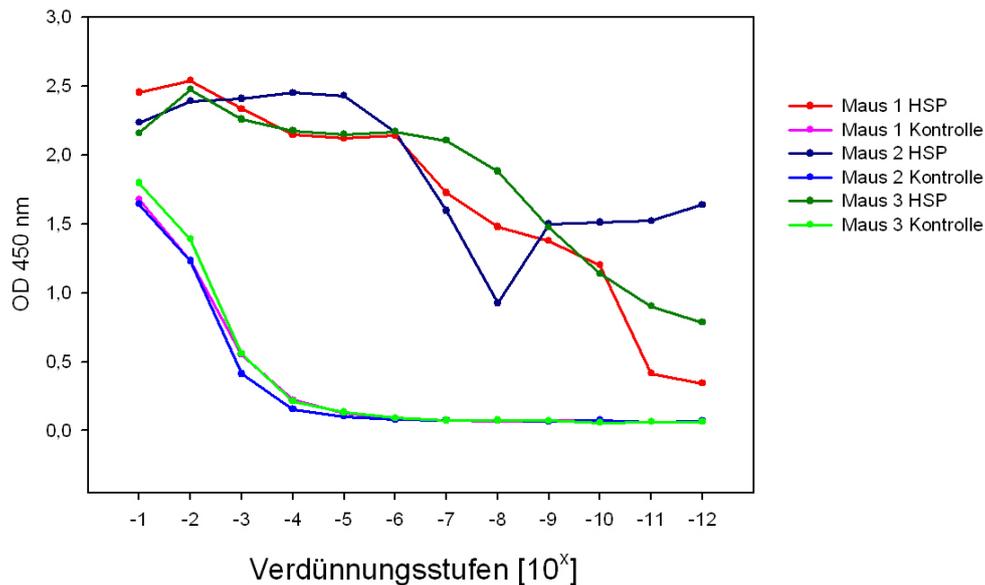


Abbildung 4.9. Balb/c Mäuse wurden zweimal mit chlamydialem HSP60 (100µg), 10mmol CpG 1668 und 100µl Alum im Abstand von vier Wochen immunisiert. Nach weiteren vier Wochen wurden den Mäusen Blut abgenommen und Serum gewonnen. Dies wurde auf mit HSP60 oder OVA als Kontrollprotein beschichteten Platten gegeben und auf Bindung getestet.

4.5 HERSTELLUNG EINES ANTIKÖRPERS GEGEN CHLAMYDIALES HSP60

Wir konnten bisher zeigen, dass das Protein HSP60 immunstimulatorisch ist. Um dies auch *in vivo* sicher auf HSP60 zurückzuführen, beabsichtigten wir, monoklonale Antikörper herzustellen, die chlamydiales HSP60 in nicht denaturiertem Zustand erkennen, und mit deren Hilfe chlamydiales HSP60 zu depletieren. Da für diese Fragestellung kein kommerziell verfügbarer Antikörper vorlag, stellten wir entsprechende monoklonale Antikörper selbst her. Dazu wurden drei Balb/c Mäuse mit rekombinantem HSP60 und einer Adjuvansmischung aus CpG Oligonukleotiden und Aluminiumhydroxid immunisiert (siehe Kapitel 3). Nach der zweiten Immunisierung wurde den Mäusen Blut abgenommen, hieraus Serum gewonnen und dies auf seine Bindung an auf Platten fixiertes HSP60 analysiert (Abb. 4.9).

Da Maus No. 3 am besten immunisiert zu sein schien, wurde die Fusion mit der Milz dieser Maus durchgeführt. Nach dem Wachsen der Klone wurden diese jeweils

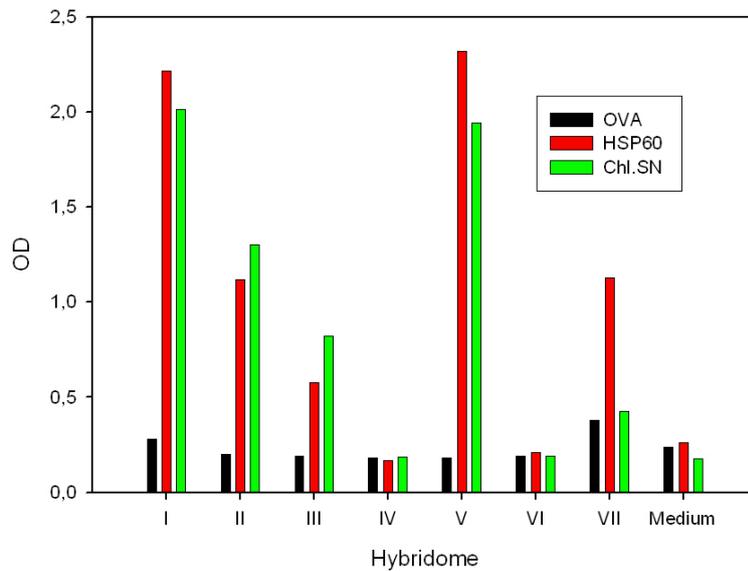


Abbildung 4.10. Die Überstände der Hybridome wurden unverdünnt auf mit HSP60 oder OVA als Kontrollprotein beschichteten Platten gegeben und auf Bindung getestet.

in einem speziellen ELISA getestet, um zu überprüfen, ob die sezernierten Antikörper spezifisch für HSP60 waren. Diese Klone wurden dann subkloniert, um sicherzugehen, dass man einen monoklonalen Antikörper erhält. Auch diese Subklone wurden erneut getestet. Wie man in der Abbildung 4.10 sieht, erhielten wir insgesamt sieben verschiedene Subklone, die im ELISA in vier Fällen spezifisch HSP60 erkannten.

Bei der Testung der Isotypen fanden wir fünf IgG₁, einmal IgM und einmal konnte der Isotyp nicht genau ermittelt werden.



Abbildung 4.11. Western Blot, auf dem HSP60 aufgetragen wurde (10ng/Bahn). Als Erstantikörper wurden die Zellkulturüberstände der Hybridome genommen (Inkubation unverdünnt zwei Stunden bei Raumtemperatur), als Zweitantikörper wurde ein biotinylierter anti-mouse Antikörper verwendet.

NR	ISOTYP
I	IgG ₁
II	IgG ₁
III	IgG ₁
IV	IgM
V	IgG ₁
VI	kein Isotyp, nur kappa Bande
VII	IgG ₁

Die Dominanz von IgG₁ kann durch eine Induktion einer TH₂ Antwort durch Aluminiumhydroxid erklärt werden. Dies ist bereits beschrieben worden. In einem Western Blot, in dem HSP60 denaturiert aufgetragen wurde und als Erstantikörper der Zellüberstand der Klone diente, konnten wir zeigen, dass die Klone I, II, III, V und VII denaturiertes HSP60 erkennen konnten (Abb. 4.11).

Um eine mögliche blockierende Wirkung der Antikörper zu zeigen, gaben wir den Überstand der Klone auf mit HSP60 oder einem Überstand von infizierten Zellen auf dendritische Zellen. Der Überstand der dendritischen Zellen wurde nach 20 Stunden auf KC getestet. Hierbei zeigte sich eine partielle Blockade der KC-Sekretion und Stimulation mit HSP60 (Abb. 4.12).

Die Aufreinigung der Antikörper I und VII erfolgte über eine Protein G Säule, wie im Teil Methoden beschrieben (siehe Kapitel 3). Die so aufgereinigten Antikörper wurden erneut auf ihre Interaktion mit HSP60 getestet. Sie detektierten HSP60 im ELISA und konnten auch HSP60 im Western Blot nachweisen. In ersten Experimenten in einer *in vitro*-Situation konnte der Antikörper jedoch keine neutralisierende Wirkung von HSP60 zeigen, d.h. auf dendritischen Zellen unterschied sich nach Stimulation mit HSP60 die Menge an KC nicht, wenn im Zellmedium ebenfalls An-

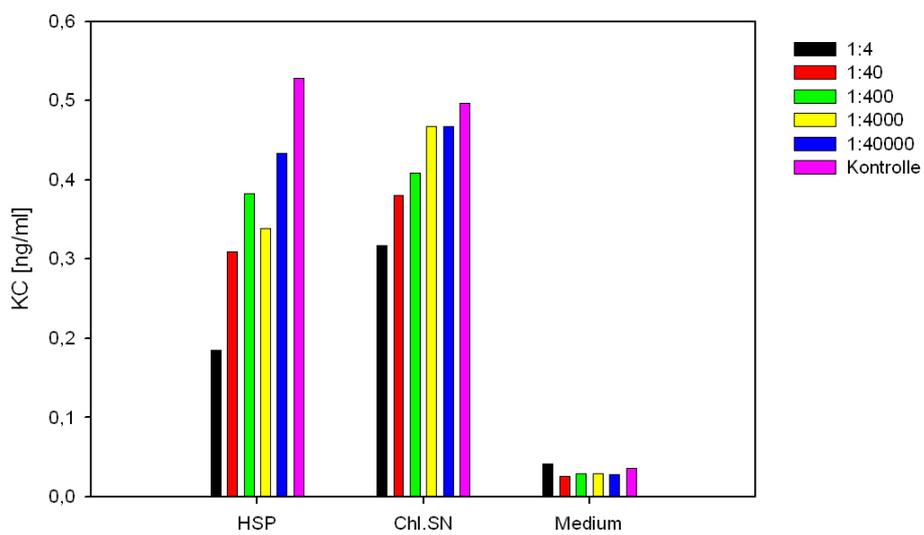


Abbildung 4.12. Dendritische Zellen, die aus Knochenmark differenziert wurden, wurden am Tag 7 umgesetzt (100.000/well in 96er Platte) und mit HSP60 (10 µg/ml) stimuliert. Der Zellüberstand des Hybridoms Nummer VII wurde in verschiedenen Konzentrationen ins Medium gegeben. Angefangen wurde mit einer Verdünnung von 1:4, dann wurde der Überstand jeweils wieder 1:10 verdünnt bis zu einer Endverdünnung von 1:40.000. Nach 20 Stunden wurde der Überstand entnommen und auf die Menge des Chemokins KC bestimmt.

tikörper vorhanden war.

Wir überprüften auch, ob eine Antikörper/ HSP60 Komplexierung im Vergleich zu freiem HSP60 eine veränderte Reaktion des Immunsystems bewirkte. Dies war nicht der Fall, da die KC-Induktion oder die Einwanderung von PMN in die Bauchhöhle nicht verändert war. Zusammenfassend bleibt festzustellen, dass unsere Antikörper bisher noch keine neutralisierende Wirkung *in vitro* oder *in vivo* gezeigt haben, obwohl einige der Antikörper HSP60 im Western Blot und auch im ELISA erkennen.

5.1 CHLAMYDIALES HSP60 ALS PAMP

Grundlage dieser Arbeit sind die Untersuchungen über den potenziellen Zusammenhang zwischen Chlamydieninfektion und Atherosklerose. Es wurde postuliert, dass chlamydiales HSP60 eine Rolle in der Entwicklung von Atherosklerose spielt. Es soll, möglicherweise zusammen mit endogenem HSP60, entzündliche Prozesse unterhalten, die die Plaquebildung unterstützen (29). Es gibt allerdings bis heute keine endgültig beweisenden Daten, die diesen Zusammenhang sichern, sondern nur Hinweise auf einen möglichen Zusammenhang. Welcher Faktor von *Chlamydia pneumoniae* möglicherweise die fibroproliferativen Reize auslöst, die bei der Entstehung der Artherosklerose eine Rolle spielen, ist ebensowenig geklärt. Chlamydiales HSP60 wurde zusammen mit humanem, also endogenem HSP60 in menschlichen Atheromen gefunden; sie induzieren beide TNF- α und induzieren Matrixmetalloproteinasen, wenn sie *in vitro* Makrophagen stimulieren (29).

Da in vielen Patienten Antikörper gegen chlamydiales HSP60 gefunden wurde, und seine immunstimulatorische Potenz *in vitro* schon in anderen Publikationen gezeigt wurde, erschien es uns wichtig, uns mit der immunstimulatorischen Potenz von chlamydialem HSP60 *in vivo* zu beschäftigen. In unserem Modell haben wir jedoch nicht atherosklerotische Veränderungen untersucht, sondern die allgemeine Immunantwort. Wenn es zu einer Antikörperbildung gegen chlamydiales HSP60 kommt, muss dieses vorher das angeborene Immunsystem aktivieren, das heißt, es muss als fremd oder gefährlich erkannt werden. Bereits beschrieben wurde, dass sich auch lösliches endogenes HSP60 im Serum von atherosklerotischen Patienten befindet. Es kommt jedoch auch zu einer Antikörperbildung gegen endogenes, also humanes

HSP60 bei atherosklerotischen Patienten (73),

Humanes HSP60 zeigt starke Homologien mit chlamydialem HSP60, bei beiden wurde gezeigt, dass sie *in vitro* Zellen des angeborenen Immunsystems stimulieren (69) (7). Möglicherweise werden bei einer entzündlichen Reaktion wie Atherosklerose größere Mengen normalerweise intrazellulären Heat Shock Proteins frei und dies wird dann vom Körper als Gefahrensignal gewertet. Falls HSP60 *in vivo* proinflammatorische Eigenschaften hat, stellt sich sofort die Frage, wie chlamydiales HSP60 vom Organismus erkannt wird.

Da HSP60 von essentieller Bedeutung für alle Organismen ist, ist es nicht möglich, HSP60 einfach durch einen knock-out zu beseitigen. Bei *Escherichia coli* ist dies versucht worden, doch ist diese genetische Veränderung letal für die Bakterien (8). Die Möglichkeit, genetisch veränderte Chlamydien zu verwenden, die kein HSP60 haben, scheidet somit aus. Um große Mengen dieses Proteins zu erhalten, ist die beste Möglichkeit, dies rekombinant von Bakterien wie *E. coli* herstellen zu lassen und dann aufzureinigen. Dieses bringt zwar auch einige Unsicherheiten mit sich, wie zum Beispiel mögliche Kontaminationen durch *E. coli* Proteine oder eine nicht natürliche Faltung des Proteins; es ist jedoch nur sehr schwer möglich, von Chlamydien selbst produziertes HSP60 aufzureinigen. Chlamydien wachsen intrazellulär, somit besteht die Gefahr der Proteinkontamination durch die Wirtszelle, falls man es aus eukaryoten Zellen aufreingt. Das Benutzen von rekombinantem HSP60 ist also in unserem Fall eine gute Möglichkeit, genügend Protein für *in vivo* Versuche zu bekommen. Durch die weitere Aufreinigung über die PMB-Säule ist die LPS-Kontamination als sehr gering anzusehen. Wir konnten zeigen, dass die TNF Produktion von dendritischen Zellen nach Stimulation mit HSP60 stark abnimmt, nachdem dies über die PMB-Säule weiter aufgereinigt worden war. Da dendritische Zellen sehr sensibel auf LPS reagieren, bedeutet dies eine geringe Kontamination des Proteins. Wir gehen daher davon aus, dass unsere Effekte durch chlamydiales HSP60 selbst induziert wurden, und es somit ein PAMP ist.

5.2 CHLAMYDIALES HSP60 INDUZIERT KC UND EINE EINWANDERUNG VON PMN IN DIE BAUCHHÖHLE

Ein wichtiges Ergebnis dieser Arbeit ist der Befund, dass die intraperitoneale Gabe von chlamydialem HSP60 die KC-Spiegel erhöht sowie eine massive Einwanderung von PMN in die Bauchhöhle induziert.

In der Peritonealhöhle ist das Erkennen von PAMP sehr wichtig, da es hier, z. B. durch Verletzungen oder Durchwanderungen aus dem Darm, zu einer bakteriellen Infektion kommen kann und diese schnell lebensgefährlich werden kann, wenn es zu einer Peritonitis kommt. In diesem Bereich gibt es viele Zellen des angeborenen Immunsystems, wie z.B. Makrophagen, Mastzellen und dendritische Zellen, die dafür sorgen, dass Bakterien und bakterielle Bestandteile schnell erkannt und beseitigt werden können. Durch chlamydiales HSP60 wird dieses Wächtersystem aktiviert, es wird somit als ein potenziell gefährlicher Bakterienbestandteil erkannt.

Wir konnten zeigen, dass es im Vergleich zu anderen PAMP wie LPS und Oligonukleotiden selbst bei gleicher KC-Induktion nicht zu einer massiven Immigration von PMN kommt. Wir haben hier versucht, möglichst biologisch äquivalente Dosen der jeweiligen PAMP zu benutzen. Die starke Wirkung von HSP60 auf die KC-Produktion könnte im Falle einer Infektion mit *Chlamydia pneumoniae* von Wichtigkeit sein. In einer *in vivo*-Situation, in der Mäuse mit *Chlamydia pneumoniae* intranasal infiziert wurden, konnte gezeigt werden, dass die lokale Produktion von KC stark ansteigt, was zu einem Einstrom von Granulozyten in die Lunge führt (57). Dieser Einstrom ist eine wichtige Komponente in der Immunreaktion der Maus auf eine *Chlamydia pneumoniae*-Infektion. Es könnte somit möglich sein, dass die KC-Induktion in einem Infektionsmodell vor allem an der immunstimulatorischen Wirkung von HSP60 liegt. Da es momentan keinen Antikörper gibt, der freies chlamydiales HSP60 *in vivo* neutralisiert, ist es nicht möglich, dies experimentell nachzuweisen. Zudem wird chlamydiales HSP60 zuerst möglicherweise intrazellulär frei und stimuliert zunächst dort die Zellen. Es wurde jedoch auch schon gezeigt, dass HSP60 von Endothelzellen der Aorta präsentiert wurde (74); auch von anderen Zelltypen wurde berichtet, dass sie HSP60 auf ihrer Oberfläche präsentieren können. Dies könnte bedeuten, dass unter bestimmten Umständen HSP60 nicht nur in der Zelle, sondern auch auf ihrer Oberfläche vorliegt und in die Umgebung abgegeben werden könnte.

Wir wissen von vielen anderen PAMP, wie z.B. Endotoxin oder bakterieller DNA, dass sie *in vivo* das angeborene Immunsystem unter anderem zur TNF-Sekretion induzieren (4) (63), und dass HSP60 dies *in vitro* bewirken kann (7). Wir erwarteten daher, dass das chlamydiale HSP60 auch *in vivo* TNF induziert, und sich somit ähnlich zu den oben beschriebenen anderen PAMP verhält. Dass nach intraperitonealer, subkutaner oder intravenöser Applikation des Proteins kein TNF detektierbar war, war somit sehr überraschend. Auch die Induktion von IL-12p40 war deutlich geringer als erwartet. Da wir wissen, dass sowohl chlamydiales, als auch humanes HSP60

in vitro immunstimulatorisch ist (6g) und ähnliche Signalwege benutzt werden, nehmen wir an, dass chlamydiales und humanes HSP60 sich funktionell sehr ähnlich sind. Daher ist es möglicherweise sogar von Vorteil, dass endogenes humanes HSP60 nicht die TNF-Sekretion stimuliert, da dies auch zu potenziell gefährlichen systemischen Immunantworten führen könnte.

Man kann die Diskrepanz der *in vitro*- und *in vivo*-Versuche die TNF-Produktion betreffend auch durch kontaminierende Substanzen erklären, da die weitere Aufreinigung über die PMB Säule zu einer deutlichen Reduktion der TNF Produktion *in vitro* geführt hat. Wir können somit zum Teil Gao et al. bestätigen, die gezeigt haben, dass die stimulatorische Komponente von HSP60 Präparationen, die bei Raw Makrophagen zur TNF Sekretion führt, auf Endotoxinkontaminanten zurückzuführen ist (9).

Die mögliche Endotoxinkontaminante des Proteins scheint in der *in vivo*-Situation keine Rolle zu spielen, da PMB-Aufreinigung zu keiner Änderung in unseren Messparametern KC-Produktion und Einwanderung von PMN führt. Dies kann verschiedene Ursachen haben. Möglicherweise wird die Kontaminante in der *in vivo*-Situation so stark verdünnt, dass diese in der Immunantwort keine Rolle mehr spielt. Es ist auch möglich, dass eine andere kontaminierende Substanz eine Rolle spielt, die wir nicht durch PMB Säulen entfernen können. Wir wissen nicht, ob HSP60, das aus Chlamydien selbst aufgereinigt wurde, stimulatorisch wirkt, da dies technisch sehr aufwändig ist. Eine aktuelle Publikation zeigt, dass HSP60 aus *Helicobacter pylori* in der Lage war, IL-6 Sekretion in Makrophagen zu induzieren. Die beobachtete IL-6 Sekretion wurde von HSP60 des Bakteriums induziert, da der Proteinextrakt nach Depletion von HSP60 Makrophagen nicht mehr stimulieren konnte (12). Dieser Ansatz könnte möglicherweise bei der weiteren Erforschung von chlamydialem HSP60 genutzt werden.

5.3 ERKENNUNG VON HSP60 DURCH TOLL-LIKE REZEPTOREN UND MYD88

Wir wollten ferner zeigen, über welche Mechanismen chlamydiales HSP60 *in vivo* als PAMP erkannt wird. Habich et al. (15) publizierten, dass humanes HSP60 an einen spezifischen Rezeptor bindet, der sich von dem für HSP70 und anderen Heat Shock Proteinen unterscheidet. Dieser Rezeptor konnte jedoch noch nicht genauer beschrieben werden, und es wurde noch nicht untersucht, ob er auch für chlamydiales HSP60 wichtig ist. Unser chlamydiales HSP60 bindet somit möglicherweise an einen

spezifischen Rezeptor, signalisiert aber über die TLRs. Die Toll-like Rezeptoren spielen in der Erkennung von bakteriellen Bestandteilen eine zentrale Rolle, und eine TLR Abhängigkeit von chlamydialem HSP60 konnte *in vitro* schon gezeigt werden (7). Uns hat in diesem Falle interessiert, ob das TLR-System für die Erkennung von chlamydialem HSP60 *in vivo* von Bedeutung ist. Mäuse, die kein funktionsfähiges TLR2 oder TLR4 haben, zeigten in unserem Experimentalmodell ähnlich starke Reaktionen, was KC- Induktion oder PMN-Einstrom betrifft. Erst in einer Maus, in der weder TLR2 noch TLR4 funktionsfähig waren, konnten wir sehen, dass hier die Immunreaktion stark abgeschwächt war. Da die einfachen Knock-out Mäuse fast normal reagiert haben, scheint TLR2 und TLR4 hier *in vivo* redundant zu funktionieren. Die Erkennung eines PAMP durch zwei TLR ist prinzipiell möglich. Für triacylierte Lipoproteine konnte gezeigt werden, dass sie durch ein Heterodimer von TLR1 und TLR2 erkannt werden (67), während das diacylierte mycoplasma-le macrophage-activating lipoprotein-2kD von einem Heterodimer aus TLR2 und TLR6 erkannt wird (66). In beiden Fällen kooperieren die beiden TLRs bei der Erkennung des Lipoproteins. Eine solche Kooperation ist von TLR2 und TLR4 nicht bekannt. Interessanterweise wird diese doppelte Abhängigkeit nicht durch die Aufreinigung von HSP60 über die PMB-Säulen verändert, obwohl diese Aufreinigung den Anteil von LPS, einen TLR4 Agonisten, deutlich vermindern sollte. Dies könnte bedeuten, dass HSP60 selbst auch über TLR4 signalisiert, wie auch von anderen Gruppen schon gezeigt wurde (15)

Wir wissen, dass TLR2 und TLR4 mit zwei intrazellulären Adaptermolekülen interagieren, das sind MyD88 und TIRAP (75). Der Signalweg aktiviert letztlich NF κ B, das dann im Zellkern an spezifische DNA Sequenzen bindet und die Immunantwort einleitet. Unsere Ergebnisse zeigen, dass sowohl die Induktion von KC, als auch die Einwanderung von neutrophilen Granulozyten MyD88-abhängig ist. MyD88-defiziente Mäuse zeigen jedoch immer noch eine gewisse Einwanderung von PMNs in die Bauchhöhle, während dies bei TLR2/TLR4-defizienten Mäusen nicht nachweisbar war. Dies könnte bedeuten, dass die Akkumulation von PMNs nur teilweise MyD88-abhängig ist. Wir wissen, dass TLR4 unabhängig von MyD88 die Zelle aktivieren kann, und zwar über TICAM-1 (52). Eine TLR2 Aktivierung ist jedoch bisher immer als MyD88-abhängig beschrieben worden (18). Möglicherweise spielt TLR4 in der MyD88-unabhängigen Akkumulation von PMN in die Bauchhöhle eine wichtige Rolle. Somit sollte in einer Maus, in der weder TLR4 noch MyD88 funktionell aktiv sind, die Rekrutierung von PMN vollkommen aufgehoben sein.

In der Literatur wurde jedoch auch gezeigt, dass HSP60 aus anderen Spezies Zellen möglicherweise Toll-like Rezeptor unabhängig stimuliert. Zum Beispiel ist die IL-6 Sekretion von Makrophagen nach Stimulation mit HSP60 von *H. pylori* unabhängig von TLR₂, TLR₄ und MyD88 (12).

Insgesamt beobachten wir eine Immunantwort auf chlamydiales HSP60, die *in vivo* klar abgrenzbar von Immunantworten auf Endotoxine, Lipopeptide oder bakterieller DNA ist. Diese anderen PAMP induzieren in jedem Fall die Sekretion von TNF (4) (63) (76), während wir in unserem *in vivo* Modell nach HSP60-Gabe keine TNF-Sekretion sehen konnten. HSP60 induziert also in unserem Modell eine sehr spezielle, einzigartige Art der Immunantwort, die so bisher noch nicht gezeigt werden konnte.

5.4 ANTIKÖRPER GEGEN HSP60

Mit der Entwicklung eines HSP60-spezifischen Antikörpers sollte ein neues Werkzeug zur Untersuchung der immunstimulierenden Funktion des Proteins hergestellt werden. Die entwickelten Antikörper sind spezifisch für HSP60 und erkennen seine natürliche und denaturierte Form. In den Experimenten hat sich gezeigt, dass die Neutralisierung der HSP60 Wirkungen nicht wie gewünscht funktioniert. Wir wollten eine Neutralisierung der HSP60 Wirkungen *in vitro* und *in vivo* erreichen und damit zeigen, dass die stimulierende Wirkung spezifisch blockierbar ist. Nach zunächst ermutigenden Experimenten mit einem Überstand des Hybridoms und der Testung auf dendritische Zellen (siehe Abb. 4.12), zeigten die Untersuchungen mit aufgereinigtem Antikörper diesen Aspekt nicht mehr. Daher kann der Antikörper alleine nicht, wie erhofft, zeigen, dass die Immunantwort durch HSP60 auf dem Protein selbst beruht. Mögliche Kontaminanten, die in rekombinant hergestelltem HSP60 vorhanden sind, könnten nicht nur, wie von Gao (9) beschrieben, Endotoxine sein, sondern auch andere Bestandteile der Bakterien, wie z.B. Lipoteichonsäure. Um sicherzugehen, dass auch von Chlamydien selbst hergestelltes HSP60 das Immunsystem stimuliert, müsste dies aus dem Überstand von mit Chlamydien infizierten Zellen aufgereinigt werden. Nur hier kann man sich sicher sein, dass keine nicht-chlamydialen bakteriellen Komponenten eine Immunantwort induzieren können. Somit sollte in diesem Bereich versucht werden, mit Hilfe der hergestellten Antikörper HSP60 in chlamydialem Überstand zu binden. Möglicherweise kann dann zweifelsfrei gezeigt werden, dass chlamydiales HSP60 oder ein Komplex aus HSP60 und einer weiteren Komponente ein immunstimulatorisches PAMP ist.

ZUSAMMENFASSUNG

Die Mitwirkung von *Chlamydia pneumoniae* bei der Entstehung der Artherosklerose wird bereits seit längerem diskutiert, dabei wurde bei Heat shock protein 60 von *Chlamydia pneumoniae* stets eine Induktion inflammatorischer Prozesse und eine Freisetzung von Zytokinen wie TNF und IL-12p40 beschrieben. Obwohl HSP60 in atheromathösen Plaques gefunden wurde, war seine stimulatorische Potenz *in vivo* unklar. Nachdem das HSP60 über eine Polymyxin B Säule aufgereinigt wurde, konnte es *in vitro* deutlich weniger TNF induzieren als vorher. Das aufgereinigte HSP60 hat jedoch nach intraperitonealer Gabe zu einer erhöhten Serumkonzentration von KC und MIP₂, nicht jedoch von TNF *in vivo* geführt. Gleichzeitig zeigte sich, dass das Protein eine Einwanderung von PMN in die Bauchhöhle bewirkt. Dieser Influx war bei HSP60 sehr viel stärker als bei Endotoxingabe oder bei der Gabe des CpG Oligonucleotides 1668. Diese Antworten auf HSP60 Injektion verschwinden bei Mäusen, die TLR₂ und TLR₄ defizient sind, fast völlig, während Mäuse, die TLR₂- oder TLR₄-defizient sind, fast normal reagieren. Auch wurde gezeigt, dass die Zytokinsekretion und der Influx MyD88-abhängig ist. *In vivo* zeigt HSP60 TLR₂ und TLR₄ sowie MyD88-abhängig verschiedene Immunantworten, die sich von der Endotoxin- oder CpG-induzierten Antwort unterscheiden.

SUMMARY

Heat shock protein 60 (HSP60) from *Chlamydia pneumoniae* was described to trigger *in vitro* inflammatory and cytokine responses including TNF and IL-12p40. Although it can be found in atherosclerotic plaques of patients, the stimulatory potential of chlamydial and other HSP60 *in vivo* is unclear. The data reported here shows that chlamydial HSP60 fails to induce TNF expression *in vivo*. Upon purification of chlamydial HSP60 with polymyxin B-agarose columns, its ability to induce TNF secretion *in vitro* is significantly reduced. However, purified chlamydial HSP60 causes increased serum levels of the CXC chemokines KC and MIP2 but not of TNF *in vivo*, as well as a strong accumulation of PMN in the peritoneal cavity upon intraperitoneal challenge. With respect to PMN accumulation, chlamydial HSP60 is more potent than endotoxin or the CpG oligonucleotide 1668. The responses observed are completely absent in Toll-like receptor (TLR)2/4-double-deficient mice, while single-deficient mice respond almost normally. Furthermore, KC induction and PMN accumulation are largely dependent on MyD88. HSP60 from *C.pneumoniae* triggers inflammatory responses *in vivo* that differ from responses induced by endotoxin or CpG oligonucleotides and are dependent on TLR2 and 4.

LITERATURVERZEICHNIS

- [1] Ahmad-Nejad, P., Hacker, H., Rutz, M., Bauer, S., Vabulas, R. M., Wagner, H., Bacterial CpG-DNA and lipopolysaccharides activate Toll-like receptors at distinct cellular compartments, *Eur J Immunol* 32 (2002) 1958–68
- [2] Alexopoulou, L., Holt, A. C., Medzhitov, R., Flavell, R. A., Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-kappaB by Toll-like receptor 3, *Nature* 413 (2001) 732–8
- [3] Bernheiden, M., Heinrich, J., Minigo, G., Schutt, C., Stelter, F., Freeman, M., Golenbock, D., Jack, R., LBP, CD14, TLR₄ and the murine innate immune response to a peritoneal Salmonella infection, *J Endotoxin Res* 7 (2001) 447–450
- [4] Beutler, B., Milsark, I. W., Cerami, A. C., Passive immunization against cachectin/tumor necrosis factor protects mice from lethal effect of endotoxin, *Science* 229 (1985) 869–71
- [5] Blessing, E., Campbell, L. A., Rosenfeld, M. E., Chough, N., Kuo, C. C., Chlamydia pneumoniae infection accelerates hyperlipidemia induced atherosclerotic lesion development in C57BL/6J mice, *Atherosclerosis* 158 (2001) 13–7
- [6] Chen, W., Syldath, U., Bellmann, K., Burkart, V., Kolb, H., Human 60-kDa heat shock protein: a danger signal to the innate immune system, *J Immunol* 162 (1999) 3212–9
- [7] da Costa, C. P., Kirschning, C. J., Busch, D., Durr, S., Jennen, L., Heinzmann, U., Prebeck, S., Wagner, H., Miethke, T., Role of chlamydial heat shock protein

- 60 in the stimulation of innate immune cells by *Chlamydia pneumoniae*, *Eur J Immunol* 32 (2002) 2460–70
- [8] Fayet, O., Ziegelhofer, T., Georgopoulos, C., The groES and groEL Heat Shock Gene Products of *Escherichia coli* Are Essential for Bacterial Growth at All Temperatures, *J Bacteriol* 171 (1989) 1379–1385
- [9] Gao, B., Tsan, M. F., Recombinant human heat shock protein 60 does not induce the release of tumor necrosis factor alpha from murine macrophages, *J Biol Chem* 278 (2003) 22523–9
- [10] Geijtenbeek, T. B., Van Vliet, S. J., Koppel, E. A., Sanchez-Hernandez, M., Vandenbroucke-Grauls, C. M., Appelmelk, B., Van Kooyk, Y., Mycobacteria target DC-SIGN to suppress dendritic cell function, *J Exp Med* 197 (2003) 7–17
- [11] Ghosh, S., M., K., Missing pieces in the NF-kappaB puzzle, *Cell* 109 (2002) pS81–96
- [12] Gobert, A. P., Bambou, J. C., Werts, C., Balloy, V., Chignard, M., Moran, A. P., Ferrero, R. L., *Helicobacter pylori* heat shock protein 60 mediates interleukin-6 production by macrophages via a toll-like receptor (TLR)-2-, TLR-4-, and myeloid differentiation factor 88-independent mechanism, *J Biol Chem* 279 (2004) 245–50
- [13] Grayston, J. T., Background and current knowledge of *Chlamydia pneumoniae* and atherosclerosis, *J Infect Dis* 181 Suppl 3 (2000) S402–10, 0022-1899
- [14] Grayston, J. T., Kuo, C. C., Campbell, L. A., Benditt, E. P., *Chlamydia pneumoniae*, strain TWAR and atherosclerosis, *Eur Heart J* 14 Suppl K (1993) 66–71
- [15] Habich, C., Baumgart, K., Kolb, H., Burkart, V., The receptor for heat shock protein 60 on macrophages is saturable, specific, and distinct from receptors for other heat shock proteins, *J Immunol* 168 (2002) 569–76
- [16] Hahn, H., Falke, D., Kaufmann, S., Ullmann, U., *Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie*, Springer Verlag, Berlin (2000)
- [17] Harte, M. T., Haga, I. R., Maloney, G., Gray, P., Reading, P. C., Bartlett, N. W., Smith, G. L., Bowie, A., O'Neill, L. A., The poxvirus protein A52R targets Toll-

- like receptor signaling complexes to suppress host defense, *J Exp Med* 197 (2003) 343–51
- [18] Hoebe, K., Du, X., Georgel, P., Janssen, E., Tabet, K., Kim, S. O., Goode, J., Lin, P., Mann, N., Mudd, S., Crozat, K., Sovath, S., Han, J., Beutler, B., Identification of *Lps2* as a key transducer of MyD88-independent TIR signalling, *Nature* 424 (2003) 743–8
- [19] Hogg, J. C., Doerschuk, C. M., Leukocyte traffic in the lung, *Annu Rev Physiol* 57 (1995) 97–114
- [20] Ieven, M. M., Hoymans, V. Y., Involvement of *Chlamydia pneumoniae* in atherosclerosis: more evidence for lack of evidence, *J Clin Microbiol* 43 (2005) 19–24
- [21] Iwaki, D., Mitsuzawa, H., Murakami, S., Sano, H., Konishi, M., Akino, T., Kuroki, Y., The extracellular toll-like receptor 2 domain directly binds peptidoglycan derived from *Staphylococcus aureus*, *J Biol Chem* 277 (2002) 24315–20
- [22] Jiang, Z., Johnson, H. J., Nie, H., Qin, J., Bird, T. A., Li, X., Pellino 1 is required for interleukin-1 (IL-1)-mediated signaling through its interaction with the IL-1 receptor-associated kinase 4 (IRAK4)-IRAK-tumor necrosis factor receptor-associated factor 6 (TRAF6) complex, *J Biol Chem* 278 (2003) 10952–6
- [23] Kalayoglu, M. V., Byrne, G. I., Induction of macrophage foam cell formation by *Chlamydia pneumoniae*, *J Infect Dis* 177 (1998) 725–9
- [24] Kang, T., Chae, G., Detection of Toll-like receptor 2 (TLR2) mutation in the lepromatous leprosy patients, *FEMS Immunol Med Microbiol* 31 (2001) 53–58
- [25] Kaukoranta-Tolvanen, S. S., Ronni, M., T. and Leinonen, Saikku, P., Laitinen, K., Expression of adhesion molecules on endothelial cells stimulated by *Chlamydia pneumoniae*, *Microb Pathog* 21 (1996) 407–411
- [26] Kiechl, S., Lorenz, E., Reindl, M., Wiedermann, C. J., Oberhollenzer, F., Bonora, E., Willeit, J., Schwartz, D. A., Toll-like receptor 4 polymorphisms and atherogenesis, *N Engl J Med* 347 (2002) 185–92

- [27] Kol, A., Bourcier, T., Lichtman, A. H., Libby, P., Chlamydial and human heat shock protein 60 activate human vascular endothelium, smooth muscle cells, and macrophages, *J Clin Invest* 103 (1999) 571–7
- [28] Kol, A., Lichtman, A. H., Finberg, R. W., Libby, P., Kurt-Jones, E. A., Cutting edge: heat shock protein (HSP) 60 activates the innate immune response: CD14 is an essential receptor for HSP60 activation of mononuclear cells, *J Immunol* 164 (2000) 13–7
- [29] Kol, A., Sukhova, G. K., Lichtman, A. H., Libby, P., Chlamydial heat shock protein 60 localizes in human atheroma and regulates macrophage tumor necrosis factor- α and matrix metalloproteinase expression, *Circulation* 98 (1998) 300–7
- [30] Kuo, Chlamydial infections of the cardiovascular system, *Front Biosci* 8 (2003) e36–e42
- [31] Kuo, C., Chi, E., Grayston, J., Ultrastructural study of entry of Chlamydia strain TWAR into HeLa cells, *Infect Immun* 56 (1988) 1668–72
- [32] Kuo, C. C., Puolakkainen, M., Lin, T. M., Witte, M., Campbell, L. A., Mannose-receptor positive and negative mouse macrophages differ in their susceptibility to infection by Chlamydia species, *Microb Pathog* 32 (2002) 43–8
- [33] van der Laan, L. J., Dopp, E. A., Haworth, R., Pikkarainen, T., Kangas, M., Elo-maa, O., Dijkstra, C. D., Gordon, S., Tryggvason, K., Kraal, G., Regulation and functional involvement of macrophage scavenger receptor MARCO in clearance of bacteria in vivo, *J Immunol* 162 (1999) 939–47
- [34] Lee, J., Mira-Arbibe, L., Ulevitch, R. J., TAK1 regulates multiple protein kinase cascades activated by bacterial lipopolysaccharide, *J Leukoc Biol* 68 (2000) 909–15
- [35] Lemaitre, B., Nicolas, E., Michaut, L., Reichart, J. M., Hoffmann, J. A., The dorsoventral regulatory gene cassette *spätzle/Toll/Cactus* controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults, *Cell* 86 (1996) 973–983
- [36] Lewthwaite, J., Owen, N., Coates, A., Henderson, B., Steptoe, A., Circulating human heat shock protein 60 in the plasma of British civil servants: relationship to physiological and psychosocial stress, *Circulation* 106 (2002) 196–201

- [37] Li, M., Carpio, D., Zheng, Y., Bruzzo, P., Singh, F., V. and Quaaaz, Medzhitov, R. M., Beg, A., An essential role of the NF-kappaB/Toll-like receptor pathway in induction of inflammatory and tissue-repair gene expression by necrotic cells, *J Immunol* 166 (2001) 7128–7135
- [38] Liew, F. Y., Xu, D., Brint, E. K., O’Neill, L. A. J., Negative Regulation of Toll-like Receptor-mediated Immune Responses, *Nat Rev Immunol* 5 (2005) 446–458
- [39] Lorenz, E., Mira, J. P., Frees, K. L., Schwartz, D. A., Relevance of mutations in the TLR₄ receptor in patients with gram-negative septic shock, *Arch Intern Med* 162 (2002) 1028–32
- [40] Mahdi, O. S., Horne, B. D., Mullen, K., Muhlestein, J. B., Byrne, G. I., Serum immunoglobulin G antibodies to chlamydial heat shock protein 60 but not to human and bacterial homologs are associated with coronary artery disease, *Circulation* 106 (2002) 1659–63
- [41] Medzhitov, R., Toll-like receptors and innate immunity, *Nat Rev Immunol* 1 (2001) 135–45
- [42] Medzhitov, R., Preston-Hurlburt, P., Janeway, J., C. A., A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity, *Nature* 388 (1997) 394–7
- [43] Medzhitov, R., Preston-Hurlburt, P., Kopp, E., Stadlen, A., Chen, C., Ghosh, S., Janeway, J., C. A., MyD88 is an adaptor protein in the hToll/IL-1 receptor family signaling pathways, *Mol Cell* 2 (1998) 253–8
- [44] Moazed, T., Kuo, C., Grayston, J., Campbell, L., Murine models of *Chlamydia pneumoniae* infection and atherosclerosis, *J Infect Dis* 175 (1997) 883–890
- [45] Moazed, T. C., Kuo, C. C., Grayston, J. T., Campbell, L. A., Evidence of systemic dissemination of *Chlamydia pneumoniae* via macrophages in the mouse, *J Infect Dis* 177 (1998) 1322–5
- [46] Moulder, J. W., Comparative biology of intracellular parasitism, *Microbiol Rev* 49 (1985) 298–337
- [47] Moulder, J. W., Interaction of chlamydiae and host cells in vitro, *Microbiol Rev* 55 (1991) 143–90

- [48] Muhlestein, J. B., Anderson, J. L., Hammond, E. H., Zhao, L., Trehan, S., Schwobe, E. P., Carlquist, J. F., Infection with *Chlamydia pneumoniae* accelerates the development of atherosclerosis and treatment with azithromycin prevents it in a rabbit model, *Circulation* 97 (1998) 633–6
- [49] Nagai, Y., Akashi, S., Nagafuku, M., Ogata, M., Iwakura, Y., Akira, S., Kitamura, T., Kosugi, A., Kimoto, M., Miyake, K., Essential role of MD-2 in LPS responsiveness and TLR₄ distribution, *Nat Immunol* 3 (2002) 667–72
- [50] Ngeh, J., Anand, V., Gupta, S., *Chlamydia pneumoniae* and atherosclerosis – what we know and what we don't, *Clin Microbiol Infect* 8 (2002) 2–13
- [51] Ohashi, K., Burkart, V., Flohe, S., Kolb, H., Cutting edge: heat shock protein 60 is a putative endogenous ligand of the toll-like receptor-4 complex, *J Immunol* 164 (2000) 558–61
- [52] Oshiumi, H., Matsumoto, M., Funami, K., Akazawa, T., Seya, T., TICAM-1, an adaptor molecule that participates in Toll-like receptor 3-mediated interferon-beta induction, *Nat Immunol* 4 (2003) 161–7
- [53] Ozinsky, A., Smith, K. D., Hume, D., Underhill, D. M., Co-operative induction of pro-inflammatory signaling by Toll-like receptors, *J Endotoxin Res* 6 (2000) 393–6
- [54] Poltorak, A., He, X., Smirnova, I., Liu, M. Y., Van Huffel, C., Du, X., Birdwell, D., Alejos, E., Silva, M., Galanos, C., Freudenberg, M., Ricciardi-Castagnoli, P., Layton, B., Beutler, B., Defective LPS signaling in C₃H/HeJ and C₅₇BL/10ScCr mice: mutations in Tlr₄ gene, *Science* 282 (1998) 2085–8
- [55] Prebeck, S., Kirschning, C., Durr, S., da Costa, C., Donath, B., Brand, K., Redecke, V., Wagner, H., Miethke, T., Predominant role of toll-like receptor 2 versus 4 in *Chlamydia pneumoniae*-induced activation of dendritic cells, *J Immunol* 167 (2001) 3316–23
- [56] Puolakkainen, M., Campbell, L. A., Lin, T., Richards, T., Patton, D., Kuo, C., Cell-to-cell contact of human monocytes with infected arterial smooth-muscle cells enhances growth of *Chlamydia pneumoniae*, *J Infect Dis* 187 (2003) 435–40

- [57] Rodriguez, N., Fend, F., Jennen, J., Schiemann, M., Wantia, N., Prazeres da Costa, C., Durr, S., Heinzmann, U., Wagner, H., Miethke, T., Polymorphonuclear neutrophils improve replication of *Chlamydia pneumoniae* in vivo upon MyD88-dependent attraction, *J Immunol* 174 (2005) 483–44
- [58] Ross, J. M., McIntire, L. V., Moake, J. L., Kuo, H. J., Qian, R. Q., Glanville, R. W., Schwartz, E., Rand, J. H., Fibrillin containing elastic microfibrils support platelet adhesion under dynamic shear conditions, *Thromb Haemost* 79 (1998) 155–61
- [59] Sabroe, I., Prince, L. R., Jones, E. C., Horsburgh, M. J., Foster, S. J., Vogel, S. N., Dower, S. K., Whyte, M. K., Selective roles for Toll-like receptor (TLR)₂ and TLR₄ in the regulation of neutrophil activation and life span, *J Immunol* 170 (2003) 5268–75
- [60] Schett, G., Xu, Q., Amberger, A., Van der Zee, R., Recheis, H., Willeit, J., Wick, G., Autoantibodies against heat shock protein 60 mediate endothelial cytotoxicity, *J Clin Invest* 96 (1995) 2569–77
- [61] Seki, E., Tsutsiu, H., Tsuji, N., Hayashi, N., Adachi, K., Nakano, H., Futasugi-Yumikura, S., Takeuchi, O., Hoshino, K., Akira, S., Critical roles of myeloid differentiation factor 88-dependent proinflammatory cytokine release in early phase clearance of *Listeria monocytogenes* in mice, *J Immunol* 169 (2002) 3863–3868
- [62] Shi, Y., Tokunaga, O., *Chlamydia pneumoniae* and multiple infections in the aorta contribute to atherosclerosis, *Pathol Int* 52 (2002) 755–63
- [63] Sparwasser, T., Miethke, T., Lipford, G., Erdmann, A., Hacker, H., Heeg, K., Wagner, H., Macrophages sense pathogens via DNA motifs: induction of tumor necrosis factor-alpha-mediated shock, *Eur J Immunol* 27 (1997) 1671–9
- [64] Takeda, K., Kaisho, T., Akira, S., Toll-like receptors, *Annu Rev Immunol* 21 (2003) 335–76
- [65] Takeuchi, O., Hoshino, K., Akira, S., Cutting edge: TLR2-deficient and MyD88-deficient mice are highly susceptible to *Staphylococcus aureus* infection, *J Immunol* 165 (2000) 5392–5396

- [66] Takeuchi, O., Kawai, T., Muhlradt, P. F., Morr, M., Radolf, J. D., Zychlinsky, A., Takeda, K., Akira, S., Discrimination of bacterial lipoproteins by Toll-like receptor 6, *Int Immunol* 13 (2001) 933–40
- [67] Takeuchi, O., Sato, S., Horiuchi, T., Hoshino, K., Takeda, K., Dong, Z., Modlin, R. L., Akira, S., Cutting edge: role of Toll-like receptor 1 in mediating immune response to microbial lipoproteins, *J Immunol* 169 (2002) 10–4
- [68] Toshchakov, V., Jones, B. W., Perera, P. Y., Thomas, K., Cody, M. J., Zhang, S., Williams, B. R., Major, J., Hamilton, T. A., Fenton, M. J., Vogel, S. N., TLR4, but not TLR2, mediates IFN-beta-induced STAT1alpha/beta-dependent gene expression in macrophages, *Nat Immunol* 3 (2002) 392–8
- [69] Vabulas, R. M., Ahmad-Nejad, P., da Costa, C., Miethke, T., Kirschning, C. J., Hacker, H., Wagner, H., Endocytosed HSP60s use toll-like receptor 2 (TLR2) and TLR4 to activate the toll/interleukin-1 receptor signaling pathway in innate immune cells, *J Biol Chem* 276 (2001) 31332–9
- [70] Vink, A., Schoneveld, A. H., van der Meer, J. J., van Middelaar, B. J., Sluijter, J. P., Smeets, M. B., Quax, P. H., Lim, S. K., Borst, C., Pasterkamp, G., de Kleijn, D. P., In vivo evidence for a role of toll-like receptor 4 in the development of intimal lesions, *Circulation* 106 (2002) 1985–90
- [71] Wang, X., Moser, C., Louboutin, J. P., Lysenko, E. S., D.J., W., J.N., W., J.M., W., Toll-like receptor 4 mediates innate immune responses to *Haemophilus influenzae* infection in mouse lung, *J Immunol* 168 (2002) 810–815
- [72] Wooten, R., Ma, Y., Yoder, R., Brown, J., Weis, J., Zachary, J., Kirschning, C., Weis, J., Toll-like receptor 2 is required for innate, but not acquired, host defense to *Borrelia burgdorferi*, *J Immunol* 168 (2002) 348–355
- [73] Xu, Q., Schett, G., Perschinka, H., Mayr, M., Egger, G., Oberhollenzer, F., Willeit, J., Kiechl, S., Wick, G., Serum soluble heat shock protein 60 is elevated in subjects with atherosclerosis in a general population, *Circulation* 102 (2000) 14–20
- [74] Xu, Q., Schett, G., Seitz, X., Hu, Y., Gupta, R. S., Wick, G., Surface staining and cytotoxic activity of heat-shock protein 60 antibody in stressed aortic endothelial cells, *Circ Res* 75 (1994) 1078–85

- [75] Yamamoto, M., Sato, S., Hemmi, H., Sanjo, H., Uematsu, S., Kaisho, T., Hoshino, K., Takeuchi, O., Kobayashi, M., Fujita, T., Takeda, K., Akira, S., Essential role for TIRAP in activation of the signalling cascade shared by TLR2 and TLR4, *Nature* 420 (2002) 324-9
- [76] Zhang, H., Peterson, J. W., Niesel, D. W., Klimpel, G. R., Bacterial lipoprotein and lipopolysaccharide act synergistically to induce lethal shock and proinflammatory cytokine production, *J Immunol* 159 (1997) 4868-78
- [77] Zhang, Y., Bliska, J. B., Role of Toll-like receptor signaling in the apoptotic response of macrophages to *Yersinia* infection, *Infect Immun* 71 (2003) 1513-9

DANKSAGUNG

Ich möchte mich hiermit bei all denen bedanken, ohne deren Hilfe diese Arbeit nicht entstanden wäre.

Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. Dr. h.c. Hermann Wagner, an dessen Institut für Medizinische Mikrobiologie, Immunologie und Hygiene diese Arbeit entstanden ist, für die Überlassung des Themas und die gute Betreuung.

Ich bedanke mich sehr herzlich bei Prof. Dr. Thomas Miethke für die Betreuung der Arbeit und die hervorragende Unterstützung.

Meinen Arbeitskollegen der Arbeitsgruppe Wagner/ Miethke gilt ebenfalls ein besonderer Dank, hierbei möchte ich speziell Dr. Clarissa da Costa, Susanne Dürr und Dr. Nuria Rodriguez erwähnen, die mir bei allen wissenschaftlichen Problemen zur Seite standen.

Vielen herzlichen Dank meinen Eltern, die mich schon mein ganzes Leben unterstützen, außerdem an meine Brüder Karsten und Ingo und meinen Onkel Walter.

Für Korrekturen und Hilfe bei der Erstellung der Arbeit ein herzliches Danke an Maike, Michael, Dirk und besonders an Karsten.