Aus der Klinischen Abteilung des Deutschen Diabetes-Forschungsinstitutes an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Leiter: Prof. Dr. med. W. A. Scherbaum

Aktivierung und Desensibilisierung humaner Monozyten durch humanes Hitzeschockprotein 60

Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

Der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

> vorgelegt von Ulrike Syldath

> > 2000

Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf gez.: Univ.-Prof. Dr. Häussinger Dekan Referent: Prof. Dr. Kolb Korreferent: Univ.-Prof. Dr. Schneider

Abkürzungsverzeichnis

ABTS	2,2'-Azino-bis(3-Ethylbenzo-Thiazoline-6-Sulfonic Acid)
	Diammonium Salt
AK	Antikörper
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serumalbumin
cDNA	Komplementäre Desoxyribonukleinsäure (-acid)
Da	Dalton (Molmassen-Einheit)
DEPC	Diethylpyrokarbonat
DNA	Desoxyribonukleinsäure (-acid)
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytidintriphosphat
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamin-tetraacetat
ELISA	Enzyme Linked Immunoabsorbent Assay
Ethidiumbromid	5-Ethyl-3,8-diamino-6-phenyl-phenanthridiniumbromid
EtOH	Ethanol
FCS	Fetales Kälberserum
GM-CSF	Granulocyte Macrophage Colony Stimulating Factor
HEPES	N-(2-Hydroxyethyl)piperazine-N'-2-ethane sulfonic acid
HLA	Humanes Leukozyten-Antigen
hsp60	60 kD Hitzeschock-Protein
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
K0	Negativkontrolle mit Medium
kb	Kilobasenpaare
LPS	Lipopolysaccharid

МНС	Haupthistokompatibilitätskomplex
mRNA	Messenger-Ribonukleinsäure (-acid)
NOD	nicht adipös diabetisch (non-obese diabetic)
PBS	Phosphat-gepufferte Saline
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PMSF	Polymethylsulfonsäure
Pxb	Polymyxin B
RNA	Ribonukleinsäure (-acid)
RNase	Ribonuklease
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
RT	Reverse Transkriptase
SDS	Natriumdodecylsulfat
SSC	Standard Salinecitrat
STE	Natriumchlorid, Tris, EDTA
Taq	Thermus aquaticus
TBE	Tris-Borat-EDTA
TE	Tris-EDTA
TGF	Transforming Growth Factor
Th	T-Helferzelle
TNF	Tumornekrosefaktor
Tris	Tris-(hydroxymethyl-)aminomethan
Tween 20	Polyoxyethylsorbitmonolaureat
UV	Ultraviolett
VE-Wasser	Voll entsalztes Wasser

Inhaltsverzeichnis

EINLE	TITUNG	1
1.	Diabetes mellitus Typ I	1
1.1	Ätiopathogenese	1
1.2	Epidemiologie	2
1.3	Klinik	2
1.4	Komplikationen	
1.5	Therapie	4
2.	Hitzeschockproteine	5
2.1	Die Rolle von Hitzeschockproteinen im Immunsystem	7
3.	Die Rolle von Makrophagen bei der Pathogenese des Typ I Diabetes	11
4.	Fragestellung der Arbeit	14
мате	RIAL UND METHODEN	15
MATE	RIAL UND METHODEN	15 15
MATE I. N 1.	RIAL UND METHODEN	15
MATE I. N 1. 1.1	RIAL UND METHODEN MATERIAL Zellkulturen Medien.	15
MATE I. N 1. 1.1 1.2	RIAL UND METHODEN	15 15 15 15
MATE I. N 1. 1.1 1.2 2.	RIAL UND METHODEN MATERIAL Zellkulturen Medien Stimulantien und Antikörper ELISA	15 15 15 15 16 18
MATE I. N 1. 1.1 1.2 2. 2.1	RIAL UND METHODEN	15 15 15 16 18 18
MATE I. N 1. 1.1 1.2 2. 2.1 2.2	RIAL UND METHODEN	15 15 15 16 18 18 19
MATE I. N 1. 1.1 1.2 2. 2.1 2.2 3.	RIAL UND METHODEN	15 15 15 15 16 18 18 19 20
MATE I. N 1. 1.1 1.2 2. 2.1 2.2 3. 3.1	RIAL UND METHODEN	15 15 15 16 16 18 18 19 20 20
MATE I. N 1. 1.1 1.2 2. 2.1 2.2 3. 3.1 3.2	RIAL UND METHODEN	15 15 15 15 15 15 15 15 15 16 18 19 20 20 20 22

II.	Μ	ETHODEN	
1	•	Zellkulturen	
	1.1	Mono-Mac-6 Kultur	
	1.2	Vollblutkultur	
	1.3	Aufbau des Stimulationstests	30
2		ELISA für Zytokine	
	2.1	ELISA für TNFα	
	2.2	ELISA für IL-10	
	2.3	ELISA für TGFβ	
3		RT-PCR	34
	3.1	Isolation der RNA	
	a)	Isolation der RNA aus Mono-Mac-6 Zellen	
	<i>b)</i>	Isolation der RNA aus Vollblut	
	3.2	Messen der RNA	
	3.3	RT-Ansatz	
	3.4	PCR	
	3.5 A	garose-Gel	39
	3.6	Blotten	40
4		Southern Blot	41
	4.1	Insertisolierung	41
	4.2	Radioaktive Markierung der Inserts	44
	4.3	Aufreinigung über die Säule	44
	4.4	Hybridisierung	45
5		Statistische Analysen	46
ER	GEB	NISSE	47
I.	Ri	EAKTIONEN DER MONO-MAC-6 ZELLEN AUF HUMANES HSP60	47
1		Humanes hsp60 induziert die TNF	47
	1.1	Dosisabhängigkeit der Monozytenstimulation durch hsp60	47

1.2	Keine Beeinflussung der stimulierenden Wirkung von hsp60 durch Polymyxin B4	48
1.3	Zeitabhängigkeit der TNFα-Produktion)
2.	Humanes hsp60 induziert Th1 Zytokin-mRNA	
3.	Desensibilisierung)
3.1	Desensibilisierung der Monozyten	I
3.2	Polymyxin B hemmt nicht die Desensibilisierung durch hsp60 54	ł
3.3	IL-10-Freisetzung bei der Desensibilisierung 56)
3.3	TGFβ-Produktion bei der Desensibilisierung	,
4.	Aufhebung der Desensibilisierung	1
4.1	Zytokine	1
4.2	Glukose	,
5.2	Insulin und Proinsulin	,
II. R	REAKTIONEN DER VOLLBLUTKULTUR AUF HUMANES HSP60)
1.	Zeitabhängigkeit der TNFα-Freisetzung in der Vollblutkultur)
2.	Zeitkinetik der Freisetzung von IL-10 in der Vollblutkultur	,
4.	Desensibilisierung in der Vollblutkultur	
4.	Aufheben der Desensibilisierung von Blutzellen74	•
DISKU	SSION	,
1.	Humanes hsp60 stimuliert humane Monozyten	,
2.	Humanes hsp60 desensibilisiert Monozyten)
2.	Humanes hsp60 als immunstimulierendes Signal	•
3.	Die Bedeutung des humanen hsp60 beim Diabetes mellitus Typ I 85	
ZUSAN LITER	AMENFASSUNG:)

Einleitung

1. Diabetes mellitus Typ I

Der Diabetes mellitus Typ I, welcher auch als insulinabhängiger Diabetes mellitus (IDDM) bezeichnet wird, ist eine Glukosestoffwechselstörung mit chronischer Hyperglykämie bedingt durch einen Insulinmangel¹.

1.1 Ätiopathogenese

Der Typ I Diabetes entsteht durch eine weitgehend selektive Zerstörung der insulinproduzierenden
ß-Zellen in den Langerhans'schen Inseln des Pankreas. Die Folge ist ein Insulinmangelsyndrom². Die Erkrankung entwickelt sich auf dem Boden einer genetischen Prädisposition³ im Zusammenwirken mit Umwelteinflüssen, die auch als Realisationsfaktoren bezeichnet werden. Bei dem Diabetes mellitus Typ I sind die genetischen Faktoren mit dem Haupthistokompatibilitätskomplex auf dem kurzen Arm von Chromosom 6 verbunden. Dabei scheinen bereits geringfügige Änderungen in der Primärstruktur der HLA-Merkmale zu einer gesteigerten Empfänglichkeit oder zu einem Schutz gegenüber einem Typ I Diabetes zu führen⁴. HLA-DR3 und DR4 zeigen die stärkste Typ I Diabetes-Assoziation, hingegen die Haplotypen DR2 und DR5 überzufällig selten beim IDDM anzutreffen sind. Aus Untersuchungen an eineiigen Zwillingen, von denen der eine an einem Typ I Diabetes erkrankt ist, weiß man jedoch, daß nur ca. 30 bis 40 % der Geschwister an einem Diabetes erkranken⁵. Dieses spricht dafür, daß neben der Erbanlage noch weitere Faktoren wie Viren, inseltoxische Substanzen oder immunmodulierende Nahrungsmittel eine Rolle spielen müssen⁶. Es wird vermutet, daß solche Faktoren entzündliche Vorgänge in den Inseln auslösen oder begünstigen. Die Insulitis kann über Monate bis Jahre verlaufen und führt zu einer fortlaufenden Zerstörung der β -Zellen⁷. Die klinische Manifestation des Diabetes mellitus Typ I erfolgt erst nach einem Verlust von 80 bis 90 % der β -Zellfunktion. Der daraus resultierende Insulinmangel manifestiert sich klinisch mit einem Anstieg des Nüchternblutzuckers und der postprandialen Blutzuckerwerte.

Als Ausdruck des immunologischen Geschehens lassen sich Antikörper gegen Inselzellgewebe wie die ICA (islet-cell antibodies) oder Antikörper gegen das 64-kD-Inselzellprotein Glutamat-Decarboxylase⁸ nachweisen.

1.2 Epidemiologie

Der Diabetes mellitus hat in Deutschland eine Prävalenz von ca. 4 $\%^9$, wobei der Typ I Diabetes etwa 1/10 der Diabeteserkrankungen darstellt. In Mitteleuropa kann davon ausgegangen werden, daß 0,3 % der Bevölkerung an einem Typ I Diabetes erkrankt sind, wobei beide Geschlechter etwa gleich häufig betroffen sind².

Die Lebenserwartung beim insulinabhängigen Diabetes ist signifikant verkürzt. Das Risiko für kardiovaskuläre Erkrankungen ist bei Diabetikern um 200 % bis 400 % größer als bei nichtdiabetischen Personen¹⁰. Die diabetische Retinopathie ist heute in den zivilisierten Ländern eine der häufigsten Ursachen der Erblindung (40-60 %). Sie stellt ein erhebliches sozialmedizinisches Problem dar.

1.3 Klinik

Der Typ I Diabetes kann sich grundsätzlich in jedem Lebensalter manifestieren. Die Erkrankungsgipfel liegen jedoch in der Kindheit, dem Jugend- sowie dem jungem Erwachsenenalter.

Die klassischen Symptome des Insulinmangelsyndroms sind Polyurie, Polydipsie, Ketoazidose und Gewichtsverlust. Häufig wird die Manifestation des Diabetes mellitus Typ I von einem banalen Infekt begleitet. Der Insulinbedarf ist bei einer Infektion bis zu 30 % erhöht. Ein Infekt könnte daher bei prädiabetischen Personen zu einem absoluten Insulinmangel führen¹¹.

Die Allgemeinsymptome wie Müdigkeit, Mattigkeit, Abnahme der körperlichen Leistungsfähigkeit und Gewichtsverlust lassen sich durch die allgemeine Katabolie erklären. Die gesteigerte Glukoneogenese führt zu einer Abnahme der Muskelmasse. Bei höheren Blutzuckerwerten trägt die Glukosurie ebenfalls zum Gewichtsverlust bei. Größere Harnzuckermengen führen zu einer osmotischen Diurese, wodurch sich die Polyurie erklärt. Die Polyurie bedingt zwangsläufig ein gesteigertes Durstgefühl, welches den Patienten veranlaßt, größere Flüssigkeitsmengen zu trinken. Flüssigkeitsaufnahme und Harnausscheidung können 5 bis 6 l innerhalb von 24 Stunden erreichen.

Die Flüssigkeitsverschiebungen zwischen Intra- und Extrazellulärraum bedingen zusammen mit Elektrolytstörungen die sehr unangenehmen nächtlichen Wadenkrämpfe der Patienten. Sie sind ebenfalls für interkurrente Refraktionsanomalien verantwortlich, die durch Augenlinse erklären unterschiedliche Quellungszustände der sind. Weitere zu Allgemeinsymptome sind eine herabgesetzte Infektresistenz mit Neigung zu Pyodermien und Furunkulose sowie Soorbefall mit Auftreten einer Balanitis oder Vulvovaginitis. Oft macht sich ein lästiges Hautjucken ohne primär sichtbare Hautveränderungen bemerkbar. Man spricht in diesem Fall vom Pruritus sine materia. Bei Frauen sind außerdem häufig chronischrezidivierende Harnwegsinfektionen zu finden¹².

1.4 Komplikationen

Wenn der Insulinmangel einen bestimmten Grad übersteigt, kommt es zur Stoffwechseldekompensation. Die Blutzuckerkonzentration steigt über 300 mg/dl an. Es entwickelt sich eine Ketoazidose. Die typischen Symptome des ketoazidotischen Komas sind Exsikkose, Azetongeruch der Atemluft, Kussmaul-Atmung, Brechreiz und Erbrechen sowie eine Pseudoperitonitis. Über eine zunehmende Bewußtseinstrübung kommt es zur tiefen Bewußtlosigkeit mit nachfolgendem Herz-Kreislauf-Versagen und Tod.

Die andere lebensbedrohliche akute Komplikation des Diabetes mellitus ist das hypoglykämische Koma. Hinsichtlich der Morbidität und Mortalität spielen jedoch die Diabetesspätfolgen klinisch eine wichtigere Rolle.

Typische Spätkomplikationen sind die diabetische Mikro- und Makroangiopathie sowie die diabetische Polyneuropathie. Das Auftreten dieser Spätschäden korreliert reziprok mit der Güte der Diabeteseinstellung. Die diabetische Mikroangiopathie macht sich klinisch vorwiegend als Retinopathie und Nephropathie bemerkbar. Die diabetische Neuropathie zeigt sich klinisch als Polyneuropathie, Mononeuritis, diabetogene Amyotrophie oder im Befall des autonomen Nervensystems¹³.

<u>1.5 Therapie</u>

Der Diabetes mellitus Typ I stellt eine Indikation zur Insulintherapie dar. Das Therapieziel ist zum einen das Erreichen von nahezu normoglykämischen Blutglukosewerten, um eine Entwicklung von Spätkomplikationen zu vermeiden. Zum anderen soll das Hypoglykämierisiko minimiert werden.

Insulin fördert die Utilisation der mit der Nahrung aufgenommenen Kohlenhydrate und hemmt die körpereigene Neubildung von Glukose durch Glykolyse und Glukoneogenese. Beim Stoffwechselgesunden erfolgt die Hemmung der endogenen Glukoseproduktion durch eine kontinuierliche basale Insulinsekretion, die ständig einen bestimmten Seruminsulinspiegel aufrechterhält. Die exogen zugeführte Glukose wird mittels einer intermittierenden prandialen Insulinsekretion verwertet. Beim Gesunden erfolgt dementsprechend zuerst eine Kohlenhydrat- und darauffolgend erst eine körpereigene Insulinzufuhr. Bei der Therapie des Diabetes mellitus Typ I besteht die Kunst darin, den Wirkspiegel von Insulin im Blut mit dem durch die Nahrungszufuhr zu erwartenden Blutzuckerspiegel in Einklang zu bringen. Dazu stehen einem verschiedene Insulinpräparate mit unterschiedlicher Pharmakokinetik zur Verfügung. In der Routinetherapie wird das Insulin subkutan appliziert. Nur in Sondersituationen wie dem Coma diabeticum gibt man es intravenös.

Je nach Verzögerungscharakteristik unterscheidet man neben den unmodifizierten, kurz wirksamen Normal-Insulinen die modifizierten, mittellang wirksamen und langwirksamen Verzögerungsinsuline. Daneben stehen noch Insuline für Spezialzwecke wie die Insulinpumpenbehandlung zur Verfügung. Man unterscheidet zwischen der konventionellen Insulintherapie und der sogenannten intensivierten Insulintherapie, welche unter dem Schlagwort "Basis-Bolus-Prinzip" bekannt geworden ist¹¹.

Nach Beginn der Insulintherapie setzt eine Remissionsphase ein, die durch sinkenden Insulinbedarf gekennzeichnet ist. Ursachen hierfür sind eine Abnahme der peripheren Insulinresistenz aufgrund der Normalisierung des Stoffwechsels und eine partiellen Erholung der β -Zellfunktion².

Die Therapie des diabetischen Komas gliedert sich in diabetesspezifische und allgemeinsymptomatische Maßnahmen. Im Vordergrund der diabetesspezifischen Maßnahmen stehen Flüssigkeitszufuhr und Insulingabe. Diese erfolgt als intravenöse Insulinsubstitution mit Andere Ansätze der Therapie sind die Transplantation isolierter Inselzellen¹⁴ oder Pankreasteiltransplantationen¹⁵. Ein Versuch zur Beeinflussung der Insulitis bestand in einer frühen Immunintervention vor Manifestation eines Typ I Diabetes. Man testete unter anderem die Substanzen Cyclosporin A und Nikotinamid¹⁶. Cyclosporin A konnte die Remissionsphase bis zu zwei Jahren verlängern¹⁷. Es gab jedoch keine länger andauernden positiven Effekte¹⁸. Die Behandlung mit Nikotinamid führte bei Kindern mit hohem Risiko für den IDDM innerhalb von drei Jahren zu keiner signifikanten Verhinderung oder Verzögerung der Diabetesentstehung.

Andere Therapiestrategien sind die Entwicklung eines Sensors für kontinuierliche Blutzuckermessungen, der die Konstruktion einer Insulinpumpe ermöglicht, welche als künstlicher Pankreasteil fungieren soll.

2. Hitzeschockproteine

Die Hitzeschockproteine (hsp) wurden das erste Mal in der Fruchtfliege Drosophila entdeckt. 1962 bemerkte Ritossa eine Genaktivität bei Drosophilalarven nach einer 30minütigen Temperaturerhöhung von 25 auf 30 °C¹⁹. 1974 wurden die Hitzeschockproteine erstmalig isoliert²⁰. Es war jedoch schon bekannt, daß man die Synthese dieser Proteine nicht nur nach Hitzeschock sondern auch nach Exposition mit gewissen Chemikalien, wie z.B. Schwermetallen, Ethanol oder Salizylaten, beobachten konnte²¹. Mittlerweile sind eine Vielzahl von stressenden Reizen bekannt, welche zu einer Expression von hsp führen. Neuere Untersuchungen zeigen sogar einen erhöhten hsp60-Gehalt in menschlichen Herzen nach Herzinfarkt und bei dilatativer Kardiomyopathie²². Hsp60 ist ebenso bei chronischen Entzündungen oder Atherosklerose zu finden²³.

Die Ausprägung der Streßreaktion ist von der Stärke des stressenden Reizes abhängig. Man geht davon aus, daß hsp eine Rolle bei der Reparation von Zellschäden spielt, da es nach einem stressenden Reiz zu einer intrazellulären Akkumulation von hsp kommt²⁴. Es wurde

6

festgestellt, daß ein kurzer Hitzeschock dafür sorgt, daß die Zellen mit einem folgenden Streßereignis besser zurecht kommen als Zellen ohne einen vorherigen Hitzeschock²⁵.

Die Struktur der Hitzeschockproteine ist sowohl in prokaryontischen als auch in eukaryontischen Zellen evolutionär konservativ²⁶. Die Hitzeschockproteine untergliedern sich in große Proteinfamilien, welche zwar ähnliche Funktionen haben, aber eine unterschiedliche Expression zeigen. Sie werden nach ihrem Molekulargewicht klassifiziert²⁷. Man unterscheidet die Hauptfamilien 100 kDa, 90 kDa, 70 kDa und 60 kDa sowie eine Reihe von niedermolekularen Hitzeschockproteinen²⁸.

Hsp spielt nicht nur eine wichtige Rolle bei Hitzeschock oder anderem Streß, woher es seinen Namen hat. Es hat auch eine essentielle Rolle für das Überleben von Zellen in normalen, physiologischen Situationen. Die Hitzeschockproteine sind molekulare Chaperone²⁹. Sie begleiten einige Syntheseschritte von Proteinen³⁰, indem sie eine Rolle bei der Proteinfaltung und dem Proteintransport spielen³¹. Des weiteren sind Hitzeschockproteine essentielle Komponenten des zytoplasmatischen Ubiquitin-abhängigen Proteindegradierungsweges³².

Hitzeschockproteine sind in den Vorgang der Antigenprozession und -präsentation involviert³³. Diese Entfaltung, Translokation und Degradierung von Proteinen mit Hilfe der Hitzeschockproteine stellt die Basis für die Antigenverarbeitung dar. Den T-Helferzellen werden die Peptidfragmente anschließend an der Zelloberfläche mittels des Haupthistokompatibilitätskomplexes Klasse II präsentiert. Es ist sicherlich beachtenswert, daß die Gene für humanes hsp70 inmitten derer für den MHC (Haupthistokompatibilitätskomplex) zu finden sind³⁴. Das Protein, PBP72/74, welches die Bindung der Peptide an das MHC Klasse II Molekül erleichtert. der gehört ebenfalls zu Familie der Hitzeschockproteine³⁵. Die von hsp prozessierten Antigenfragmente werden den T-Zellen sowohl über MHC Klasse II wie auch über Klasse I Moleküle präsentiert³⁶.

Hitzeschockproteine sind auch an der Synthese von Immunglobulinen beteiligt³⁷. Das Protein, an welches die schwere Kette gebunden ist, gehört zu der Familie der 70 kDa Hitzeschockproteine. Grp78, früher auch als BiP bezeichnet, begleitet die schwere Kette im endoplasmatischen Retikulum, wo sie sich dann mit der leichten Kette zu einem Immunglobulin vereint, und verhindert somit eine Verbindung von schweren Ketten untereinander.

Hsp wurde in unterschiedlichen zellulären Kompartimenten, im Zytosol, in den Mitochondrien, im Nukleus, im endoplasmatisches Retikulum, in den Lysosomen und an der Plasmamembran nachgewiesen³⁸. Hsp ist essentiell an dem Transport von zellulären Peptiden zwischen unterschiedlichen Zellkompartimenten beteiligt³⁹. Die Fähigkeit Peptide zu binden und diese bei Bedarf wieder freizusetzen, beruht auf einer Konformationsänderung von hsp nach Bindung von ATP⁴⁰. Für den Einbau von importierten Proteinen ist eine Hydrolyse von ATP nötig. Die Proteine der hsp60-Familie begleiten neu transferierte Proteine in die mitochondriale Matrix und/oder helfen bei der Proteinfaltung⁴¹. Hsp60 begleitet als Protein der mitochondrialen Matrix die korrekte Proteinfaltung der Polypeptidketten zu komplexen mitochondrialen Enzymen⁴². Bei Patienten mit kongenitaler Laktatazidose aufgrund multipler mitochondrialer Enzymdefekte wurde eine geringere hsp60-Konzentration gefunden. Diese Beobachtung zeigt die besondere Bedeutung des hsp60 für die korrekte Proteinsynthese. In Säugetierzellen befindet sich hsp60 nicht nur in den Mitochondrien sondern auch im Zytosol⁴³.

In der letzten Zeit wurde hsp60 auch mit Zellmembranfunktionen in Verbindung gebracht⁴⁴. Bei Infektionen wurden Änderungen der intrazellulären Lokalisation der Hitzeschockproteine wie auch der Expressionen an der Zelloberfläche beobachtet⁴⁵. Man fand hsp60-Antigene sowohl auf der Zelloberfläche von mykobakterieninfizierten als auch von Lymphoma-Zellen⁴⁶. Hsp60 stellt somit allein oder als Teil eines größeren Proteinkomplexes in der Zellmembran ein Marker für pathologisch veränderte Zellen dar.

2.1 Die Rolle von Hitzeschockproteinen im Immunsystem

Mikrobielle Hitzeschockproteine mit dem Molekulargewicht von 58 bis 65 kDa sind ein vorherrschendes Zielobjekt der Immunantwort von Säugetieren⁴⁷. Diese Hitzeschockproteine gehören zu der Familie des hsp60. In Immunantworten gegen zahlreiche Bakterien findet man eine immundominante, kreuzreaktive Antikörper-Reaktion gegen diese bakteriellen Antigene. Vor der Identifizierung der Hitzeschockproteine sprach man in diesem Zusammenhang auch von "common antigen"⁴⁸. Diese Entdeckung war die Basis für viele Studien über die Rolle von hsp bei Infektionen.

Bakterielles hsp60 ist auch ein immundominantes Antigen für zelluläre Immunantworten, welche durch T-Lymphozyten mediiert sind. Dieses ergab sich aus Analysen von Immunantworten während einer Infektion⁴⁹ bzw. nach einer Immunisation mit Bakterien⁵⁰. Neben den α/β T-Zellen zeigen auch γ/δ T-Zellen eine Reaktion auf hsp60. Die γ/δ T-Zellen erkennen ein Epitop, die Aminosäuresequenz 188 bis 191, welches eine gewisse Homologie mit dem Säugetier-hsp60 zeigt⁵¹. Neben dem bakteriellen hsp fand man eine gesteigerte Expression von hsp des von der Infektion betroffenen Organismus⁵². Selbst bei viralen Infekten beobachtete man eine Expression von Hitzeschockproteinen⁵³. Hsp, welches von viral infizierten oder auch von Tumorzellen freigesetzt worden ist, stimuliert Antigenspezifische CD8(+) T-Zellantworten⁵⁴.

Hitzeschockproteine spielen bei der gegen Tumorzellen gerichteten Immunantwort eine wichtige Rolle⁵⁵. Sie sind an der T-Zellreaktion gegen Tumorzellen beteiligt⁵⁶. Die schon in Kapitel 2. beschriebene Bedeutung der hsp-Chaperone bei der Antigenprozessierung ermöglicht, daß hsp mit einem großen Spektrum von zellulären Proteinen und Peptiden eine Bindung eingehen kann. Diese begleiteten Proteine und Peptide können dann eine stabile Verbindung mit dem Haupthistokompatibilitätskomplex Klasse I eingehen, selbst wenn der hsp-Proteinkomplex exogen zugeführt worden ist. Diese Beobachtung unterstützt den möglichen Therapieansatz, durch eine Impfung mit hsp-gekoppelten Tumorpeptiden die Ausbildung einer spezifischen CD8(+) T-Zellantwort zu provozieren. In einem Tiermodell für Zervixkarzinome konnte ein Reduktion des Tumorgewebes nach Impfung mit an mykobakterielles hsp65 gekoppelten, viralen Protein nachgewiesen werden⁵⁷.

Zudem beobachtete man bei transformierten Zellen eine hsp-Expression an der Zelloberfläche⁵⁸. Bei wiederholtem Hitzeschock wurde im Gegensatz zu den gesunden Zellen lediglich bei den Tumorzellen eine Expression von hsp an der Zelloberfläche beobachtet.

Bei manchen Tumorarten wie beispielsweise dem Hodgin-Lymphom fand man generell eine erhöhte hsp-Expression, wobei die jeweils produzierten hsp-Familien entweder mit der proliferativen Kapazität oder mit der Aggressivität des Lymphoms korrelierten⁵⁹.

Hsp60 von Säugetieren ist ein wichtiges Autoantigen. Eine gesteigerte Expression von hsp wurde sowohl bei chronischen Entzündungen als auch bei Atherosklerose beobachtet⁶⁰. Die Tatsache, daß T-Lymphozyten auch vom eigenen Organismus produziertes hsp erkennen, hat zwei Seiten. Zum einen können aus diesem Grunde entzündete, transformierte, infizierte oder anderweitig traumatisierte Zellen von den T-Lymphozyten erkannt und eliminiert werden, um den Gesamtorganismus vor Schäden zu bewahren. Zum anderen besteht wegen der großen Homologie zwischen bakteriellem und humanem hsp die Gefahr der Entwicklung von Autoimmunerkrankungen⁵⁰. Es wurde gezeigt, daß gestreßte Schwann-Zellen von T-Zellen, die auf mykobakterielles hsp60 reagiert hatten, erkannt worden sind⁶¹. So scheint eine enge Verbindung zwischen Hitzeschockproteinen und einigen Autoimmunerkrankungen wie Arthritis, Diabetes und Enzephalomyelitis disseminata zu bestehen⁶². Eine verstärkte Expression von hsp60 bei Autoimmunerkrankungen wird sehr oft als Nebeneffekt des Entzündungsprozesses beobachtet.

Die Immunantwort auf Hitzeschockproteine wurde häufig bei mykobakteriellen Infektionen untersucht. Verschiedene Epitope des mykobakteriellen hsp60 können vom humanen Immunsystem erkannt werden. Mykobakterielles hsp60 ist ein dominantes Ziel von Antikörpern und T-Zellen in der Maus und beim Menschen⁶³. Eine Reaktion von T-Zellklonen auf mykobakterielles hsp60 wurde bei einer experimentellen Autoimmunarthritis bei Ratten beobachtet⁶⁴. Ähnliches wurde für den Menschen gezeigt: klonierte T-Zellen von Patienten mit chronischer Polyarthritis reagieren ebenfalls auf mykobakterielles hsp60⁶⁵.

In der C57BL/6 Maus werden die Peptide des Wirtes genauso gut von den Rezeptoren der CD8⁺-Zellen erkannt wie die Peptide des mykobakteriellen hsp60. Beide Peptide haben eine Teilsequenz⁶⁶. Hsp60 spielt auch gemeinsame bei anderen Tiermodellen von Autoimmunkrankheiten wie bei dem im Folgeabschnitt erläuterten Diabetes mellitus eine Rolle⁶⁷. Diese Entdeckungen führten dazu, Zusammenhänge zwischen Infektionen und Autoimmunerkrankungen näher zu betrachten⁶⁸. Es besteht eine große Homologie zwischen bakteriellem und eukaryontischem hsp60. Es besteht die Hypothese, daß es zu einem molekularem Mimikry des hsp zwischen Pathogenen und dem Wirt kommt⁶⁹. Daraufhin vermindert sich die Immuntoleranz und es kommt zu einer Autoimmunantwort. Diese Hypothese wurde mittlerweile schon bei diversen Autoimmunerkrankungen geprüft⁷⁰. Humanes hsp60 hat eine Sequenzhomologie mit Autoantigenen beim Typ I Diabetes, der Hashimoto Thyreoiditis, der multiplen Sklerose und der rheumatoiden Arthritis⁷¹.

Jedoch existieren ebenfalls Ergebnisse, die dieser Hypothese widersprechen. Wie bereits in dem Kapitel 1.1 (Ätiopathogenese des Typ I Diabetes) erläutert, stellt die Expression von HLA-DR4 ein Risikofaktor für den IDDM dar. Die den T-Zellen über HLA-DR4 präsentierten Epitope des mykobakteriellen hsp60 zeigten jedoch keinerlei Homologie mit humanem hsp60⁷². Da keine Homologie in diesem Bereich besteht, wird die Autoreaktivität

wahrscheinlich nicht durch Komplexe von HLA-DR4 und Peptiden des mykobakteriellen hsp60 verursacht.

T-Zellen aus synovialer Flüssigkeit von Patienten mit rheumatoider Arthritis werden nur durch humanes aber nicht durch bakterielles hsp60 stimuliert⁷³. Bei den auf humanes hsp60 reagierenden T-Zellen wird die Produktion von TNF α und IFN γ reduziert. Daraus läßt sich folgern, daß eine verstärkte Expression des humanen hsp60 in der entzündeten Synovialis⁷⁴ zu einer Hemmung der Arthritis beiträgt.

Im Hinblick auf den Typ I Diabetes untersuchte man zunächst Seren von NOD- (non-obese diabetic) Mäusen. Die NOD-Mäuse stellen ebenso wie die BB- (Biobreeding-) Ratten ein experimentelles Modell des IDDM dar⁷⁵. In diesen Seren von NOD-Mäusen fand man Autoantikörper gegen das 60 kDa Hitzeschockprotein. Diese Antikörper gegen mykobakterielles hsp60 fand man nur bei NOD-Mäusen, welche später einen Diabetes mellitus Typ I entwickelten. Bei Diabetes-freien Mäusen waren sie nicht zu finden⁷⁶. Für den Menschen gibt es nur wenige Studien, in welchen man nach Antikörpern gegen das Säugetierhsp60 gesucht hat. In einer stellte man fest, daß der Titer der hsp60-Antikörper bei Patienten mit IDDM oder rheumatoider Arthritis signifikant höher war als bei den gesunden Kontrollpersonen. Es wurde jedoch bei den IDDM-Patienten keine Beziehung zwischen dem Titer der hsp60-Antikörper und Inselzellantikörpern oder Antikörpern gegen die Glutamat-Decarboxylase gefunden⁷⁷.

Bei Untersuchungen der zellulären Verteilung des hsp60 in pankreatischen β -Zellen ergab sich, daß ein mit dem hsp60 verwandtes Protein vornehmlich in den reifen sekretorischen Granula der β -Zellen lokalisiert ist. Bei prädiabetischen NOD-Mäusen geht diese Lokalisation mit der Zeit verloren. Das 62 kDa Protein, welches mit anti-hsp60-Antikörpern reagiert, wird nach der Insulitisprogression weniger in den sekretorischen Granula des Insulins, dafür jedoch vermehrt im Zytoplasma oder auf der Zellmembran gefunden⁷⁸.

Prädiabetische NOD-Mäuse zeigen eine stärkere spontane T-Zellproliferation gegen humanes oder murines hsp60 als gegen mykobakterielles hsp60⁷⁹. Das dominante T-Zell Epitop ist p277⁸⁰. Es handelt sich bei p277 um ein Zielepitop, welches von der Sequenz der Aminosäuren 437 bis 460 von murinem und humanem hsp60 dargestellt wird. Humanes und Maus-p277 unterscheiden sich nur in einer Aminosäure und sind kreuzreaktiv. Bei jungen prädiabetischen NOD-Mäusen können im Gegensatz zu Diabetes-resistenten Mäusen die mit

p277 reagierenden T-Zellklone eine Hyperglykämie verursachen. Bei transgenen I- E_{α}^{d} NOD-Mäusen wurde eine zeitliche Beziehung zwischen der Immunantwort auf hsp65 des Mycobacterium leprae und der Induktion der Insulitis gezeigt⁸¹.

Eine frühzeitige Behandlung mit p277-Peptid oder rekombinantem hsp60 kann Diabetes im Tiermodell verhindern. Auch bei bereits bestehender Insulitis in prädiabetischen NOD-Mäusen konnte rekombinantes hsp60 der späteren Entwicklung eines Diabetes vorbeugen⁸². Die subkutane Applikation des humanen oder murinen p277 kann die weitere Krankheitsentwicklung sogar bei schon diabetischen NOD-Mäusen unterdrücken⁸³. Auch der durch niedrige Dosen von Streptozotocin induzierte immunmediierte Diabetes wird durch die vorherige Impfung mit p277 effektiv verhindert⁸⁴. Durch eine transgene Überexpression von murinem hsp60 im Thymus kam es bei NOD-Mäusen aber zu keiner Toleranzentwicklung und zu einer nur partiellen Hemmung der Erkrankung⁸⁵.

Bei drei Monate alten weiblichen NOD-Mäusen konnte die Behandlung mit p277 Th2-Typ-Zytokine induzieren und eine Reduktion von anti-p277 Th1-Zellen auslösen⁸⁶.

Die Regulation der hsp-Expression durch proinflammatorische Mediatoren wie Zytokine ist eher wenig bekannt. Eine hsp60-Expression wird durch eine Antwort auf IL-1 β , TNF α , IL-4, IL-6 und IL-10, wie es in einer Studie an humanen Astrozyten gezeigt werden konnte, verstärkt⁸⁷.

3. Die Rolle von Makrophagen bei der Pathogenese des Typ I Diabetes

Makrophagen sind multifunktionale Immunzellen, die eine Vielzahl verschiedener Zytokine wie auch reaktive Sauerstoffradikale, Prostaglandine, Leukotriene, Proteasen oder Lipasen sezernieren können. Ebenso zählen die Makrophagen zu den Antigen-präsentierenden Zellen, wodurch sie T-Zellfunktionen beeinflussen können⁸⁸.

Makrophagen sind im Modell zur Insulitisentstehung die ersten immuno-inflammatorischen Zellen, welche die Insel infiltrieren und eine Vorbedingung für das Einwandern von T- und B-Lymphozyten⁸⁹ darstellen. Diese frühe Phase der Infiltration mit Makrophagen wird auch als "single cell insulitis" bezeichnet⁹⁰.

Der Prozeß bis zur Manifestation eines Diabetes mellitus Typ I erstreckt sich über einige Jahre⁹¹. Anhand von Studien an NOD-Mäusen wurde ein Stufenmodell zur Enstehung des IDDM entwickelt: Zunächst kommt es in den ersten 4-10 Wochen nach der Geburt zu einer Periinsulitis, die durch eine Ansammlung von Makrophagen, dendritischen Zellen , B- und T-Lymphozyten in der Peripherie der Langerhans'schen Inseln gekennzeichnet ist. Im zweiten Schritt infiltrieren die Zellen das Innere der Inseln und man spricht dann von einer Intra-Insulitis. Zusammengefaßt werden diese beiden Stufen des Modells auch als Prädiabetes bezeichnet. Nachdem 80-90 % der Betazellmasse auf diese Weise zerstört worden sind, erfolgt die klinische Manifestation des Diabetes mellitus, die Stufe drei des Modells.

Durch eine Behandlung mit Silika, die für Makrophagen selektiv toxisch sind⁹², konnte eine Diabetesentstehung in Tiermodellen verhindert werden⁹³. Die spontane Diabetesentwicklung in BB-Ratten wurde durch die Injektion der Silikapartikel gehemmt. Die duch aktivierte Makrophagen ausgelöste in vitro Lyse von Inselzellen konnte ebenfalls mittels Silika verhindert werden.

Da in elektronenmikroskopischen Bildern kein direkter Membrankontakt zwischen Makrophagen und Inselzellen zu beobachten ist, wird die in vitro gezeigte spontane Zytotoxizität gegenüber Inselzellen⁹⁴ am ehesten durch humorale Sekretionsprodukte und nicht über Zell-Zell-Kontakte vermittelt⁹⁵. Die von den Makrophagen produzierten Zytokine und reaktiven Sauerstoffradikale haben eine zentrale Bedeutung bei der Schädigung der β-Zellen⁹¹. β-Zellen weisen eine besondere Empfindlichkeit gegenüber Sauerstoffradikalen auf⁹⁶. Zu den inselzelltoxischen Zytokinen zählt neben dem Interleukin-1 (IL-1)⁹⁷ TNFα in Kombination mit IL-1 oder IFN γ^{98} . Eine besondere Bedeutung in der Pathogenese des Diabetes mellitus Typ I kommt jedoch der Stickstoffmonoxid-Produktion der Makrophagen zu⁹⁹. Unter der Vielzahl der von aktivierten Makrophagen sezernierten Produkte zeigt das Stickstoffmonoxid (NO) eine besondere Zytotoxizität gegenüber β-Zellen⁹⁵. Aktivierte Makrophagen lysierten trotz gleichzeitig durchgeführter effektiver Neutralisation von ebenfalls sezerniertem IL-1\beta und TNF\alpha durch Verwendung entsprechender Antik\ververprechender pankreatische Inselzellen über eine Arginin-abhängige NO-Produktion. Die von den Makrophagen induzierte Lyse der Inselzellen war über eine Arginindepletion des Kulturmediums durch die Verwendung Argininantagonisten sowie des N^G-Monomethyl-L-Arginin zu hemmen. Es zeigte sich, daß auch die Zytotoxizität von IL-1β gegen die Inselzellen über NO mediiert ist und durch die Verwendung von N^G -Monomethyl-L-Arginin zu inhibieren ist¹⁰⁰.

4. Fragestellung der Arbeit

In der vorliegenden Arbeit sollte die Hypothese geprüft werden, daß humanes hsp60 immunstimulierende Eigenschaften gegenüber menschlichen Monozyten besitzt. Als Parameter der Makrophagenaktivierung diente dabei die Sekretion des entzündlichen Mediators TNFα.

Im positiven Falle sollte untersucht werden, ob der Kontakt mit hsp60 zu einer chronischen Aktivierung der Monozyten führt, oder ob gegenregulatorische Mechanismen dem entgegenwirken. Als Modell für eine solche Situation wurde die durch Endotoxin induzierte Aktivierung von Monozyten mit der nachfolgend ausgebildeten Toleranz / Resistenz gegen weitere Endotoxinstimulatoren gewählt.

Material und Methoden

I. Material

1. Zellkulturen

1.1 Medien

RPMI 1640-Medium

1 x Pulver RPMI 1640 Medium, 5 Liter;

[Gibco, Heidelberg, Deutschland].

- + 50 ml nicht-essentielle Aminosäuren (100x) [Gibco]
- + 50 ml Natriumpyruvat 100 mM [Gibco]
- + 125 mg Ampicillin
- + 600 mg Penicillin
- + 1,35 g Streptomycin
- + 50 ml L-Glutamin
- + 11,915 gHEPES
- + 120 ml NaHCO₃ (= 10 g)

Der pH-Wert wurde auf 7,2 - 7,4 eingestellt. Anschließend wurde das Medium sterilfiltriert.

Die Glukosekonzentration im RPMI 1640-Medium beträgt 11 mM.

Medium für Mono-Mac-6

RPMI 1640-Medium (s.o.)

+ OPI Media Supplement [Sigma]: 0,15 g Oxalacetat, 0,05 g Pyruvat und

0,0082 g bovines Insulin (Aktivität ca. 24 I.U./mg)

10 mg Pulver in 10 ml RPMI 1640-Medium lösen.

Diese Menge reicht für 1 l Mono-Mac-6 Medium.

+ Fetales Kälberserum, FCS [Gibco]

10 - 20 %; bei 56 °C für mind. 1 h inaktiviert.

1.2 Stimulantien und Antikörper

Die im folgenden aufgeführten Stimulantien und Antikörper für die Zellkulturexperimente wurden von den Firmen Biomol Feinchemikalien GmbH (Hamburg, Deutschland) / Stress Gen (Victoria, B.C., Canada), Bio Source International (Gießen, Deutschland) / Medgenix Diagnostics SA (Fleurus, Belgien), Biozol Diagnostica GmbH (Eching, Deutschland) / Endogen (Cambridge, USA), Merck KGaA (Darmstadt, Deutschland), Pharma Biotechnologie Hannover GmbH (Hannover, Deutschland), Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Dreisenhofen, Deutschland) und Southern Biotechnologie Association, Inc. (Birmingham, USA) bezogen.

C-Peptid [Medgenix]

Das Pulver enthielt außer Albumin keine weiteren Zusätze.

Glukose Monohydrat [Merck]

Das Glukosepulver wurde mit Medium für Mono-Mac-6 Zellen verdünnt und sterilfiltriert.

Granulocyte Macrophage Colony Stimulating Factor (GM-CSF) [PBH]

Rekombinant human (E. coli) Die 10µg GM-CSF wurden in 0,1 ml Aqua ad iniectabilia [Braun] gelöst.

60 kDa Hitzeschock-Protein (hsp60) [Biomol / StressGen]

Rekombinant human (E. coli)
Neben dem Protein enthält das Pulver 50 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl,
1 mM DTT und 0,1 mM PMSF.
200 μg hsp60-Pulver wurden in 200 μl Aqua ad iniectabilia [Braun] gelöst.

Insulin [Sigma]

Rekombinant human (E. coli) (FW = 5807,6 g/mol)

Das Insulinpulver wurde in 0,1 N HCl gelöst, danach Titration mit 1 N NaOH auf pH 7,4.

Vor dem Einsatz in der Zellkultur wurde das Stimulans sterilfiltriert.

Interferon γ (IFNγ) [Endogen]

Rekombinant human (E. coli)

Die 100 µg IFNγ wurden in RPMI 1640-Medium mit 10 % FCS gelöst.

Lipopolysaccharid (LPS) [Sigma]

von E. coli B 0.26

Proinsulin [Sigma]

Rekombinant human (E. coli) (MW = MW vom C-Peptid (human) + MW vom Insulin (human) d.h., 3617,0 + 5807,6 = 9424,6)

Die 0,1 mg Proinsulinprotein wurden in 0,01 N HCl gelöst. Die 0,01 N HCl ist zunächst sterilfiltriert worden.

Rabbit Anti-Mouse IgG, Human Absorbed

[Southern Biotechnologie Association]

Anti-Human TNF Polyclonal [Endogen]

Die Stammlösungen der Stimulantien wurden aliquotiert, bei -70 °C bis -80 °C eingefroren und bei Bedarf mit dem jeweiligen Zellkulturmedium weiterverdünnt.

Die Stimulantien veränderten den pH-Wert der Zellkultur im Experiment nicht, auch wenn sie im sauren Medium gelöst worden sind.

2. ELISA

2.1 Puffer und Lösungen

Citratpuffer (0,1 M)

5,25 g Citronensäure-Monohydrat ad 250 ml Aqua dest. mit 10 N NaOH auf pH 4,35 einstellen

Coating-Puffer (5x)

4,2 g NaHCO₃ad 100 ml Aqua dest.Endkonz. 0,5 M, pH 8,2

PBS / 2 % Milchpulver

g Milchpulver [Nestle Deutschland AG, Frankfurt a. Main]
 ml 10x PBS-Puffer
 ml Aqua dest.

PBS (10x)-Puffer

40,0 g NaCl 7,2 g Na₂HPO₄ * 2 H₂O 1,0 g KH₂PO₄ 1,0 g KCl ad 500 ml Aqua dest. mit NaOH auf pH 7,0 einstellen

Waschpuffer

100 ml 10x PBS-Puffer900 ml Aqua dest.2,5 ml 20 % Tween 20 [Merck-Schuchardt]

2.2 Antikörper

Die Antikörper für die ELISA wurden von den Firmen PharMingen GmbH (Hamburg, Deutschland) und R&D Systems GmbH (Wiesbaden, Deutschland) bezogen.

ΤΝΓα:

Purified mouse anti-human TNF-α [PharMingen] 0,5 mg/ml

Biotin mouse anti-human TNF-α [PharMingen] 0,5 mg/ml

IL-10:

Purified rat anti-human IL-10 and viral IL-10 [PharMingen] 0,5 mg/ml

Biotin rat anti-human IL-10 and viral IL-10 [PharMingen] 0,5 mg/ml

TGFβ:

Biotinylated Anti-human TGF-β1 Antibody [R&D Systems GmbH] Der Antikörper wurde in einem zuvor sterilfiltrierten Puffer aus 20 mM Trizma base und 150 mM NaCl mit 0,1 % BSA (Bovines Serum Albumin) gelöst.

Recombinant human TGF-β sRII/Fc Chimera [R&D Systems GmbH] Das Reagenz wurde in PBS mit 0,1 % BSA aufgenommen.

Recombinant Human TGF-β1 [R&D Systems GmbH] Das Protein wurde in 4 mM HCl mit 1 mg/ml BSA gelöst.

Nach dem Lösen wurden die Reagenzien portioniert und in einer Konzentration von $50 \ \mu g/ml$ bei -80 °C eingefroren.

<u>3. RT-PCR</u>

3.1 Lösungen und Puffer

Alkaline-Lysis Puffer

75 μl NaOH (0,4 M)
75 μl SDS (2 %)
mit NaOH auf pH 10,0 einstellen

Church-Buffer

125 ml Na₂HPO₄ (1 M)
1 ml EDTA (0,5 M)
175 ml SDS (20 %)

Denaturierungspuffer (2x)

120 g 1 M NaOH 525,6 g 3 M NaCl ad 3 1 VE-Wasser

DEPC-Wasser

0,1 % DEPC in VE-Wasser autoklavieren

DNA-Längenstandard (1 kb-Leiter)

20 µl	1 kb-Leiter Stamml	ösung ((6	μg/	ml)
-------	--------------------	---------	----	-----	----	---

- 40 μl 6x DNA Loading Puffer
- 180 µl TE-Puffer

LB-Medium

- 10 g Tryptone
- 5 g Yeast Extract
- 5 g NaCl

Zur Herstellung der LB-Platte wurde 15 g Agar für 1 l LB-Medium verwendet.

Neutralisations-Lösung

4,5 ml	steriles Wasser: Aqua ad iniectabilia [Braun]
2,25 ml	Natc (3 M) pH 4,9
0,75 ml	NaCl (5 M)

Neutralisierungspuffer

60 ml	5 M NaCl
40 ml	1,25 M Tris / HC

SOC-Medium

2 %	Bacto-Trypon
0,5 %	Yeast Extract
10 mM	NaCl
2,5 mM	KCl
20 mM	MgCl ₂
20 mM	Glukose

SSC (20x)

175,3 g	NaCl
88,2 g	Natriumcitrat
in 800 ml	H ₂ O lösen
mit 10 N	NaOH auf pH 7,0 einstellen
ad 11VE	-Wasser

STE (Sodium chloride, Tris, EDTA)

0,1 M	NaCl
10 mM	Tris * Cl (pH 8,0)
1 mM	EDTA (pH 8,0)

TBE (5x) (Tris-borate / EDTA electrophoresis buffer)

54 g Tris base
27,5 g Borsäure
20 ml 0,5 M EDTA (pH 8,0)
ad 11 VE-Wasser

TE-Puffer (Tris-EDTA)

10 mM Tris/HCl (pH 8,0) 1 mM EDTA

Waschpuffer zum Hybridisieren

40 mM Na₂HPO₄ 1 % SDS

3.2 Primer

Die Primer wurden bei der Firma Clontech Laboratories (Heidelberg, Deutschland) bestellt und bei erneutem Bedarf oder schon bekannter Sequenz über Eurogentec (Darmstadt, Deutschland) oder Gibco / Life Technologies (Heidelberg, Deutschland) bezogen.

Human β-Aktin [Eurogentec]

Sequenzen: 5' Primer 5'AAG CTG AGA ACC AAG ACC CAG ACA TCA AGG CG 3' 3' Primer 5'AGC TAT CCC AGA GCC CCA GAT CCG ATT TTG G 3' Fragmentlänge: 836 bp Clontech-Primer

Human Interleukin-10 (IL-10) Amplimer Set [Clontech]

Sequenzen:

5' Primer	5'AAG CTG AGA ACC AAG ACC CAG ACA TCA AGG CG 3'
3' Primer	5'AGC TAT CCC AGA GCC CCA GAT CCG ATT TTG G 3'

Fragmentlänge: 328 bp Clontech-Primer¹⁰¹

Human Interleukin-12 p35 (IL-12p35) [Eurogentec]

Sequenzen:

5' Primer 5'TTC GGG CAG TGA CTA TTG AC 3'

3' Primer 5'TGA TCA GAG GTA TCA TGT GG 3'

Fragmentlänge: 186 bp

Human Interleukin-12 p40 (IL-12p40) [Eurogentec]

Sequenzen:

5' Primer 5'AAT TCT CGG CAG GTG GAG GT 3'

3' Primer 5'TAA CTG CAG GGC ACA GAT CG 3'

Fragmentlänge: 245 bp

Human Interleukin-15 (IL-15) [Gibco]

Sequenzen:	
5' Primer	5'TGA AGT GCT TTC TCT CTT GG 3'
3' Primer	5'TCC TCA CAT TCT TTG CAT CC 3'
Fragmentläng	e: 150 bp

Human Interleukin-18 (IL-18) [Gibco]

Sequenzen:

5' Primer 5'CCT GGA ATC AGA TTA CTT TGG CAA GC 3'
3' Primer 5'CAC AGA GAT AGT TAC AGC CAT ACC TCT AGG 3'
Fragmentlänge: 210 bp

Human Tumor Necrosis Factor-a (TNFa) Amplimer Set [Clontech]

Sequenzen:

5' Primer	5'GAG TGA CAA GCC TGT AGC CCA TGT TGT AGCA 3'	
3' Primer	5'GCA ATG ATC CCA AAG TAG ACC TGC CCA GAC T 3'	
Fragmentlänge: 444 bp		

Es war nicht notwendig vor der PCR einen DNase-Verdau zu machen, da entweder kein zweites PCR-Produkt entstand oder eines mit einer anderen Größe.

Die Primer von Gibco und Eurogentec wurden mit DEPC / H_2O auf eine Konzentration von 10 bis 20 pmol/µl eingestellt. Die von Clontech bezogenen Primer wiesen bereits eine Konzentration von 20 µM auf.

Programm für β -Aktin, IL-10 und TNF α

Anzahl der Zyklen: 36

Annealing Temp.: 60 °C

Zieltemp.:	Segmentdauer im 1. Zyklus	Segmentdauer 2 36. Zyklus
94 °C	3 min	45 sec
60 °C	45 sek	45 sec
72 °C	1 min 20 sec	1 min 20 sec
0 °C	0 sec	0 sec

Programm für IL-12 p40

Anzahl der Zyklen: 40

Annealing Temp.: 57 °C

Zieltemp.:	Segmentdauer im 1. Zyklus	Segmentdauer 2 40. Zyklus
94 °C	5 min	1 min
57 °C	1 min	1 min
72 °C	1 min 30 sec	1 min
0 °C	0 sec	0 sec

Programm für IL-15 und IL-18

Anzahl der Zyklen: 36

Annealing Temp.: 43 °C

Zieltemp.:	Segmentdauer im 1. Zyklus	Segmentdauer 2 40. Zyklus
94 °C	1 min	1 min
43 °C	1 min	45 sec
72 °C	2 min	30 sec
0 °C	0 sec	0 sec

Programm für IL-12 p35

Anzahl der Zyklen: 40

Annealing Temp.: 53 °C

Zieltemp.:	Segmentdauer im 1. Zyklus	Segmentdauer 2 40. Zyklus
94 °C	5 min	1 min
57 °C	1 min	1 min
72 °C	2 min	1 min
0 °C	0 sec	0 sec

Ab dem zweiten Zyklus wurden die Segmente eins bis drei um jeweils zwei Sekunden pro Zyklus verlängert.

4. Substanzen

Die im folgenden aufgeführten Substanzen und Chemikalien wurden von den Firmen AGS GmbH (Heidelberg, Deutschland), Biozym Diagnostik GmbH (Hess. Oldendorf, Deutschland), Boehringer GmbH (Mannheim, Deutschland), Dianova-Immunotech GmbH (Hamburg, Deutschland), Gibco / Life Technologie GmbH (Eggenstein, Deutschland), ICN Biomedicals GmbH (Eschwege, Deutschland), Merck KGaA (Darmstadt, Deutschland), Roth (Karlsruhe, Deutschland), Serva (Heidelberg, Deutschland), Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Dreisenhofen, Deutschland) und Stratagene GmbH (Heidelberg, Deutschland) bezogen.

ABTS, 2,2'-Azino-bis(3-Ethylbenzo-Thiazoline-6-Sulfonic Acid)Diammonium Salt [Sigma] Agarose, Qualex Gold Agarose [AGS GmbH] (alpha-³²P) dATP a 250 µCi [ICN] Avidin-Peroxidase [Dianova-Immunotech] Chloroform [Merck] Diethylpyrokarbonat (DEPC) [Serva] dNTP Mix (10 mM): dATP, dGTP, dCTP und dTTP [Gibco] DTT (0,1 M) [Gibco] Ethanol [Merck] Ethidiumbromid [Roth] Farbstoff 6x DNA (Bromcresylblau, Ficoll) = Blaumarker = 6x DNA Loading Puffer 5x First Strand Buffer [Gibco]: 250mM Tris-HCl (pH 8,3) 375 mM KCl 15 mM MgCl₂ Fetales Kälberserum, FCS [Gibco] Glykogen [Boehringer] Isopropanol [Merck] 1 kb-Leiter, DNA-Längenstandard [Life Technologie] Lysozym (Muramidase) [Merck]

 $MgCl_2$ (50 mM) [Gibco] Mineralöl, light white oil [Sigma] Oligo $(dT)_{12-18}$ (500 µg/ml) [Gibco] 10x PCR Buffer minus Mg [Gibco]: 200 mM Tris-HCl (pH 8,4) 500 mM KCl Polymyxin B Sulfate [Sigma] Prime-lt II Random Primer Labeling Kit [Stratagene]: Klenow-Enzym **Random Primer** Stop-Mix RNA Isolierungskit für Zellkulturen R-5500 A, Purescript [Biozym]: Lysepuffer (Cell Lysis Solution) Protein-DNA-Prezipitationslösung (Protein-DNA Precipitation Solution) RNA-Hydrationslösung (RNA Hydration Solution) RNase Inhibitor [Life Technologie] RNasin Ribonuklease Inhibitor [Boehringer] Superscript II RNase H⁻ Reverse Transcriptase (200 U/µl) [Gibco] TaqDNA Polymerase (5 U/µl) [Gibco] TRIzol Reagent, Total RNA Isolation Reagent [Gibco] Trypanblaulösung, Trypan blue stain 0,4 % [Gibco] Wasserstoffperoxid 30 % [Merck]

II. Methoden

1. Zellkulturen

<u>1.1 Mono-Mac-6 Kultur</u>

Die Mono-Mac-6 Zellen wurden in einem Brutschrank [Heraeus] bei 37 °C in einer feuchten 5 %igen Kohlendioxid-Atmosphäre kultiviert. Sie wuchsen in einer 24-Well-Platte [Falcon, Becton Dickinson Labware, Heidelberg, Deutschland].

Die Kultur wurde anfangs täglich und später jeden zweiten Tag mikroskopisch kontrolliert. So konnte man eine grobe Verunreinigung mit Pilzen oder LPS ausschließen. LPS führt ab einer Konzentration von 10 ng/ml bei den Mono-Mac-6 Zellen zu einer mikroskopisch sichtbaren Verklumpung der Zellen¹⁰². Die Kultur wurde regelmäßig mittels des Mycoplasma Detection Kits [Boehringer] auf Mykoplasmen getestet.

Die Mono-Mac-6 Kultur wurde einmal pro Woche umgesetzt. Dazu wurden die Zellen zusammen mit ihrem Medium in 15 ml Röhrchen [Falcon] pipettiert. Die Wells wurden sorgfältig mit Medium nachgespült. Die Röhrchen wurden für fünf Minuten bei 200 g zentrifugiert. Der Überstand wurde bis auf wenige Millimeter über dem weißlichen Zellpellet abgesaugt. Nun wurden 2 ml Medium für Mono-Mac-6 in das Röhrchen gegeben und das Pellet darin gleichmäßig aufgewirbelt.

Die Zellzählung erfolgte in einer Neubauer-Zählkammer. Die Zellen wurden mit Trypanblaulösung [Gibco] angefärbt: Zu 180 µl 1 : 4 mit NaCl verdünntem Trypanblau wurden 20 µl der Zellsuspension gegeben. Die toten Zellen färben sich aufgrund ihrer gestörten Membranintegrität blau an, hingegen die lebenden, für die Zählung relevanten Mono-Mac-6 Zellen, den Farbstoff aktiv ausschließen und somit farblos bleiben. Es wurden grundsätzlich zwei Werte in der Neubauer-Zählkammer ausgezählt. Der daraus errechnete Mittelwert wurde der weiteren Berechnung zugrunde gelegt.

Für die Zellkultur wurden in acht mittig gelegene Wells jeweils 2 ml Medium für Mono-Mac-6 pipettiert. Dann wurde insgesamt 1 ml Zellen der Konzentration 1 x 10^6 Zellen / ml aliquot auf diese Wells verteilt. Die Verdoppelungszeit der Mono-Mac-6 Zellen betrug ca. zwei Tage. In der folgenden Graphik ist die Wachstumskurve der Zellen dargestellt. Die Abbildung gibt die Zellzahl pro Well und Tag im Verlaufe einer Woche (angegeben in Stunden) an.



Abb. 1: Wachstumskurve Mono-Mac-6 Zellen

Dargestellt sind Mittelwerte von 3 Ansätzen ± Standardabweichung.

1.2 Vollblutkultur

Das Blut wurde von gesunden Probanden mit einem Heparinröhrchen (NH₄-Heparin Monovette [Sarstedt]) abgenommen. Anschließend wurde es 1 : 5 mit RPMI / 10 % FCS verdünnt und auf eine 24-Well-Platte [Falcon] verteilt. Die Kultur wurde in einen Brutschrank [Heraeus] bei 37 °C in eine Atmosphäre mit einem Gehalt von 5 % Kohlendioxid gestellt. Für jedes Experiment wurde erneut Blut abgenommen und kultiviert, um einen optimalen Anfangszustand der Zellen zu gewährleisten.
1.3 Aufbau des Stimulationstests

Die Mono-Mac-6 Zellen wurden genauso gewaschen und gezählt wie es in dem Kapitel "Mono-Mac-6 Kultur" (s. 1.1) beschrieben ist. Die Experimente wurden alle in einer 24-Well-Platte [Falcon] angesetzt. Bei einem Versuchsansatz wurden 500 μ l mit 2 x 10⁶ Zellen / ml in ein Well gegeben. Um eine optimal gleichmäßige Verteilung der Zellen zu gewährleisten, wurden zunächst 250 μ l in jedes Well pipettiert und in einem zweiten Schritt auf 500 μ l aufgefüllt.

Die Zellkulturplatte wurde mit den Zellen für zwei bis fünf Stunden in den Brutschrank gestellt, damit sich die Zellen von dem Waschvorgang erholen konnten (vgl. Abb. 2).



Abb. 2: Zeitlich zum Waschen versetzte Stimulation

Mono-Mac-6 Zellen wurden zum einen **direkt nach dem Waschen** und zum anderen **nach 5 h Ruhezeit im Brutschrank** stimuliert. Als Stimulans wurden 100 ng/ml LPS eingesetzt. Als Negativkontrolle diente das Medium für Mono-Mac-6 (K0). Gezeigt werden Mittelwerte der TNF α -Spiegel im Überstand nach 5 h Stimulation mit LPS aus 3 Ansätzen ± Standardabweichung.

Nach dieser Ruhezeit wurde 500 µl raumtemperiertes Stimulans (ca. 21 °C) in der gewünschten Konzentration pro Well dazugegeben. Als Negativkontrolle diente in jedem

Experiment mit Mono-Mac-6 Zellen das Medium für Mono-Mac-6 als Stimulantienersatz, wobei auch hier auf die Raumtemperatur des Mediums zu achten war. Als Positivkontrolle wurde LPS als Stimulans genutzt. Der Versuchsansatz wurde nun die gewünschte Zeit in den Brutschrank gestellt.Der Inhalt der einzelnen Wells wurde in Eppendorfgefäße umgefüllt und fünf Minuten bei 2000 U/min, welches in der benutzten Eppendorf-Zentrifuge 200 g entspricht, zentrifugiert. Es wurden 650 µl Überstand entnommen und bei -20 °C in einem Tiefkühlschrank eingefroren.

Die Vollblutkulturversuche wurden ähnlich diesem System angesetzt. In ein Well der 24-Well-Zellkulturplatte wurden 200 µl frisch entnommenes Vollblut gegeben und 300 µl RPMI 1640-Medium mit 10 % FCS hinzugefügt. Nach zwei Stunden Erholungszeit im Brutschrank wurden 500 µl Stimulans, gelöst in RPMI / 10 % FCS, zu dem Ansatz gegeben. Als Negativkontrolle diente ein RPMI 1640-Medium mit 10 % FCS. Als Positivkontrolle wurde wiederum LPS benutzt.

2. ELISA für Zytokine

Nachfolgend wird die generelle Arbeitsanleitung für einen ELISA vorgestellt. Die Antikörperkonzentrationen, die Standardreihe sowie eventuelle Verlängerungen der Inkubationszeiten werden in den speziellen Kapiteln (s. 2.1 bis 2.3) beschrieben.

Zunächst wurde die ELISA-Platte, F96 Maxisorp Nunc-Immuno Plate [Nunc, Wiesbaden bzw. Fisher Scientific GmbH, Düsseldorf, Deutschland] mit dem ersten Antikörper beschichtet. Dazu wurde 1 ml 5x Coating-Puffer mit 4 ml Aqua dest. gemischt, so daß ein 1x Puffer entstand. Anschließend wurde der jeweilige Antikörper in einem bestimmten Verhältnis (s.u.) dem Puffer beigefügt. Nach gutem Durchmischen wurden 50 µl pro Well verteilt. Die Platte wurde dann für 1 Stunde bei 37 °C oder ca. 18 Stunden bei 4 °C inkubiert. Nach der Inkubation wurde die ELISA-Platte zweimal mit dem Waschpuffer, PBS mit 20 % Tween 20, für jeweils zwei Minuten auf dem Schüttler gewaschen.

Der ELISA wurde mit PBS / 2 % Milchpulver blockiert, indem man jeweils 200 μ l davon mit Hilfe einer Mehrkanalpipette in ein Well gab und die Platte danach 30 Minuten bei 37 °C inkubierte.

Danach wurde die ELISA-Platte zweimal zwei Minuten mit dem Waschpuffer auf dem Schüttler gewaschen.

Der nächste Arbeitsschritt war die Bindung von Standard und Proben. Man gab 50 µl des zu untersuchenden Überstandes in je ein Well. Zur besseren Kontrolle wurden mindestens Doppelwerte erhoben. Der Standard wurde genau die wie Kontrolle in RPMI 1640-Medium mit 10 % FCS verdünnt. Man pipettierte 100 µl Standard in die Wells B1 und B2. In die weiteren Wells wurden 50 µl RPMI 1640-Medium mit 10 % FCS vorgelegt, so daß sich mit einer Mehrkanalpipette eine Verdünnungsreihe herstellen ließ. Die Kontrolle wurde ebenfalls als Doppelwert angelegt. Anschließend wurde die Platte für 30 Minuten bei 37 °C inkubiert.

Nach der Inkubation wurde die ELISA-Platte viermal mit dem Waschpuffer für jeweils zwei Minuten auf dem Schüttler gewaschen.

Der biotinylierte Antikörper wurde in PBS / 2 % Milchpulver aufgenommen. Es wurden 50 μ l dieser Mischung in ein Well gegeben und für 30 Minuten bei 37 °C inkubiert.

Die ELISA-Platte wurde anschließend viermal zwei Minuten mit dem Waschpuffer auf dem Schüttler gewaschen.

Zur Vorbereitung der Farbreaktion wurden 50 μ l Avidin-Peroxidase aufgenommen in PBS / 2 % Milchpulver pro Well verteilt. Die ELISA-Platte wurde für 30 Minuten bei 37 °C inkubiert.

Nach der Inkubation wurde die ELISA-Platte fünfmal mit dem Waschpuffer für jeweils zwei Minuten auf dem Schüttler gewaschen. Danach wusch man sie für weitere zwei Minuten mit Citratpuffer auf dem Schüttler.

Für die Farbreaktion wurden 1 mM ABTS, das entspricht 0,55 mg/ml, in Substratpuffer gelöst. Der Substratpuffer bestand aus 10 ml Citratpuffer und 10 μ l Wasserstoffperoxid (H₂O₂) für eine ELISA-Platte. Bei der Zugabe von H₂O₂ startete die Farbreaktion sofort. Es wurden

100 µl dieser Färbelösung auf jeweils ein Well pipettiert.

Die Auswertung erfolgte mit Hilfe des Photometers (Titertek Multiskan® MCC), indem man die Extinktion bei 405 nm gegen eine Referenzwellenlänge von 492 nm bestimmte.

Anhand der Standardkurve ließ sich die Konzentration des in dem Überstand untersuchten Zytokins ausrechnen.

2.1 ELISA für TNFα

Der erste Antikörper wurde 1 : 250 verdünnt in dem Coating-Puffer aufgenommen.

Die Standardreihe reichte von 5 ng/ml bzw. 2,5 ng/ml bis 4,9 pg/ml.

Die Kontrolle betrug 0,5 ng/ml.

Der zweite, biotinylierte Antikörper wurde 1 : 500 mit PBS / 2 % Milchpulver verdünnt.

Die Avidin-Peroxidase wurde in einer Verdünnung von 1 : 1000 eingesetzt.

2.2 ELISA für IL-10

Bei dem ELISA für IL-10 wurden die Inkubationszeiten von 30 Minuten auf 45 Minuten verlängert.

Der erste Antikörper wurde 1 : 1000 verdünnt in dem Coating-Puffer aufgenommen.

Die Standardreihe reichte von 50 ng/ml bis 0,1 ng/ml. Die Kontrolle betrug 1 ng/ml.

Der zweite, biotinylierte Antikörper wurde 1 : 500 mit PBS / 2 % Milchpulver verdünnt.

Die Avidin-Peroxidase wurde 1:500 verdünnt eingesetzt.

2.3 ELISA für TGFβ

Das Capture Reagent, welches dem ersten Antikörper entspricht, wurde 1 : 500 mit Coating-Puffer verdünnt. Es wurden 100µl pro Well verteilt und für zwei Tage bei 4 °C inkubiert. Nach der Inkubation wurde die ELISA-Platte dreimal mit dem Waschpuffer für jeweils zwei Minuten gewaschen.

Die Inkubationszeit zum Blockieren mit PBS / 2 % Milchpulver wurde auf 1,5 Stunden verlängert. Die Platte wurde nach diesem Schritt dreimal jeweils zwei Minuten lang gewaschen.

Die Standardreihe reichte von 2000 pg/ml bis 7,8 pg/ml. Die Kontrolle betrug 100 pg/ml.

Der zweite Antikörper wurde 1 : 500 in PBS / 2 % Milchpulver aufgenommen, 100 μ l pro Well verteilt und für zwei Stunden inkubiert.

Die Avidin-Peroxidase wurde 1:500 verdünnt. Die Platte wurde für 45 Minuten inkubiert.

3. RT-PCR

Die für die RT-PCR benutzten Pipettenspitzen wurden mit Handschuhen gesteckt und anschließend ebenso wie die Gefäße autoklaviert, um die Kontamination mit RNasen zu minimieren. Außerdem wurden bei allen Arbeitsschritten, in denen RNA durch Hautkontakt zerstört werden konnte, Einmalhandschuhe getragen.

3.1 Isolation der RNA

a) Isolation der RNA aus Mono-Mac-6 Zellen

Die folgenden Angaben zur RNA-Isolierung aus Mono-Mac-6 Zellen gelten für 1 bis 2×10^{6} Zellen / ml. Für die Isolation wurde das Purescript RNA-Isolierungskit [Biozym] benutzt.

Die zu untersuchenden Mono-Mac-6 Zellen wurden zusammen mit ihrem Medium in ein 15 ml Röhrchen [Falcon] überführt. Die Wells der Zellkulturplatte wurden mehrmals mit Medium nachgespült, welches ebenfalls in das Röhrchen pipettiert wurde. Die Zellkulturplatte wurde unter dem Mikroskop visuell kontrolliert, um sicher zu gehen, daß keine größeren Zellmengen in den Wells zurückblieben. Die Zellen wurden bei 200 g für fünf Minuten zentrifugiert (Omnifuge 2. ORS, Heraeus). Danach war ein deutliches Pellet am Boden des Gefäßes sichtbar. Der Überstand wurde abgesaugt. Aus praktischen Gründen überführte man die Zellen nun in ein Eppendorfgefäße samt Mono-Mac-6 Zellen wurden für fünf Minuten bei 200 g zentrifugiert (Eppendorf-Zentrifuge 5415 C). Ab diesem Arbeitsschritt waren Handschuhe zu tragen, da die RNasen, die jeder Mensch auf der Haut hat, die Isolation und die folgende PCR beeinträchtigen können. Der Überstand wurde abgesaugt. Auf das Pellet wurden 300 µl Lysepuffer gegeben. Mit einer Pipette wurde der Inhalt der Eppendorfhütchen mit dem Ziel einer intensiven mechanischen Durchmischung dreimal hoch und herunter

gezogen, zweimal langsam und das dritte Mal schnell. Die Lyse der Mono-Mac-6 Zellen war zu beobachten.

Es bestand nun die Möglichkeit, die lysierten Zellen bei -20 °C für ein bis zwei Tage einzufrieren, ehe man die Isolation fortsetzte. Die Nutzung dieser Möglichkeit empfiehlt sich bei Kinetikexperimenten.

Die Proben wurden in Eiswasser gestellt. Auf die Lösung wurde 100 μ l Protein-DNA-Prezipitationslösung mit gestopften Spitzen (ART Aerosol Resistent Tips [Molecular Bio Products, San Diego, Californien, USA] oder ART20 Pipet Tips [Gibco]) pipettiert. Das Eppendorfgefäß wurde zehnmal kräftig per Hand geschüttelt und dann für fünf Minuten in ein Eisbad gestellt. Anschließend wurden die Eppendorfgefäße mit den Proben für 15 Minuten bei 15 * 1000 min⁻¹ in der Eppendorf-Zentrifuge zentrifugiert. In neue Eppendorfgefäße wurde derweil entsprechend der Anzahl zu untersuchender Proben je 300 μ l Isopropanol gegeben.

Der Überstand aus den zentrifugierten Eppendorfgefäßen wurde vorsichtig in das Isopropanol gegossen. Der noch verbliebene Überstand wurde sorgfältig unter Vermeidung einer Aufwirbelung des weißlich-flockigen Bodensatzes, dem ausgefallenen Protein, mit gestopften Spitzen abgenommen und ebenfalls in das Isopropanol gegeben. Der Bodensatz wurde verworfen. Die Gefäße, die das Isopropanol und den Überstand enthielten, wurden fünfzigmal geschüttelt und für zehn Minuten bei 15 * 1000 min⁻¹ in der Eppendorf-Zentrifuge zentrifugiert.

Nach diesem Arbeitsschritt war das RNA-Pellet als sehr kleiner, strichförmig gelblicher Niederschlag zu erkennen. Der Überstand wurde unter Beachtung des haftenden Pellets abgegossen. Nun wurden 300 μ l DEPC / 70 % EtOH auf die Proben pipettiert. DEPC hemmt die RNasen. Die Substanzen wurden gut durch Schütteln gemischt und für fünf Minuten bei 15 * 1000 min⁻¹ in der Eppendorf-Zentrifuge zentrifugiert.

Der Überstand wurde abgegossen und die Eppendorfgefäße wurden auf dem Kopf stehend in einer mit Küchenkrepp ausgekleideten Wanne für 10 bis 15 Minuten luftgetrocknet.

Mit gestopften Pipettenspitzen wurden jeweils 40 μ l RNA-Hydrations-Lösung in die Eppendorfgefäße gegeben. Es war darauf zu achten, daß die Eppendorfhütchen so lange gevortext wurden, bis der RNA-Pellet völlig gelöst war. Erst dann wurden sie bei -80 °C eingefroren.

b) Isolation der RNA aus Vollblut

Die Vollblut-RNA wurde mit Hilfe des Trizol Reagent isoliert. Die folgende Anleitung gilt für 5 bis 10×10^6 Zellen.

Die Vollblutexperimente, in denen man die RNA isolieren wollte, wurden bevorzugt in 24-Well-Platten angesetzt. In einem Well befand sich 1 ml 1 : 5 mit RPMI / 10 % FCS verdünntes Vollblut. Für die Isolation benötigte man zwei Wells, um eine ausreichende Zellzahl zu erreichen. Die Zellen wurden unter Zugabe von 1 ml Trizol Reagent lysiert. Die Suspension wurde zur Durchmischung mehrmals in der Pipettenspitze auf und ab gezogen. Der Inhalt der Wells nahm verursacht durch das nun freiwerdende Hämoglobin eine dunkelbraune Farbe an. Die lysierten Zellen wurden in Röhrchen (PPN-Röhrchen 14,0 ml [Greiner Labortechnik, Frickenhausen, Deutschland]) überführt, wobei die Wells gründlich mit Medium nachgespült wurden. Die Röhrchen wurden nach diesem Arbeitsschritt bei -80 °C eingefroren. Bis auf den Kinetikversuch wurde die Isolation aber ohne Unterbrechung weitergeführt.

Nach der Lyse folgte die Trennung der Phasen. Die Gefäße wurden für fünf Minuten bei Raumtemperatur stehengelassen. Es wurden unter dem Abzug 0,2 ml Chloroform hinzugefügt. Dann wurden die Gefäße kräftig für 15 Sekunden von Hand geschüttelt und für zwei bis drei Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Bei einer Temperatur von 4 °C wurden die Röhrchen für 15 Minuten bei 12 000 g zentrifugiert (RC5C, Sorvall Instruments). Nun waren drei verschiedene Phasen sichtbar; eine rote Phenol-Chloroform Phase am Boden des Gefäßes, eine Interphase und eine farblose, wässrige Oberphase. Die zu isolierende RNA befindet sich ausschließlich in der wässrigen Oberphase.

Um die RNA auszufällen, wurde die Oberphase in ein Eppendorfgefäß überführt. Den größeren Anteil dieser Phase konnte man vorsichtig in das frische Hütchen abgießen, der Rest wurde mit einer gestopften Pipettenspitze abgenommen, ohne dabei Teile der Interphase zu berühren. Die anderen Phasen wurden verworfen. Zu der farblosen, wässrigen Flüssigkeit wurden 0,5 ml Isopropanol gegeben. Die Eppendorfhütchen wurden für zehn Minuten auf Eis inkubiert. Um aus der gegebenen Zellzahl die optimale Menge an RNA zu erhalten, fügte man 1 μ l Glykogen mit der Konzentration 1 mg/ml als Fällungshilfe hinzu. Bei weiteren Isolierungen wurden vorteilhaft bis zu 5 μ l Glykogen verwendet. Die Eppendorfgefäße

wurden bei 4 °C für zehn Minuten bei 12 000 g zentrifugiert. Nun war die RNA als kleiner Pellet am Boden des Gefäßes sichtbar.

Der Überstand wurde abgegossen und verworfen. Die RNA wurde gewaschen, indem 1 ml 75 % Ethanol in DEPC-Wasser auf den Pellet gegeben und das Gefäß gevortext wurde. Danach wurde das Eppendorfhütchen bei 4 °C für fünf Minuten bei 7500 g zentrifugiert.

Nun wurde die RNA wieder gelöst. Zunächst goß man den Überstand ab und ließ die Gefäße für ca. 15 Minuten lufttrocknen. Dann fügte man 40 µl DEPC-Wasser hinzu.

Der Meßvorgang entspricht dem für die RNA aus Mono-Mac-6 Zellen (vgl. Kapitel 3.2).

3.2 Messen der RNA

Die Menge und die Qualität der isolierten RNA wurden mit Hilfe des Spektrometers (Beckmann Du[®]650 Spectrometer) bestimmt. Ein Computerprogramm errrechnete aus der Extinktion sowohl die Konzentration der RNA als auch die Ratio. Bei 260 nm wurden nur Nukleinsäuren und bei 280 nm Nukleinsäuren und Protein gemessen. Die Ratio entsprach dem Ergebnis der Division des Wertes bei 260 nm durch den bei 280 nm. Im Idealfall beträgt sie 2,0. Akzeptiert wird eine Ratio bis 1,6. Falls sie darunter gelegen hätte, wäre es notwendig gewesen, die RNA aufzureinigen.

Zunächst wurde der Leerwert mit DEPC-Wasser bestimmt. Dann wurden mit einer Pipette 4 µl der in RNA-Hydratationslösung bzw. in DEPC-Wasser gelösten RNA-Probe in die Kapillare gegeben. Nach jeder Probe wurde die kleine Kapillare zwei- bis dreimal mit DEPC-Wasser durchgespült und ein neuer Leerwert bestimmt.

Nach dem Meßvorgang wurden $1/10}$ des Ausgangsvolumens der Probe 0,1 M DTT hinzugefügt, d.h., bei einem Probenvolumen von 40 µl abzüglich 4 µl zum Messen wurden 4 µl 0,1 M DTT nach dem Messen hinzugegeben. Außerdem wurden 0,5 µl RNasin hinzugefügt. Die Mischung wurde kurz zentrifugiert und bei -80 °C eingefroren.

3.3 RT-Ansatz

Bevor die Substanzen für den RT-Ansatz zusammengefügt wurden, war es notwendig, anhand der Meßergebnisse zu errechnen, wie viel DEPC-Wasser man im Verhältnis zur Probenmenge

nehmen mußte. Für einen RT-Ansatz wurden 1 μ g RNA eingesetzt. Die RNA sollte zusammen mit dem DEPC-Wasser ein Volumen von 11,5 μ l ergeben.

Zuerst wurde die errrechnete Menge DEPC-Wasser in ein Eppendorf- bzw. ein PCR-Gefäß pipettiert. Dazu gab man 4 μ l 5x RT-Puffer. Dann fügte man nacheinander 2 μ l 0,1 M DTT, 0,5 μ l RNasin, 1 μ l Oligo(dT), 1 μ l dNTP's und die errechnete Probenmenge RNA hinzu. Insgesamt hatte der RT-Ansatz nun ein Volumen von 20 μ l. Man vereinigte die Substanzen durch kurzes Zentrifugieren.

Der RT-Ansatz wurde fünf Minuten lang bei 65 °C inkubiert. Anfangs wurde für diesen Arbeitsgang ein Programm der PCR-Maschine (Perkin Elmar Cetus) genutzt, später ein Wasserbad oder ein Thermostat (Thermostat 5320 oder Thermomixer 5436 [Eppendorf]). Nach dem Erhitzen wurde das Eppendorfhütchen bzw. beim Benutzen der PCR-Maschine das PCR-Gefäß auf Eis gestellt. Es wurde 1 μ l Superscript II Reverse Transcriptase hinzupipettiert. Der RT-Ansatz wurde für eine Stunde bei 42 °C inkubiert. Für diesen Schritt konnte man neben der PCR-Maschine auch oben genannte Geräte benutzen.

Der fertige RT-Ansatz wurde bei -20 °C eingefroren.

<u>3.4 PCR</u>

Für einen PCR-Ansatz benötigte man 67,5 μl DEPC-Wasser, 8 μl 10x PCR-Puffer, 2,5 μl 50 mM MgCl₂ und jeweils 1 μl des 3' und 5' Primers in einer Konzentration zwischen 10 und 20 pmol/μl. Die Substanzen wurden kurz zentrifugiert und auf den 20 μl RT-Ansatz gegeben. Danach gab man 80 μl Mineralöl, das die Proben vor dem Austrocknen schützte, auf den PCR-Ansatz. Die Proben wurden bei 78 °C in den PCR-Block gesetzt (Perkin Elmer Cetus, DNA Thermal Cycler 480). Man spricht von einem sogenannten "hot start". Es wurden 0,5 μl der TaqDNA-Polymerase durch die Ölphase auf den Grund der Probe pipettiert. Die Anzahl der Zyklen richtete sich nach dem eingesetzten Primer.

In dieser Arbeit wurde jedoch das Ansetzen kleinerer Mengen bevorzugt. Ausgehend von einem RT-Ansatz konnte man vier PCR machen. Dazu nahm man ¹/₄ der oben angegebenen Volumenmengen und mindestens zehn Ansätze, um eine pipettierbare Menge an TaqDNA-Polymerase hinzugeben zu können. Häufig wurden jedoch noch mehr Proben angesetzt. Nach dem kurzen Zentrifugieren wurden 1,25 µl TaqDNA-Polymerase dem Ansatz hinzugefügt.

Nachdem die Substanzen kurz gevortext und wieder zentrifugiert worden waren, wurden jeweils 20 μ l auf 5 μ l RT-Ansatz verteilt. 80 μ l Mineralöl wurden nachfolgend auf jeweils einen Ansatz pipettiert. Die Proben wurden wie oben beschrieben bei 78 °C in den PCR-Block gesetzt.

Die Proben wurden nach den PCR-Zyklen bei 4 °C im Kühlschrank aufbewahrt.

3.5 Agarose-Gel

Das Agarose-Gel bestand aus 1 - 1,5 % Agarose, 0,002 % Ethidiumbromid und 0,5x TBE-Puffer, wobei sich diese Angabe auf die Endkonzentration des Laufpuffers im Gel bezieht. Für ein Gel mit einem Volumen von 50 ml wurden 0,5 bis 0,7 g Agarose abgewogen und 5 ml 5x TBE-Puffer hinzugefügt. Das verbleibende Volumen wurde mit VE-Wasser aufgefüllt. Diese Mischung wurde für zwei Minuten in der Mikrowelle zum Kochen gebracht. Während die Agarosemasse unter Rühren (Magnetrührer) abkühlte, ließen sich die Proben vorbereiten, indem je 10 µl PCR-Probe unter dem Öl herauspipettiert und in Eppendorfgefäße gegeben wurden.

Zu der ca. 60 °C warmen Agarose wurde 1 µl Ethidiumbromid hinzugefügt. Da es sich bei Ethidiumbromid um eine kanzerogene Substanz handelt, wurde dieser Arbeitsschritt unter Beachtung entsprechender Sicherheitsmaßnahmen mit Handschuhen und unter dem Abzug vorgenommen. Die Masse wurde nochmals für ca. ½ Minute auf den Magnetrührer gestellt, damit sich das Ethidiumbromid gut verteilte. Das Gel wurde in eine Plastikschale mit einem darin stehenden Kamm gegossen. Hierbei mußte beachten werden, daß der Kamm nicht den Boden der Schale berührte und daß keine Luftblasen im Gel waren.

Nachdem das Agarose-Gel abgekühlt und fest war, wurde der Kamm vorsichtig herausgezogen.

Zu den vorbereiteten Proben wurde 6x DNA-Farbstoff gegeben. Dieser enthält Bromcresylblau, damit die Lauffront zu sehen ist, sowie Ficoll, damit die Probe schwerer wird und in den Slots bleibt. Das Verhältnis von Farbstoff zu Probe sollte 1 : 6 betragen. Es wurden je 2 μ l Farbstoff zu 10 μ l Probe pipettiert.

Das Gel wurde waagerecht samt Schale in die Elektrophoresekammer, die mit 0,5x TBE-Puffer gefüllt war, gelegt. Die Proben wurden vorsichtig über die Slots pipettiert, in die sie dann hineinliefen. Neben den zu untersuchenden Proben lief ebenfalls DNA-Längenstandard mit im Gel.

Die Pole der Elektrophoresekammer wurden angeschlossen und das Agarose-Gel wurde für 1 bis 2 ¹/₂ h bei 80 bis 100 V laufen gelassen.

Die qualitative Auswertung des Agarose-Gels erfolgte mit Hilfe eines UV-Strahlen-Leuchttisches [Vilber-Lourmat, Marne la Valee, Frankreich]. Das Gel wurde vorsichtig mit einem Skalpell aus der Schale gelöst und auf die Glasplatte des Gerätes gelegt. Nach dem Anschalten leuchteten die Banden grünlich auf. Das Ergebnis ließ sich mit einem Spezialfilm (Polaroid Film 667, T.T.T. Filmservice, Heilbronn, Deutschland) photographieren oder kostengünstiger mit einer Videokamera mit angeschlossenem Drucker (Gel Print 1000i [Bio Photonics® Co.], Black and White Monitor SSM-930CE und Video Graphic Printer LIP-890CE [Sony]) festhalten.

3.6 Blotten

Vor dem Blotten wurde das Agarose-Gel zurechtgeschnitten. Die Laufspur des 1 kb-Markers sowie der Bereich unterhalb der leuchtenden Banden wurden mit dem Skalpell abgetrennt und verworfen.

Das Gelstück wurde in einer Wanne für 20 bis 30 Minuten in 1x Denaturierungspuffer auf dem Schüttler gewaschen.

Anschließend wurde das Gelstück für 20 bis 30 Minuten in Neutralisierungspuffer geschwenkt.

Während dessen wurden vier Lagen Filterpapier und eine Nylonmembran im Ausmaß des Blots zurechtgeschnitten. Die Nylonmembran (Hybond N+ 20 cm * 3 m, Amersham Buchler GmbH, Braunschweig, Deutschland) darf nur mit einer Pinzette und nicht mit den Händen angefaßt werden, da sie ansonsten verunreinigt und das Ergebnis verfälscht ist. Die Lagen wurden in 10x SSC angefeuchtet.

Als erstes legte man eine Glasplatte auf den Labortisch, um eine gerade, waagerechte Fläche zu schaffen. Darauf schichtete man zwei Lagen des angefeuchteten Filterpapiers. Das Gel wurde mit den Slots nach unten, d.h., die geschlossene Oberfläche wies zum Betrachter, auf das Filterpapier gelegt. Nun wurde die Nylonmembran luftblasenfrei auf das Agarose-Gel geschichtet. Die Schichten wurden mit zwei Filterpapieren abgedeckt. Man legte 20 bis 30 Lagen Saugpapier auf den Blot und stellte auf die zweite, oben liegende Platte ein Gewicht zwischen 200 und 500 g. Nach ca. 12 Stunden befand sich die DNA vollständig in der Nylonmembran.

Anschließend wurde der Blot abgebaut, indem man die oben beschriebenen Bestandteile in umgekehrter Reihenfolge entfernte. Nach dem Abnehmen der Saugpapierlagen wurde der Blot herumgedreht. Mit einem spitzen Bleistift wurden die Slots nachgezogen, um beim Hybridisieren der einzelnen Bahnen deutlich unterscheiden zu können. Das Gel wurde verworfen. Die Nylonmembran wurde für 1 bis 1½ Minuten in 4x SSC gewaschen, um eventuelle Gelreste zu entfernen. Nachdem sie 10 bis 15 Minuten luftgetrocknet hatte, wurden die DNA-Stränge vernetzt, sog. autocrosslinking. Dazu legte man die trockene Nylonmembran in den UV Stratalinker® 2400 [Stratagene], der dann 12 Sekunden lang den Auto Cross Link mittels UV-Strahlen vornahm. Die fertigen Blots wurden in einem Briefumschlag aufbewahrt.

4. Southern Blot

Mit der Methode des Southern Blot erfolgte die qualitative Auswertung der RT-PCR.

4.1 Insertisolierung

Zur Herstellung eines Inserts wurden ca. acht PCR-Ansätze benötigt, in denen das gesuchte Zytokin nachgewiesen worden war. Diese sogenannten positiven Proben wurden auf ein Agarose-Gel aufgetragen und wie in Kap. 3.5 beschrieben laufen gelassen. Die entsprechenden Banden im Gel wurden möglichst genau ausgeschnitten und anschließend in einem Eppendorfgefäß ausgewogen.

Die DNA Extraktion aus dem Gel erfolgte mit Hilfe des Nucleo Spin Extract Kits [Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren, Deutschland]:

Zu jeweils 100 mg Agarosegel wurden 300 μ l NT1-Puffer gegeben. Die Probe wurde für 10 Minuten bei 50 °C inkubiert, wobei sie alle zwei bis drei Minuten kurz gevortext wurde. Anschließend wurde die Probe in ein NucleoSpin-Gefäß überführt, welches man in ein 2 ml Zentrifugenröhrchen stellte. Man zentrifugierte für 60 Sekunden bei 15 * 1000 min⁻¹ in der

Eppendorf-Zentrifuge (5415 C). Der Überstand wurde verworfen. Nach dem Hinzufügen von 750 μ l NT3-Puffer wurde die Probe wiederum für 60 Sekunden bei 15 * 1000 min⁻¹ zentrifugiert. Dieser Arbeitsschritt wurde wiederholt. Nach dem zweiten Waschen mit dem NT3-Puffer wurde der Überstand verworfen und die Probe nochmals für 60 Sekunden bei maximaler Geschwindigkeit in der Eppendorf-Zentrifuge zentrifugiert. Es galt, den NT3-Puffer möglichst vollständig zu entfernen, da verbleibendes Ethanol die folgenden Reaktionen hemmen würde. Das NucleoSpin-Gefäß wurde in ein sauberes 1,5 ml Zentrifugenröhrchen gestellt. Der Probe wurden 50 μ l 10 mM Tris/HCl pH 8,5 hinzugefügt. Anschließend wurde sie in der Eppendorf-Zentrifuge für 60 Sekunden bei 15 * 1000 min⁻¹ zentrifugiert.

Um die DNA-Extraktion aus dem Gel zu kontrollieren, wurden 3 μ l steriles Wasser, 5 μ l Probe und 1,5 μ l 6x DNA Loading Puffer gemischt und auf einem Agarosegel laufen gelassen (vgl. Kapitel 3.5). Es zeigte sich eine deutliche Bande in der entsprechenden Fragmentlänge.

Das TOPO TA Cloning Kit [Invitrogen, NV Leek, Niederlande] wurde zur Gewinnung der Plasmid-DNA eingesetzt. Als erstes erfolgte die "TOPO-Cloning"-Reaktion. Dazu fügte man den 2 µl der extrahierten DNA 2 µl steriles Wasser und 1 µl pCR®-TOPO Vektor hinzu. Die Lösung wurde gemischt und für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden die Proben auf Eis gestellt.

Für die folgende "One Shot"-Transformations-Reaktion wurde jeweils 2 μ l 0,5 M β -Mercaptoethanol in ein Gefäß mit 50 μ l kompetenten Zellen, den sogenannten "One Shot cells", gegeben. Es wurde jeweils 2 μ l des Gemisches aus der "TOPO-Cloning"-Reaktion hinzugefügt. Dann wurden die Proben für 30 Minuten auf Eis gestellt. Anschließend wurden die Zellen für 30 Sekunden bei 42 °C ohne Schütteln inkubiert. Nach diesem Hitzeschock inkubierte man die Proben für 2 Minuten auf Eis. Es wurde 250 μ l raumtemperiertes SOC-Medium hinzugefügt und mit der Probe gemischt. Nun wurden die Gefäße für 30 Minuten bei 37 °C horizontal geschüttelt.

Von jeder Transformationslösung wurden 100 μ l auf einer LB-Platte, welche 50 μ g/ml Ampicillin enthält, verteilt und für ca. 16 Stunden bei 37 °C inkubiert. Anschließend nahm man mit einer Impföse ca. zehn weiße oder hellblaue Kolonien zur Analyse ab. Die dunkelblauen Kolonien wurden verworfen.

Zur Analyse der positiven Klone wurden zunächst die abgeimpften Kolonien in LB-Medium kultiviert, welches ebenso wie die Platten 50 µg/ml Ampicillin enthält. Eine Kolonie wurde in 5 ml LB-Medium überführt, wobei jeweils nur eine Kolonie in ein Reagenzglas gegeben

wurde. Die Impföse wurde nach jedem Arbeitsschritt mit Alkohol gereinigt und ausgeglüht. Die Kolonien wurden für ca. 12 Stunden kultiviert. Man soll sie nicht länger als 18 Stunden wachsen lassen, da die Zellzahlen ansonsten aufgrund des Mediumverbrauchs absinken.

Im nächsten Arbeitsgang wurde die Plasmid DNA isoliert. Dazu überführte man die Kultur in Kunststoffröhrchen [Falcon] und zentrifugierte sie für 10 Minuten bei 200 g. Das Pellet wurde in 150 μ l 1x TE-Puffer aufgenommen und resuspendiert. Die Zellen wurden in ein Eppendorfgefäß überführt. Nun fügte man 5 μ l Lysozymlösung, welche aus 20 mg Lysozym / ml 1x TE-Puffer bestand, hinzu. Die Proben wurden für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde 150 μ l Alkaline-Lysis Puffer pH 10,0 hinzupipettiert. Die Eppendorfgefäße wurden geschüttelt, für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und nochmals geschüttelt, so daß die Lösung klar wurde. Daraufhin gab man pro Ansatz 500 μ l Neutralisations-Lösung hinzu und schwenkte die Proben vorsichtig. Dann wurden sie für 10 Minuten bei -20 °C inkubiert.

Nach der Inkubationszeit wurden die Proben bei 12000 g und 4 °C für 10 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Eppendorfgefäß überführt, in das zuvor 750 μ l Isopropanol pipettiert worden sind. Nach einer weiteren zehnminütigen Inkubation bei -20 °C wurden die Proben erneut für 10 Minuten bei 12000 g und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Zu dem Pellet wurde 700 μ l Ethanol hinzugegeben und die Probe zwei- bis dreimal geschwenkt. Nachdem das Eppendorfgefäß bei 12000 g und 4 °C für 10 Minuten zentrifugiert worden war, goß man das Ethanol unter Beachtung des haftenden Pellet vorsichtig ab. Im DNA Speed Vac [Savant] ließ man das Pellet für ca. 5 Minuten trocknen. Danach wurde die DNA in 50 μ l TE-Puffer aufgenommen. Es wurde 2 μ l RNase (1 mg/ml) hinzugefügt.

Die Plasmid DNA wurde mittels Restriktionsanalyse untersucht. Man ließ 5 μ l der DNA-Lösung restringieren und testete anschließend das Ergebnis auf einem Agarosegel. Dazu mischte man 2 μ l Puffer H, 1 μ l Enzym und 12 μ l Wasser mit den 5 μ l der Plasmid DNA-Lösung. Diese Mischung ließ man für eine Stunde bei 37 °C restringieren.

Zu der Herstellung der Inserts des humanen IL-15 und IL-18 wurde das Restriktionsenzym AluI eingesetzt. Für das humane IL-12 p40 wurde das Restriktionsenzym MaeIII benutzt.

4.2 Radioaktive Markierung der Inserts

Die Inserts wurden für zwei bis drei Minuten zentrifugiert. Während der folgenden Arbeitsschritte standen die Gefäße auf Eis. Zur Markierung der Inserts wurde das Prime-It II Random Primer Labeling Kit [Stratagene] benutzt.

Es wurden 12,5 ng DNA bzw. mindestens 1 μ l Insertlösung in ein Eppendorfgefäß pipettiert. Man fügte 5 μ l Random Primer hinzu. Dann wurde die Lösung mit VE-Wasser auf 17 μ l aufgefüllt und für fünf Minuten bei 95 °C inkubiert. Danach wurde das Eppendorfhütchen für wenige Minuten auf Eis gestellt. Anschließend wurde 5 μ l 5x Puffer für ATP hinzugegeben. Unter Beachtung der Strahlenschutzvorschriften wurden 2,5 μ l ³²dATP (10 mCi/ml) und 0,5 μ l Klenow-Polymerase der Lösung hinzugefügt und nach einer zwei bis zehn minütigen Inkubation bei 37 °C wurde 1 μ l Stop-Mix hinzupipettiert.

Während der Inkubation bei 95 °C werden die Doppelstränge des DNA-Fragments voneinander gelöst. Danach wird unter Verwendung der hinzugefügten Hexanukleotide, den sogenannten Random Primern, DNA komplementär zu der eingesetzten cDNA synthetisiert. Durch den Einbau des radioaktiven (alpha-³²P) dATP wird der neu synthetisierte DNA-Strang markiert.

4.3 Aufreinigung über die Säule

Die Aufreinigung mit Hilfe der Säule (Biogel P 60 Säule [Statagene]) diente dazu, das nicht eingebaute radioaktive dATP sowie den blauen Farbstoff, der dem radioaktiven Nukleotid aus Sicherheitsgründen zugegeben ist, zu entfernen.

Die Säule wurde mit 70 μ l STE equilibriert, bis der erste Tropfen am unteren Säulenende erschien. Nun wurde die Säule in einer speziellen Vorrichtung aus Plexiglas, die beim Herunterdrücken der Spritze den Benutzer vor der Beta-Strahlung schützt, über einem frischen Eppendorfgefäß befestigt. Die radioaktiv markierte DNA-Lösung mit einem Volumen von insgesamt 26 μ l wurde mit STE auf 70 μ l aufgefüllt. Sie wurde in die Säule gespritzt und in dem Eppendorfhütchen aufgefangen. Anschließend ließ man 70 μ l STE durch die benutzte Säule laufen und fing diese Lösung wiederum in demselben Gefäß auf. Zur Überprüfung, ob

die DNA-Lösung radioaktiv genug war, wurden 3 µl der Flüssigkeit mit dem Geigerzähler (Contamat FAG [Linkenheim-Hochstetten, Deutschland]) ausgemessen, wobei man mindestens eine Aktivität von 600 Bequerel erwartete.

4.4 Hybridisierung

Zunächst wurden die in dem Briefumschlag aufbewahrten Blots ringförmig und ohne gegenseitige Überschneidung in 50 ml Röhrchen [Falcon] gelegt. Es wurden drei Löcher in die Deckelmitte gestochen. Die Blots wurden mit 3 ml vorgewärmten Church-Buffer befeuchtet und für mindestens zehn Minuten bei 65 °C vorhybridisiert. Dazu wurden sie in einen Wärmeschrank [Bachofer, Reutlingen, Deutschland] mit einer Vorrichtung, die dafür sorgte, daß die Röhrchen ständig gedreht wurden, gestellt.

Die radioaktiv markierte DNA wurde für fünf Minuten bei 95 °C aufgekocht, auf Eis gestellt und anschließend zentrifugiert. Die gesamte DNA-Lösung wurde nun mit jeweils 3 ml Church-Buffer pro Falconröhrchen, welches mit den zu hybridisierenden Blots gefüllt war, verdünnt. Die Vorhybridisierungslösung wurde gegen diese Mischung ausgetauscht. Die Röhrchen wurden für 14 Stunden in dem oben erwähnten Wärmeschrank bei 65 °C inkubiert.

Anschließend wurde die Hybridisierungslösung abgegossen. Es wurden 10 ml auf 65 °C erwärmter Waschpuffer in die Röhrchen gegeben, kurz geschwenkt und wieder abgegossen. Nun legte man die Blots mit einer Pinzette in eine größere Schale und füllte diese so mit Waschpuffer auf, daß die Blots alle mit Flüssigkeit bedeckt waren. In einem Wasserbad wurde die Schale bei 37 °C für fünf Minuten geschwenkt. Nach dieser Zeit wurde der Waschpuffer ausgetauscht und es folgten zwei Inkubationszeiten von jeweils 30 bis 45 Minuten bei einer Temperatur von 65 °C. Zwischen den Inkubationen wurde der Waschpuffer erneut ausgetauscht.

Die Blots wurden in einen unbeschrifteten Gefrierbeutel eingeschweißt und je nach Intensität der radioaktiven Strahlung zwischen 15 und 60 Minuten auf die Fuji Imaging Plate Type BAS-III S [Fuji Photo Film Co., Japan] gelegt. Der Screen wurde von einer Bleikassette umgeben.

Es folgte die mathematische Auswertung am Phospho-Imager.

5. Statistische Analysen

In den Graphiken sind jeweils die Mittelwerte inklusive Standardabweichung dargestellt. Die statistische Signifikanz wurde mittels des zweiseitigen Student t-Tests bestimmt. Das Signifikanzniveau wurde auf p < 0,05 festgesetzt.

Ergebnisse

I. Reaktionen der Mono-Mac-6 Zellen auf humanes hsp60

1. Humanes hsp60 induziert die TNFα-Produktion

1.1 Dosisabhängigkeit der Monozytenstimulation durch hsp60

Es wurde geprüft, ob Zellen der humanen Monozytenlinie Mono-Mac-6 durch hsp60 zur TNFα-Produktion stimuliert werden können. Das hsp60 wurde in den Konzentrationen 0,1/1/3 und 10 µg/ml zu jeweils 1 x 10⁶ Zellen gegeben. Als Positivkontrolle wurden 100 ng/ml LPS, welches eine TNF α -Produktion bei Mono-Mac-6 Zellen induziert¹⁰³, eingesetzt. Das Medium für Mono-Mac-6 Zellen wurde ohne Zusatz von Stimulantien als Negativkontrolle verwendet. Der Überstand wurde nach fünf Stunden Inkubation abgenommen und mittels ELISA auf TNFa untersucht. Die Abbildung 3 zeigt die dosisabhängige Induktion der TNF\alpha-Produktion durch das humane hsp60. Die TNFa-Konzentration bei einer Stimulation mit 10 µg/ml hsp60 wurde auf 100 % gesetzt. Man kann eine Abhängigkeit der TNFα-Stimulation von der hsp60-Dosis beobachten. Bei einer Stimulation mit $3 \mu g/ml$ hsp60 waren $27.9 \pm 4.3 \%$ und bei einer Stimulation mit 1 µg/ml hsp60 12,1 \pm 2,1 % der TNF α -Menge zu beobachten, die bei einer Stimulation mit 10 μ g/ml hsp60 produziert wurde. Die TNF α -Menge bei einer Stimulation mit 0,1 μ g/ml hsp60 unterscheidet sich nicht signifikant von der Negativkontrolle K0. Wie in Abschnitt 1.3, Abbildung 2, gezeigt, variiert die Höhe der induzierbaren TNFα-Konzentration mit den allgemeinen Kulturbedingungen der Zellen. In den in Abbildung 3 gezeigten Experimenten entsprach der 100 %-Wert einer TNFα-Konzentration von 667 pg/ml.





Die Mono-Mac-6 Zellen wurden mit 0,1 / 1 / 3 und $10 \mu g/ml$ hsp60 inkubiert. Die Überstände wurden nach 5 h Inkubation abgenommen und mittels ELISA auf TNF α untersucht.

Mittelwerte \pm Standardabweichung von 6 Ansätzen an 2 Versuchstagen. Signifikanter Unterschied zur Mediumkontrolle: *, p < 0.05; **, p < 0.005.

1.2 Keine Beeinflussung der stimulierenden Wirkung von hsp60 durch Polymyxin B

Um auszuschließen, daß die stimulierende Wirkung des humanen hsp60 auf einer Verunreinigung mit Endotoxin beruht, wurden mehrere Experimente mit Polymyxin B als Kontrolle durchgeführt. Die TNF α -Produktion nach der Stimulation mit hsp60 ist nicht durch Polymyxin B hemmbar. Die Abbildung 4 zeigt eines dieser Experimente.

Die Mono-Mac-6 Zellen wurden zunächst 24 h lang mit Medium inkubiert. Nach dem Waschen und einer ca. fünfstündigen Erholungsphase der Zellen im Brutschrank wurden sie stimuliert. Zum einen wurden jeweils 1 x 10^6 Zellen mit 3 µg/ml hsp60 oder 10 ng/ml LPS als Positiv- und mit Medium für Mono-Mac-6 Zellen als Negativkontrolle stimuliert. Zum anderen fügte man einigen Zellen mit Polymyxin B versetztes Stimulans bei. Das Polymyxin

B wurde drei Stunden vor dieser Stimulation in einer Konzentration von 0,1 μ g/ml zusammen mit dem hsp60 bzw. dem LPS bei 4 °C inkubiert. Man erkennt in der Graphik, daß die TNF α -Freisetzung bei einer Stimulation mit hsp60 unabhängig von dem Polymyxin B-Zusatz ist. Die TNF α -Produktion bei einer Stimulation mit LPS zeigte hingegen deutliche Unterschiede bei der Zugabe von Polymyxin B: LPS stimulierte TNF α , wobei LPS durch den Polymyxin B-Zusatz weitgehend neutralisiert wurde.



Abb. 4: Keine Hemmung der stimulierenden Wirkung von hsp60 durch Polymyxin B

Die Mono-Mac-6 Zellen wurden nach einer 24 h Vorbehandlung mit Medium (K0) mit **3 \mug/ml hsp60** (hsp) und **10 ng/ml LPS** (LPS) stimuliert. Es erfolgte eine Kontrolle mit **0,1 \mug/ml Polymyxin B** (PxB), welches 3 h vor Versuchsbeginn zusammen mit den Stimulantien inkubiert wurde. Die Überstände wurden nach **5 h Inkubation** abgenommen und mittels **ELISA** auf **TNF** α untersucht.

Angegeben sind die Mittelwerte \pm Standardabweichung von 4 Ansätzen. Signifikante Unterschiede zwischen den Ansätzen: *, p < 0,01.

1.3 Zeitabhängigkeit der TNFα-Produktion

Die Zeitabhängigkeit der TNF α -Freisetzung ist in der Abbildung 5 graphisch dargestellt. Die Mono-Mac-6 Zellen wurden zum Zeitpunkt t = 0 mit 10 µg/ml hsp60 stimuliert. Als Kontrolle wurden 100 ng/ml LPS und Medium eingesetzt. Die Überstände wurden direkt sowie nach 3, 6, 12, 24 und 48 Stunden entnommen und mittels ELISA auf TNF α untersucht. Die Negativkontrolle mit Medium zeigte eine konstante TNF α -Konzentration von ca. 40 pg/ml. Nach einer Stimulation mit humanem hsp60 stiegen die TNF α -Werte an. Sie erreichten nach drei Stunden eine Konzentration von 1093 ± 47 pg/ml und ihr Maximum nach sechs Stunden bei 1529 ± 211 pg/ml. Danach sank der TNF α -Spiegel kontinuierlich ab. Nach 24 Stunden erreichte er einen Wert von 126 ± 8 pg/ml und zum Zeitpunkt 48 Stunden lag er noch bei 108 ± 33 pg/ml. Die Zeitkinetik der TNF α -Freisetzung nach der Stimulation mit 100 ng/ml LPS zeigte einen schnelleren Anstieg. Die Maximalwerte lagen nach drei Stunden bei 2762 ± 154 pg/ml bzw. nach sechs Stunden bei 2779 ± 706 pg/ml. Die TNF α -Konzentrationen sanken danach jedoch ähnlich der Kinetik bei humanem hsp60. Bei 48 Stunden erreichten die mit LPS stimulierten Zellen einen TNF α -Spiegel, der im Bereich der Mediumkontrolle bei 54 ± 11 pg/ml lag.

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß humanes hsp60 eine ähnliche Zeitkinetik wie LPS zeigte.



Abb. 5: Zeitabhängigkeit der TNFα-Freisetzung

Die Mono-Mac-6 Zellen wurden zum Zeitpunkt 0 h mit 10 μ g/ml hsp60 stimuliert. Als Kontrolle dienten 100 ng/ml LPS und Medium. Die Überstände wurden bei 0 h und nach 3 h, 6 h, 12 h, 24 h und 48 h Inkubation abgenommen und mittels ELISA auf TNF α untersucht.

Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichung von 5 Ansätzen an 2 Versuchstagen. Die signifikanten Unterschiede zur Mediumkontrolle sind: *, p<0,05; **, p<0,005.

2. Humanes hsp60 induziert Th1 Zytokin-mRNA

Neben der Untersuchung der stimulierenden Wirkung des humanen hsp60 auf Proteinniveau wurden mRNA-Analysen durchgeführt. Die Zeitkinetik der mRNA-Expression von TNF α , IL-12p40, IL-15 und IL-18 ist in Abbildung 6 wiedergegeben. Die Mono-Mac-6 Zellen wurden dazu mit 3 µg/ml hsp60 stimuliert. Als Positivkontrolle wurden 10 ng/ml LPS und als Negativkontrolle wiederum das Medium für Mono-Mac-6 Zellen eingesetzt. Die RNA wurde bei null Stunden, d.h. unmittelbar vor der Stimulation, nach 3 Stunden sowie nach 24 Stunden isoliert. Die ebenfalls zu diesen Zeitpunkten abgenommenen Überstände wurden mittels ELISA auf TNF α untersucht, um die erwartete Reaktion der Zellen zu überprüfen. Diese Ergebnisse wurden nicht gesondert dargestellt, da sie den Daten der Abbildung 5 entsprechen.



Abb. 6: Zeitabhängigkeit der mRNA-Expression von Th1 Zytokinen nach Stimulation mit hsp60

Die Mono-Mac-6 Zellen wurden zum Zeitpunkt 0 h mit $3 \mu g/ml$ hsp60 stimuliert. Die RNA wurde nach 0 h, 3 h und 24 h Inkubation isoliert. Anschließend wurde sie mittels RT-PCR und Southern Blot auf die Zytokine TNF α , IL-12p40, IL-15 und IL-18 untersucht.

Dargestellt sind die Mittelwerte von 3 RT-Ansätzen. Die Werte wurden zuvor durch die jeweiligen β -Aktin-Werte geteilt. Der 0 h-Wert wurde zur besseren Vergleichbarkeit auf 1 gesetzt.

In der Abbildung 6 wird die relative mRNA-Menge der Zytokine in PSL, ³²P stimulierte Lumineszenz, angegeben, wobei die Werte der einzelnen Ansätze durch die jeweiligen β -Aktin-Werte geteilt wurden. Zur besseren Vergleichbarkeit der Zytokindaten habe ich den 0 h-Wert auf 1 gesetzt. Die TNF α -mRNA-Expression steigt bei drei Stunden um ca. das Doppelte und erreicht bei 24 Stunden den 3,5fachen Wert der mRNA-Expression zu Beginn des Experimentes. Die IL-12p40-mRNA ließ sich bei einer Stimulation mit humanem hsp60 nicht nachweisen.

Die IL-15-mRNA-Menge steigt kontinuierlich an und zeigt 24 Stunden nach der Stimulation ein deutliches Maximum. Man findet die 4,5fache Menge an IL-15-mRNA im Vergleich zu dem Wert bei null Stunden. Die IL-18-mRNA-Expression zeigt nur einen geringen Anstieg über die Zeit. Nach diesen Untersuchungen induziert humanes hsp60 in Mono-Mac-6 Zellen die mRNA der Zytokine TNFα, IL-15 und IL-18.

3. Desensibilisierung

3.1 Desensibilisierung der Monozyten

Nachdem festgestellt wurde, daß eine einmalige Stimulation der Mono-Mac-6 Zellen mit humanem hsp60 eine Produktion von TNF α und anderen Th1 Zytokinen induziert, wurde geprüft, ob der Reaktionszustand der Monozyten nach Kontakt mit hsp60 verändert war. Dazu wurden die Zellen ein zweites Mal mit hsp60 stimuliert. Die erste Stimulation wird im weiteren Text als Vorbehandlung und die zweite als Stimulation bezeichnet. In der Abbildung 7 sind die Ergebnisse dieser Experimente dargestellt. Die Mono-Mac-6 Zellen wurden mit jeweils 3 µg/ml hsp60, 10 ng/ml LPS und Medium als Negativkontrolle 24 Stunden lang vorbehandelt. Dann wurden die Zellen gewaschen, ausgezählt und neu in Kultur genommen. Sie wurden mit 10 µg/ml hsp60, 100 ng/ml LPS oder Medium stimuliert. Die Zellüberstände wurden mittels ELISA auf TNF α hin untersucht.

Bei den mit Medium vorbehandelten Zellen läßt sich nach der Stimulation mit hsp60 oder mit LPS ein signifikanter Anstieg der TNF α -Konzentration nachweisen (p < 0,005). Bei den Mono-Mac-6 Zellen, die zum zweiten Mal mit hsp60 oder LPS stimuliert wurden, bleiben die TNF α -Werte im Bereich der Negativkontrolle. Für die Lipopolysaccharide ist dieses Verhalten bekannt und wird Toleranz oder Desensibilisierung genannt¹⁰⁴. Interessant ist, daß humanes hsp60 dieselbe Reaktion erzeugen kann. In der Abbildung 7 kann man erkennen, daß nicht nur mit hsp60 vorbehandelte Zellen eine Toleranz bei erneuter Stimulation mit hsp60 zeigen (hsp + hsp), sondern daß sie auch eine Toleranz bei Stimulation mit LPS entwickeln (hsp + LPS). Bemerkenswert ist ebenfalls, daß eine Vorbehandlung mit LPS die Stimulation mit hsp60 desensibilisiert.



Abb. 7: Desensibilisierung der Monozyten

Die Mono-Mac-6 Zellen wurden mit $3 \mu g/ml hsp60$ (hsp) bzw. mit 10 ng/ml LPS (LPS) vorbehandelt. Nach der 24stündigen Inkubation wurden sie mit $10 \mu g/ml hsp60$ (+ hsp) bzw. 100 ng/ml LPS (+ LPS) stimuliert. Als Negativkontrolle diente das Medium für Mono-Mac-6 Zellen (K0). Nach 5 h wurden die Überstände abgenommen und mittels ELISA auf TNF α untersucht. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichung von 5 Ansätzen an 2 Versuchstagen. Signifikante Hemmung der TNF α -Produktion nach Vorbehandlung mit hsp60: **, p<0,005.

3.2 Polymyxin B hemmt nicht die Desensibilisierung durch hsp60

Um auszuschließen, daß die Desensibilisierung bei einer Vorbehandlung bzw. einer Stimulation mit hsp60 aufgrund einer Endotoxinverschmutzung des Stimulans erfolgt, wurden Kontrollversuche mit Polymyxin B durchgeführt. Die Mono-Mac-6 Zellen wurden mit 3 μ g/ml hsp60 oder mit 10 ng/ml bzw. 1 ng/ml LPS vorbehandelt und nach einer 22stündigen Inkubation stimuliert. Das Polymyxin B wurde in einer Konzentration von 0,1 μ g/ml zusammen mit dem jeweiligen Stimulans drei Stunden lang vor dem Hinzufügen bei 4 °C inkubiert. Die Überstände wurden nach fünf Stunden abgenommen und mittels ELISA auf TNF α untersucht.



Abb. 8: Polymyxin B-Kontrolle der hsp60-vermittelten Desensibilisierung

Die Mono-Mac-6 Zellen wurden mit **3 \mug/ml hsp60** (hsp) oder mit **10 ng/ml** LPS (LPS) bzw. **1 ng/ml LPS** (L) vorbehandelt und nach einer **22stündigen** Inkubation stimuliert. Als Negativkontrolle wurde das Medium für Mono-Moc-6 (K0) eingesetzt. **0,1 \mug/ml Polymyxin B** (Pxb) wurde für 3 h mit dem jeweiligen Stimulans inkubiert. Nach **5 h** wurden die Überstände abgenommen und mittels ELISA auf TNF α untersucht.

Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichung von 4 Ansätzen. Signifikante Hemmung der TNF α -Produktion nach Vorbehandlung mit hsp60 bzw. hsp60 und Polymyxin B: *, p<0,05.

Zunächst wurde die Wirkung des Polymyxin B kontrolliert. Die Ergebnisse sind im linken Bereich der Abbildung 8 dargestellt. LPS stimuliert eine TNF α -Freisetzung. LPS versetzt mit Polymyxin B unterscheidet sich in seiner stimulatorischen Wirkung nicht signifikant von der Mediumkontrolle. In dem folgenden Graphikabschnitt ist die Toleranzentwicklung bei Stimulation mit Lipopolysaccharid dargestellt. Wie erwartet zeigt sich eine Desensibilisierung bei Vorbehandlung und Stimulation mit LPS¹⁰⁴. In den Ansätzen, die mit Polymyxin B inkubiertem LPS vorbehandelt worden sind, findet man einen Anstieg der TNF α -Konzentration. Es ist keine Toleranzentwicklung zu beobachten.

Hsp60 verhält sich anders. Die Inkubation von humanem hsp60 mit Polymyxin B hat keinen Einfluß auf die Desensibilisierung, wie man in dem rechten Abschnitt der Abbildung 8 erkennen kann. Humanes hsp60 erzeugt trotz Polymyxin B-Behandlung eine Toleranzentwicklung gegen LPS und sich selbst.

3.3 IL-10-Freisetzung bei der Desensibilisierung

Laut Literatur wird bei der LPS-Toleranz IL-10 hochreguliert¹⁰⁵. Da auch berichtet wird, daß TNF α durch IL-10 herunterreguliert wird¹⁰⁶, stellte sich die Frage, wie sich IL-10 bei der Desensibilisierung mit humanem hsp60 verhält. Es könnte den Grund für die niedrige TNF α -Konzentration bei der Toleranz darstellen.

Um diese Frage zu klären, wurden die gepoolten Überstände der Mono-Mac-6 Zellen von einem Desensibilisierungsexperiment, wie es in Kapitel 3.1 beschrieben wurde, mittels ELISA auf IL-10 hin untersucht. Das Ergebnis ist in Abbildung 9 dargestellt. Nach der 24stündigen Vorbehandlung mit 3 µg/ml hsp60 bzw. mit 10 ng/ml LPS erkennt man einen Anstieg der IL-10-Konzentration. Fünf Stunden nach der Stimulation ist außer bei der mit hsp60 vorbehandelten und anschließend mit LPS stimulierten Probe kein IL-10 nachweisbar. IL-10 ist fünf Stunden nach der Stimulation noch nicht hochreguliert.



Abb. 9: IL-10-Freisetzung bei der Desensibilisierung

Die Mono-Mac-6 Zellen wurden mit $3 \mu g/ml hsp60$ (hsp) bzw. 10 ng/ml LPS (LPS) vorbehandelt. Nach einer 24stündigen Inkubation wurden sie mit $10 \mu g/ml hsp60$ (+ hsp) oder mit 100 ng/ml LPS (+ LPS) stimuliert. Die Überstände wurden nach 5 h Inkubation abgenommen, gepoolt und mittels ELISA auf IL-10 untersucht.

3.3 TGFβ-Produktion bei der Desensibilisierung

Neben dem IL-10 zählt der transformierende Wachstumsfaktor beta (TGF β) zu der Gruppe der Zytokine mit hemmender Wirkung auf die TNF α -Produktion. Laut Literatur spielt er ebenfalls eine Rolle bei der durch Endotoxine hervorgerufenen Desensibilisierung¹⁰⁷.

Um die Produktion dieses Zytokines bei der hsp60-vermittelten Desensibilisierung zu untersuchen, wurde der gepoolte Zellüberstand von Desensibilisierungsexperimenten mittels ELISA auf TGF β hin geprüft. Die Abbildung 10 stellt die gemessenen TGF β -Konzentrationen dar. Nach der Vorbehandlung mit hsp60 und LPS erkennt man einen Anstieg der TGF β -Werte im Vergleich zur Mediumkontrolle. Nach einer 24stündigen Vorbehandlung mit 10 ng/ml LPS liegt die TGF β -Konzentration bei 49,3 pg/ml. Die TGF β -Konzentration nach einer Vorbehandlung mit 3 µg/ml hsp60 ist deutlich auf 68,3 pg/ml angestiegen.

Im Gegensatz zu den IL-10 Messungen findet man bei der Toleranz ebenfalls erhöhte TGF β -Konzentrationen. Für die Ansätze LPS + LPS und LPS + hsp liegen die Werte im Bereich der mit LPS vorbehandelten Mono-Mac-6 Zellen. Bei den mit hsp60 vorbehandelten und anschließend mit LPS oder hsp60 stimulierten Zellen liegen die TGF β -Werte deutlich höher. Bei dem Ansatz hsp + hsp steigt die TGF β -Konzentration sogar auf 83,8 pg/ml.



Abb. 10: TGFβ-Produktion bei der Desensibilisierung

Die Mono-Mac-6 Zellen wurden mit **3 \mug/ml hsp60** (hsp) bzw. **10 ng/ml LPS** (LPS) **vorbehandelt**. Als Negativkontrolle diente Medium für Mono-Mac-6 (K0). Nach einer **24stündigen** Inkubation wurden sie mit **10 \mug/ml hsp60** (+ hsp) oder mit **100 ng/ml LPS** (+ LPS) **stimuliert**. Die Überstände wurden nach **5 h** Inkubation abgenommen, gepoolt und mittels **ELISA** auf **TGF** β untersucht.

4. Aufhebung der Desensibilisierung

4.1 Zytokine

Nachdem das Phänomen der Desensibilisierung für hsp60 entdeckt wurde, wurde nach einem Weg gesucht, diese Toleranz wieder aufzuheben. Als Orientierung für die Experimente dienten die bereits für LPS über die Aufhebung der Desensibilisierung veröffentlichten Daten¹⁰⁸. Es war gelungen, die Toleranz durch eine Inkubation mit Zytokinen nach der Vorbehandlung und vor der Stimulation aufzuheben. Diese Zwischeninkubation wurde mit IFNγ, GM-CSF oder einem Gemisch aus beiden durchgeführt.

In der Abbildung 11 sind Experimente dargestellt, bei denen eine Zwischeninkubation zur Aufhebung der Desensibilisierung durchgeführt wurde. Die Mono-Mac-6 Zellen wurden zunächst mit 3 μ g/ml humanem hsp60 oder 10 ng/ml LPS vorbehandelt. Als Negativkontrolle wurde wie bei den vorherigen Experimenten das Medium für Mono-Mac-6 eingesetzt. Als Inkubationszeit wurde 24 Stunden gewählt. Die Zwischeninkubation erfolgte mit 10 ng/ml IFN γ , 50 ng/ml GM-CSF, einem Gemisch aus diesen beiden Stimulantien sowie mit Medium als Kontrollsubstanz. Nach weiteren 24 Stunden wurden die Zellen mit 3 μ g/ml hsp60 oder 10 ng/ml LPS stimuliert. Die Überstände wurden nach 72 Stunden abgenommen und mittels ELISA auf TNF α untersucht.

In dem linken Abschnitt der Graphik sind die TNF α -Konzentrationen der Überstände, die bereits nach 48 Stunden abgenommen wurden, dargestellt. Man erkennt neben der Mediumkontrolle Ansätze, die mit 50 ng/ml GM-CSF bzw. mit 10 ng/ml LPS stimuliert worden sind. GM-CSF als alleiniges Stimulans rief keine TNF α -Freisetzung in Mono-Mac-6 Zellen hervor. Die Stimulantie LPS zeigte den erwarteten Anstieg der TNF α -Konzentration. Die Desensibilisierung des Endotoxins LPS und des hsp60 war trotz des langen Zeitraums von zweimal 24 Stunden unbeeinträchtigt.

In dem mittleren Abschnitt der Abbildung 11 wird die Aufhebung der Endotoxintoleranz gezeigt. Die TNF α -Konzentration nach einer Stimulation mit LPS unterschied sich signifikant von der Mediumkontrolle (p < 0,05). Bei der Vorbehandlung und Stimulation mit LPS ließ sich trotz der Zwischeninkubation mit Medium eine Desensibilisierung beobachten. Bei einer Zwischeninkubation mit 10 ng/ml IFN γ wurde die Toleranz verhindert. Der signifikante Unterschied zwischen dem Ansatz der Desensibilisierung und dem Ansatz mit IFN γ - Zwischeninkubation betrug p < 0,005. Eine Zwischeninkubation mit 50 ng/ml GM-CSF verhinderte nicht die Ausbildung einer Toleranz. Das Gemisch von IFN γ und GM-CSF hob die Desensibilisierung jedoch wieder auf.



Abb. 11: Zwischeninkubation mit IFNγ oder GM-CSF mit IFNγ hebt die Desensibilisierung auf

Die Mono-Mac-6 Zellen wurden mit 3 µg/ml hsp60 (h), 10 ng/ml LPS (L) oder Medium (K0) vorbehandelt und stimuliert. Nach der 24stündigen Vorbehandlung folgte die Zwischeninkubation für ebenfalls 24 h. Es wurden 10 ng/ml IFN γ (IFN) , 50 ng/ml GM-CSF (GM) und ein Gemisch beider Stimulantien (GM/IFN) eingesetzt. Nach 24 h wurden die Überstände abgenommen und mittels ELISA auf TNF α untersucht.

Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichung von 4 Ansätzen. Signifikant erhöhte TNF α -Produktion im Vergleich zum Desensibilisierungsansatz (L + K0 + L, bzw. h + K0 + h): **, p<0,005; *, p<0,05.

Ähnliches wie für LPS gilt für humanes hsp60. Problematisch war bei diesem Experiment die lange Zeitspanne von 24 Stunden, da die TNFα-Konzentration dadurch deutlich reduziert war. Es ist zwar ein klarer Unterschied zwischen der Zwischeninkubation mit Medium und einer Zwischeninkubation mit IFNγ bzw. einem Gemisch aus IFNγ und GM-CSF zu erkennen, aber die TNFα-Konzentration bei der Stimulation durch hsp60 unterschied sich nicht vom Desensibilisierungsansatz. Demnach geht der Effekt einer durch hsp60 ausgelösten Toleranz

innerhalb von 24 h verloren, während die LPS-induzierte Toleranz dann noch anhält. Aus diesem Grunde wurde ein zweitens Experiment angesetzt. Die Inkubationszeiten betrugen jeweils vier Stunden, wobei der sonstige Versuchsaufbau gleich blieb. In der Abbildung 12 ist das Ergebnis dargestellt. Die TNF α -Konzentration nach der Stimulation mit 3 µg/ml hsp60 und vierstündiger Inkubation unterschied sich signifikant mit p < 0,005 von der Negativkontrolle. Betrachtet man die Ansätze der Stimulation, der Desensibilisierung und des Aufhebens der Toleranz, so sind bei der Wahl dieser Inkubationszeiten signifikante Unterschiede zu erkennen.

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß die durch eine Vorbehandlung und Stimulation mit humanem hsp60 hervorgerufene Desensibilisierung zu verhindern ist. Bei einer Zwischeninkubation mit IFNy und GM-CSF bildet sich keine Toleranz aus.



Abb. 12: Zwischeninkubation mit IFNγ zusammen mit GM-CSF hebt die Desensibilisierung auf

Die Mono-Mac-6 Zellen wurden mit $3 \mu g/ml hsp60$ (h) vorbehandelt und stimuliert. Die Zellen wurden 4 h lang mit einem Gemisch aus 10 ng/ml IFN γ und 50 ng/ml GM-CSF (GM/IFN) zwischeninkubiert.

Nach 4 h wurden die Überstände abgenommen und mittels ELISA auf TNF α untersucht.

Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichung von 3 Ansätzen. Signifikante Unterschiede zum Desensibilisierungs-Ansatz: *, p < 0.05.

4.2 Glukose

Um den Einfluß von erhöhten Zuckerkonzentrationen auf die TNFα-Freisetzung nach einer Stimulation mit LPS und hsp60 zu untersuchen, wurde dem Medium für Mono-Mac-6 Zellen Glukose hinzugefügt. Das Medium enthält normalerweise 11,1 mM Glukose, welches einer Konzentration von 200 mg/dl entspricht. In dem in der Abbildung 13 dargestellten Versuchsansatz wurden neben 11,1 mM auch 16,6 mM und 22,2 mM glukosehaltiges Medium eingesetzt.



Abb. 13: Effekt von Glukose auf die Monozytenstimulation

Die Mono-Mac-6 Zellen wurden in 11,1 mM, 16,6 mM oder 22,2 mM glukosehaltigem Medium für 24 Stunden inkubiert. Bei den Ansätzen LPS + LPS wurde den Zellen zusammen mit der Glukose auch 10 ng/ml LPS hinzugefügt. Sie wurden anschließend mit $3 \mu g/ml$ hsp60 (hsp) und mit 100 ng/ml LPS (LPS) stimuliert. Die Überstände wurden nach 5 h abgenommen und mittels ELISA auf TNF α untersucht

Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichung von 4 Ansätzen. Signifikante Unterschiede zu den Ansätzen und 11,1 mM Glukose: *, p < 0,05. Die Mono-Mac-6 Zellen wurden für 24 Stunden in diesem Medium kultiviert, bevor das Stimulans hinzugefügt wurde. Sie wurden mit 3 μ g/ml hsp60 und 100 ng/ml LPS stimuliert. Die Überstände wurden nach fünf Stunden Inkubation abgenommen und mittels ELISA auf TNF α untersucht. Um einen Einfluß der Glukosekonzentration auf die Desensibilisierung zu untersuchen, wurden die Zellen in den Ansätzen LPS + LPS gleichzeitig mit der Glukose auch mit 10 ng/ml LPS für 24 Stunden inkubiert. Sie wurden anschließend ebenso wie die anderen Ansätze mit 100 ng/ml LPS stimuliert.

Die Vorbehandlung der Monozyten mit hohen Glukosekonzentrationen führte zu keiner Desensibilisierung. Das heißt, die TNFα-Produktion war im Vergleich nicht reduziert. Bei den Zellen in dem Medium, das 16,6 mM Glukose enthält, fand man sogar signifikant höhere TNFα-Werte als in dem Medium mit 11,1 mM Glukose. Sie stiegen bei einer noch höheren Glukosekonzentration im Medium nicht weiter an. Die hohen Glukosekonzentrationen behinderten nicht die Ausprägung einer LPS-induzierten Toleranz.

5.2 Insulin und Proinsulin

Als nächstes wurde geprüft, ob eine Vorbehandlung mit Insulin zu einer Desensibilisierung von Monozyten führt. Die Mono-Mac-6 Zellen wurden für 24 Stunden in Medien mit Insulinkonzentrationen von 10^{-7} , 10^{-8} , 10^{-10} und 10^{-12} M Insulin inkubiert. Als Kontrolle diente das Medium für Mono-Mac-6. Danach wurde das Stimulans, entweder 3 µg/ml hsp60, 100 ng/ml LPS oder Medium, zu den Zellen hinzugefügt. In der Abbildung 14 kann man erkennen, daß humanes rekombinantes Insulin ohne bakterizide Zusätze keinen Einfluß auf die stimulatorische Wirkung von hsp60 oder LPS hat. Die Schwankungen in der TNF α -Menge waren nicht signifikant.



Abb. 14: Effekt von Insulin auf die Monozytenstimulation

Die Mono-Mac-6 Zellen wurden in **Medium** mit 10^{-7} , 10^{-8} , 10^{-10} und 10^{-12} M Insulin für 24 Stunden inkubiert. Sie wurden mit 3 µg/ml hsp60 (hsp) und mit 100 ng/ml LPS (LPS) stimuliert. Die Überstände wurden nach 5 h abgenommen und mittels ELISA auf TNF α untersucht Dargestellt sind die Mittelwerte von 2 Experimenten.

Die Untersuchungen, die mit Insulin durchgeführt worden waren, wurden ebenfalls mit Proinsulin gemacht. Wie man in der Abbildung 15 erkennt, hat Proinsulin ebenfalls keine desensibilisierende Wirkung in Bezug auf die Stimulierbarkeit mit hsp60 oder LPS.

Da weder Insulin noch Proinsulin einen Einfluß auf die Monozytenstimulation zeigte, wurden diese Ansätze nicht weiter verfolgt.



Abb. 15: Effekt von Proinsulin auf die Monozytenstimulation

Die Mono-Mac-6 Zellen wurden in Medium mit 10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8} , 10^{-10} und 10^{-12} M Proinsulin für 24 Stunden inkubiert. Sie wurden mit 3 µg/ml hsp60 (hsp) und mit 10 ng/ml LPS (LPS) stimuliert. Die Überstände wurden nach 5 h abgenommen und mittels ELISA auf TNF α untersucht Dargestellt sind die Mittelwerte von 2 Experimenten.
II. Reaktionen der Vollblutkultur auf humanes hsp60

Um die physiologische Relevanz der stimulierenden Wirkung von humanem hsp60 auf eine humane Monozytenlinie zu überprüfen, wurden wichtige Experimente unter Verwendung nativer humaner Blutzellen wiederholt.

1. Zeitabhängigkeit der TNFα-Freisetzung in der Vollblutkultur

Humanes hsp60 löste auch bei humanen Blutzellen die Sekretion von TNF α aus. Dabei ergab sich bei Stimulation mit 3 µg/ml hsp60 diegleiche Kinetik wie sie nach einer Stimulation mit 10 ng/ml LPS zu beobachten war (Abb. 20).



Abb. 16: Kinetik der TNFα-Freisetzung durch hsp60 in nativem Vollblut

Die Vollblutkultur wurde mit **3 µg/ml hsp60** und zum Vergleich mit 10 ng/ml LPS stimuliert. Die Überstände wurden nach **3 h**, **6 h**, **12 h**, **24 h** und **48 h Inkubation** abgenommen und mittels ELISA auf TNF α untersucht. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichung von 4 Ansätzen an 2 Versuchstagen. Signifikante Unterschiede zur Mediumkontrolle:**, p<0,005; *, p<0,05. Die Zellen wurden zum Zeitpunkt t = 0 stimuliert. Die Überstände wurden nach 3, 6, 12, 24 und 48 Stunden Inkubation abgenommen. Als Negativkontrolle diente RPMI 1640-Medium mit 10 % FCS. In der Abbildung 16 sind die jeweiligen TNF α -Konzentrationen, die mit Hilfe des ELISA ausgewertet worden sind, dargestellt.

Schon nach drei Stunden zeigte sich ein signifikanter Anstieg der TNF α -Konzentration. Das Maximum wurde nach sechsstündiger Inkubation erreicht. Nach einer Stimulation mit 3 µg/ml hsp60 lag der Wert bei 1005 ± 160 pg/ml TNF α . Die TNF α -Konzentration nach der Stimulation mit 10 ng/ml LPS betrug 804 ± 82 pg/ml. Die Kurven unterschieden sich nicht signifikant. Die TNF α -Konzentration lag nach zwölf Stunden Inkubation mit Stimulans noch im Maximalbereich. Niedrigere Werte waren erst nach 24 Stunden zu beobachten. Die TNF α -Konzentration sank ab dem Zwölf-Stunden-Wert kontinuierlich ab, bis sie sich nach 48 Stunden Inkubation dem Wert der Negativkontrolle annäherte.

2. Zeitkinetik der Freisetzung von IL-10 in der Vollblutkultur

Um den zeitlichen Verlauf der IL-10-Produktion nach einer Stimulation mit hsp60 zu untersuchen, wurden die Überstände des in dem vorherigen Kapitel beschriebenen Experimentes genutzt. Das IL-10 wurde mittels ELISA nachgewiesen. Die Ergebnisse sind in der Abbildung 17 graphisch dargestellt.

Nach dreistündiger Inkubation zeigte sich kein signifikanter Unterschied zur Mediumkontrolle. Eine geringe IL-10-Konzentration ließ sich erst nach sechs Stunden Inkubation nachweisen. Bei zwölf Stunden fand man nach einer Stimulation mit humanem hsp60 5,1 \pm 0,8 ng/ml IL-10. Der Maximalwert war nach 24 Stunden Inkubation zu beobachten. Er lag nach der Stimulation mit 3 µg/ml hsp60 bei 7,8 \pm 1 ng/ml und nach der Stimulation mit 10 ng/ml LPS bei 7,4 \pm 0,6 ng/ml IL-10. Nach 48 Stunden lag die IL-10-Konzentration nach Zugabe eines Stimulans immer noch im hohen Bereich zwischen 5,5 und 6 ng/ml.

Die Wirkung von humanem hsp60 ähnelt nicht nur in Bezug auf die TNFα-Produktion der von LPS, sondern auch hinsichtlich der Induktion des Zytokins IL-10. In der Zeitkinetik der Abbildung 17 wird diese Ähnlichkeit im Stimulationsverhalten deutlich.



Abb. 17: Kinetik der IL-10-Freisetzung durch hsp60 in nativem Vollblut

Die Vollblutkultur wurde mit **3 µg/ml hsp60** und zum Vergleich mit 10 ng/ml LPS stimuliert.Die Überstände wurden nach **3 h**, **6 h**, **12 h**, **24 h** und **48 h Inkubation** abgenommen und mittels **ELISA** auf **IL-10** untersucht. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichung von 4 Ansätzen an 2 Versuchstagen. Signifikante Unterschiede zur Mediumkontrolle:**, p<0,005; *, p<0,05.

4. Desensibilisierung in der Vollblutkultur

Nachdem festgestellt wurde, daß Mono-Mac-6 Zellen bei zweifacher Stimulation eine Toleranzentwicklung zeigen (vgl. Kapitel I., 3.), stellte sich die Frage, wie sich native Zellen in einem Desensibilisierungsexperiment verhalten.

Die Vollblutkultur wurde mit $3 \mu g/ml$ hsp60 bzw. mit 10 ng/ml LPS für 24 Stunden vorbehandelt und anschließend stimuliert. Als Negativkontrolle wurde RPMI 1640-Medium mit 10 % FCS-Zusatz verwandt. Die Überstände wurden zum einen direkt nach der 24stündigen Vorbehandlung und zum anderen sechs Stunden nach der Stimulation abgenommen. Die Auswertung des Experimentes erfolgte mittels ELISA für TNF α und IL-10.



Abb. 18: Desensibilisierung von Blutzellen durch hsp60

Die Vollblutkultur wurde mit $3 \mu g/ml hsp60$ (hsp) bzw. 10 ng/ml LPS (LPS) vorbehandelt und nach 24 h Inkubation stimuliert. Als Negativkontrolle diente RPMI 1640-Medium mit 10 % FCS-Zusatz (K0). Die Überstände wurden nach 6 h Inkubationszeit abgenommen und mittels ELISA auf TNF α untersucht.

Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichung von 3 Ansätzen. Signifikante Hemmung der TNF α -Produktion nach Vorbehandlung mit hsp: **, p < 0,005; *, p < 0,05.

In der Abbildung 19 sind die Ergebnisse des TNF α -ELISA graphisch aufgetragen. Die ersten drei Balken des Diagramms stellen die TNF α -Konzentration der Überstände nach 24 Stunden dar. Nach einer Vorbehandlung mit humanem hsp60 oder mit LPS fand man im Vergleich zur Mediumkontrolle einen signifikanten Anstieg von TNF α . In dem weiteren Teil der Graphik sieht man die TNF α -Werte nach 30 Stunden. Es ist ebenfalls wieder ein signifikanter Anstieg der TNF α -Werte nach der Stimulation mit hsp60 oder LPS zu beobachten. Bei dem Ansatz, der mit hsp60 vorbehandelt und anschließend auch mit hsp60 stimuliert wurde, fand man jedoch eine geringere TNF α -Menge als bei den nur einmalig mit hsp60 stimulierten Zellen. Hsp60 desensibilisiert folglich auch in der Vollblutkultur. Im Unterschied zu den Mono-Mac-6-Experimenten fand man in der Vollblutkultur keine so deutliche Ausbildung der Toleranz

bei einer Vorbehandlung mit hsp60 und einer anschließender Stimulation mit LPS. Hingegen desensibilisierte eine Vorbehandlung mit LPS wie erwartet vor LPS und auch vor hsp60. Zusammenfassend läßt sich sagen, daß sich in der Vollblutkultur ebenso wie bei den Mono-Mac-6 Zellen eine Toleranz hinsichtlich der TNF α -Freisetzung ausbildet. Allerdings ist diese bei einer Vorbehandlung mit hsp60 und anschließender Stimulation mit LPS nicht so deutlich wie es in den Mono-Mac-6-Experimenten zu beobachten ist.



Abb. 19: IL-10-Freisetzung bei der Desensibilisierung von Blutzellen

Die Vollblutkultur wurde mit $3 \mu g/ml hsp60$ (hsp) bzw. 10 ng/ml LPS (LPS) vorbehandelt und nach 24 h Inkubation stimuliert. Die Überstände wurden nach 6 h Inkubationszeit abgenommen und mittels ELISA auf IL-10 untersucht.

Dargestellt sind die Mittelwerte ± Standardabweichung von 3 Ansätzen.

Neben der Konzentration von TNF α ist IL-10 als gegenregulatorisches Zytokin bei der Toleranz von Interesse. In der Abbildung 20 sind die Ergebnisse des IL-10-ELISA wiedergegeben. Nach 24 Stunden Vorbehandlung mit Stimulans zeigte sich ein signifikanter Anstieg der IL-10-Konzentration. Bei einer Stimulation mit 10 ng/ml LPS fand man 2,54 ± 0,02 ng/ml IL-10 und nach einer Stimulation mit 3 µg/ml hsp60 2,61 ± 0,01 ng/ml IL-10. Die IL-10-Werte der Ansätze, die eine Desensibilisierung hinsichtlich der TNF α -Freisetzung zeigten, sind nicht herunterreguliert. Ganz im Gegenteil, die IL-10-Konzentrationen waren bei diesen Ansätzen genauso hoch wie bei den Ansätzen, die einmalig mit hsp60 oder LPS stimuliert worden sind.

Diese Ergebnisse zeigen, daß zwar eine Desensibilisierung der TNF α -Freisetzung erfolgt, die IL-10-Werte jedoch wie nach einer einmaliger Stimulation hochreguliert bleiben.

In der Vollblutkultur war bei der gewählten Inkubationszeit von 24 Stunden plus sechs Stunden zwar eine Toleranz zu beobachten, aber die Unterschiede zwischen stimulierten und desensibilisierten Zellen waren nicht so groß, wie sie bei den Mono-Mac-6 Zellen gefunden worden waren. Aus diesem Grund wurden noch weitere Desensibilisierungsexperimente mit anderen Inkubationszeiten durchgeführt.

Abb. 20: Desensibilisierung der Blutzellen nach 48 h-Vorbehandlung

Die Vollblutkultur wurde mit $3 \mu g/ml hsp60$ (hsp) bzw. 10 ng/ml LPS (LPS) vorbehandelt und nach 48 h Inkubation stimuliert. Die Überstände wurden nach 14 h Inkubationszeit abgenommen und mittels ELISA auf TNF α untersucht.

Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichung von 3 Ansätzen. Signifikante Hemmung der TNF α -Produktion nach Vorbehandlung mit hsp: *, p < 0.05. In der Abbildung 21 ist ein Versuch dargestellt, bei dem die Zellen 48 Stunden lang vorbehandelt wurden und nach der Stimulation für weitere 14 Stunden inkubiert wurden. Die Dosierung der Stimulantien wurde nicht verändert.

Es zeigte sich, daß bei einer Vorbehandlung mit Endotoxin weiterhin eine Toleranz zu beobachten war. Hingegen fand man bei einer Vorbehandlung mit humanem hsp60 keine signifikanten Unterschiede zu den nur einmalig stimulierten Ansätzen. Dieser Befund, daß eine Desensibilisierung nach einer Vorbehandlung mit LPS länger möglich war als bei einer Vorbehandlung mit hsp60, deckte sich mit den Daten der Mono-Mac-6-Experimente. Bei dem Versuch, der in Abbildung 15 dargestellt ist, ergab es sich ebenfalls, daß 48 h nach Vorbehandlung mit hsp60 die Toleranzwirkung abgeklungen war.

Schließlich prüfte ich, ob die nach 24 h Vorbehandlung ausgebildete Desensibilisierung sich vielleicht nur in einer verzögerten TNF α -Freisetzung äußerte. Dazu wurde nach Desensibilisierung (Vorbehandlung über 24 h) die TNF α -Freisetzung nicht nach 6 h sondern nach 24 h gemessen. Das Ergebnis des TNF α -ELISA ist in der Abbildung 22 dargestellt.



Abb. 21: Desensibilisierung der Blutzellen

Die Vollblutkultur wurde mit $3 \mu g/ml hsp60$ (hsp) bzw. 10 ng/ml LPS (LPS) vorbehandelt und nach 24 h Inkubation stimuliert. Die Überstände wurden nach 24 h Inkubationszeit abgenommen und mittels ELISA auf TNF α untersucht.

Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichung von 4 Ansätzen. Signifikante Hemmung der TNF α -Produktion nach Vorbehandlung mit hsp: **, p<0,005.

Ohne Desensibilisierung lagen die TNF α -Konzentrationen in den Kulturüberständen nach 24 h für LPS bei 458,9 ± 35,8 und für hsp60 bei 833,6 ± 18,7. Die Desensibilisierung mit LPS oder hsp60 führte zu einer fast vollständigen Hemmung der TNF α -Freisetzung zu diesem späten Zeitpunkt (24 h). Demnach ist eine Toleranz der Blutzellen gegenüber den Stimulantien und nicht nur eine verzögerte Reaktion zu beobachten.

4. Aufheben der Desensibilisierung von Blutzellen

Da es sich gezeigt hatte, daß auch in der Vollblutkultur eine Desensibilisierung stattfinden kann, war es interessant herauszufinden, ob diese auch durch Zwischenkinkubation mit anderen Stimulantien zu verhindern ist.

Die Vollblutzellen wurden zwölf Stunden lang mit 3 μ g/ml hsp60 oder 10 ng/ml LPS vorbehandelt. Die Zwischeninkubation wurde mit 10 ng/ml IFN γ , 50 ng/ml GM-CSF oder einem Gemisch aus beiden durchgeführt. Diese Zwischeninkubation dauerte zwölf Stunden. Danach wurden die Zellen mit 3 μ g/ml hsp60 oder 10 ng/ml LPS stimuliert. Die Überstände wurden nach insgesamt 36 Stunden abgenommen und mittels ELISA auf TNF α untersucht.

Die Ergebnisse sind in der Abbildung 23 gezeigt. Die Graphik ist in zwei Abschnitte unterteilt, wobei rechts die Aufhebung der LPS-Desensibilisierung und links die der hsp60-Desensibilisierung dargestellt sind. Es sind sowohl die signifikanten Unterschiede zu der Mediumkontrolle als auch die zwischen den Ansätzen angegeben.

Zunächst wird das Aufheben der LPS-Toleranz beschrieben. Nach einer Stimulation der Vollblutkultur mit LPS kam es zu einem signifikanten Anstieg der TNF α -Konzentration. Bei einer Vorbehandlung und Stimulation mit LPS lagen die TNF α -Werte signifikant niedriger als bei einer alleinigen Stimulation (p < 0,005). Es wurde eine Toleranz ausgebildet. Falls die Zwischeninkubation mit IFN γ statt mit Medium durchgeführt wurde, lag die TNF α -Menge im Bereich derer, die bei einer einfachen Stimulation erreicht wurde. Nach einer Zwischeninkubation mit GM-CSF lagen die Werte zwar etwas niedriger, aber es bestand trotzdem ein signifikanter Unterschied zu dem Ansatz mit LPS-Toleranz (p < 0,05). Wenn die Zwischeninkubation mit IFN γ und GM-CSF gleichzeitig durchgeführt wurde, überstieg die TNF α -Konzentration den Wert, den sie nach einer einmaligen Stimulation mit LPS erreichte.

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß die Ausbildung der LPS-Toleranz durch eine Zwischeninkubation mit IFNγ, GM-CSF oder durch die gleichzeitige Gabe beider Stimulantien teilweise oder ganz zu verhindern ist.



Abb. 22: Aufheben der Desensibilisierung von Blutzellen durch Zwischeninkubation mit Zytokinen

Die Vollblutkultur wurde mit $3 \mu g/ml hsp60$ (hsp) oder 10 ng/ml LPS (LPS) vorbehandelt. Nach der 12stündigen Inkubation folgte eine Zwischeninkubation mit 10 ng/ml IFN γ (IFN), 50 ng/ml GM-CSF (GM) oder einem Gemisch aus den beiden Stimulantien. Nach 24 h wurden die Zellen mit $3 \mu g/ml$ hsp60 (hsp) oder 10 ng/ml LPS (LPS) stimuliert. Als Negativkontrolle wurde das Medium für Mono-Mac-6 (K0) eingesetzt. Die Überstände wurden nach 36 h Inkubationszeit abgenommen und mittels ELISA auf TNF α untersucht.

Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichung von 3 Ansätzen. Signifikante Unterschiede zur Mediumkontrolle und zwischen den Ansätzen: *, p < 0.05; **, p < 0.005.

Der Versuchsaufbau für hsp60 entsprach dem für LPS. Der Ansatz, bei dem die Vollblutkultur für zwölf Stunden mit 3 μ g/ml hsp60 stimuliert wurde, zeigte hohe TNF α -Werte. Wurden die Zellen hingegen mit humanem hsp60 vorbehandelt und stimuliert, so fand man signifikant niedrigere TNF α -Werte. Es hatte eine Desensibilisierung stattgefunden. Im Gegensatz zu dem Endotoxin LPS wurde die hsp60-Desensibilisierung nicht durch eine Zwischeninkubation mit IFN γ oder GM-CSF verhindert. Beide Ansätze zeigten keinen signifikanten Unterschied zu dem Desensibilisierungsansatz. Nach einer Zwischeninkubation mit IFN γ und GM-CSF war

jedoch ein signifikanter Unterschied zu der TNF α -Konzentration bei der Desensibilisierung zu sehen (p < 0,005).

Daraus folgt, daß die durch hsp60 hervorgerufene Toleranz nicht durch eine Zwischeninkubation mit IFNγ oder GM-CSF aufzuheben ist, sondern nur durch eine Zwischeninkubation mit beiden Stimulantien gleichzeitig.

Diskussion

1. Humanes hsp60 stimuliert humane Monozyten

Das humane 60 kDa Hitzeschockprotein ist als molekulares Chaperon bekannt²⁹. Neben dieser essentiellen Rolle bei Proteinsyntheseschritten stellt es ein immundominantes Antigen dar³⁷. Humanes hsp60 weist eine hohe Homologie der Peptidsequenz mit Autoantigenen¹⁰⁹ und pathogenen Organismen¹¹⁰ auf. T-Zellreaktionen gegen humanes hsp60¹¹¹ und Antikörper, die gegen dieses Protein gerichtet sind, wurden mehrfach beobachtet¹¹². Daher wurde vermutet, daß ein Zusammenhang zwischen Hitzeschockproteinen und der Pathogenese von Autoimmunerkrankungen besteht¹¹³.

Ausgangspunkt für die vorliegende Arbeit war die Beobachtung einer stimulierenden Wirkung des humanen hsp60 auf Zellen der murinen J774-Makrophagenlinie¹¹⁴. Nach einer Inkubation mit rekombinantem humanem hsp60 wurde 1999 auch eine proinflammatorische Antwort in humanem Gefäßendothel und glatten Muskelzellen beschrieben¹¹⁵. Zuvor war bereits die immunstimulierende Eigenschaft des mykobakteriellen hsp60 beobachtet worden¹¹⁶.

In dieser Arbeit sollten die stimulierenden Eigenschaften des humanen hsp60 auf humane Monozyten untersucht werden. Die Interaktionen zwischen Makrophagen und hsp60 sollten in Zusammenhang mit dem Diabetes mellitus Typ I näher analysiert werden. Als Untersuchungsparameter dienten in der vorliegenden Arbeit das proinflammatorische Zytokin TNF α^{117} und auf mRNA-Niveau die Th1-Zytokine IL-12, IL-15 und IL-18. Zunächst wurden die Experimente mit der Mono-Mac-6-Zellinie durchgeführt. Später wurde die Wirkung von humanem hsp60 an der Vollblutkultur getestet.

Als Positivkontrolle wurde LPS eingesetzt. Neben der lang bekannten stimulierenden Wirkung auf Makrophagen¹¹⁸ bot sich LPS zusätzlich als ein guter Vergleichspartner zur Wirkungsstärke des humanen hsp60 an. Mit Polymyxin B durchgeführte Kontrollexperimente schlossen eine Kontamination des hsp60 mit LPS aus. Polymyxin B neutralisiert Endotoxin, indem es sich an den Lipid-A-Rest von LPS bindet¹¹⁹. Dadurch kann LPS nicht mehr an den Zelloberflächenrezeptor binden und die Zellen somit nicht aktivieren. Die eingesetzte

Konzentration von 0,1 μ g/ml Polymyxin B reichte aus, um eine mögliche LPS-Kontamination bei hsp zu neutralisieren¹²⁰.

TNF α ist ein proinflammatorischer Mediator bei akuten Immunreaktionen. Bei der Entstehung des Diabetes mellitus Typ I kommt TNF α eine wichtige Rolle zu¹²¹. Bei der transgenen Expression von löslichen TNF α -Rezeptoren in der NOD-Maus wurde die zentrale Bedeutung des TNF α bei der Entstehung der Insulitis und der folgenden β -Zellzerstörung deutlich¹²². NOD-Mäuse, deren hohe TNF-Titer im Blut durch den transgen exprimierten, löslichen TNF-Rezeptor kontinuierlich neutralisiert wurden, waren im Gegensatz zu den nicht transgenen Mäusen vor der Entwicklung eines spontanen Diabetes mellitus geschützt. Ebenso konnte durch Cyclophosphamid-Injektionen keine weitere Progredienz der Erkrankung provoziert werden.

Die hier vorgelegten Ergebnisse zeigen, daß humanes hsp60 eine TNFα-Produktion in humanen Monozyten induziert. Die stimulierende Wirkung von humanem hsp60 konnte sowohl in der Mono-Mac-6- als auch in der Vollblutkultur gezeigt werden. Diese Entdeckung, daß humane Monozyten stimuliert werden, zeigt, daß hsp60 mehr als ein vom primitiven Immunsystem erkanntes mikrobielles Antigen darstellen könnte. Es könnte als ein immunstimulierendes Signal fungieren, das von körpereigenen Zellen freigesetzt wird.

In den Experimenten zeigte sich eine Dosisabhängigkeit der Monozytenstimulation durch hsp60. Bereits eine Konzentration von 1 μ g/ml hsp60 reichte aus, um eine signifikante proinflammatorische Reaktion auszulösen. Die Zeitabhängigkeit der TNF α -Freisetzung zeigte sowohl in der Mono-Mac-6- sowie in der Vollblutkultur eine auffällige Parallelität zwischen humanem hsp60 und LPS. Diese Ähnlichkeit in der stimulierenden Wirkung wurde auch in der Zeitkinetik von IL-10 in der Vollblutkultur deutlich. Man könnte dieses als einen Hinweis auf einen ähnlichen Wirkmechanismus deuten.

Die Induktion der Zytokinproduktion erfordert in nicht stimulierten Monozyten oder Makrophagen eine vorhergehende Transkription¹²³. Somit ist anzunehmen, daß humanes hsp60 einige stimulierende Effekte auf dem Level der Gentranskription haben muß. Dafür würde die Beobachtung sprechen, daß IL-12 und IL-15 mRNA nach Stimulation mit hsp60 in den Makrophagen erhöht ist¹²⁴. Die Maximalwerte sind nach einer Inkubation von ca. sieben Stunden zu finden. Diese Zeit paßt zu einem klassischen, Rezeptor-mediierten

Signaltransduktionsweg, wie er für die LPS-induzierte Transkription von IL- 12^{125} und IL- 15^{126} Genen beschrieben wurde.

In der vorliegenden Arbeit konnte bei Mono-Mac-6-Zellen eine Induktion der Th1-Zytokine TNFα, IL-15 und IL-18 nach Stimulation mit hsp60 nachgewiesen werden.

Der Mechanismus der Stimulation durch mikrobielles hsp60 ist bisher nicht genau bekannt. Daher konnte für das humane hsp60 kein analoger Mechanismus überprüft werden.

Es kommen zwei unterschiedliche Stimulationsmechanismen des hsp60 in Frage. Das 60 kDa Hitzeschockprotein bindet als molekulares Chaperon an unreife oder teilweise denaturierte Proteine¹²⁷, welche auf der Oberfläche von Makrophagen oder im Zellinneren lokalisiert sind. In das Innere der Zelle gelangt hsp60 durch Endozytose. Hsp60 würde seine physiologische Funktion¹²⁸ ausüben, nur mit dem Unterschied, daß es exogen zugeführt ist und sich die Zielmoleküle voneinander unterscheiden.

Die andere Möglichkeit bestände darin, daß Makrophagen auf ihrer Oberfläche einen Rezeptor exprimieren, der bestimmte Epitope des hsp60 erkennt. Diese Epitope würden bakterielles und humanes Hitzeschockprotein gemeinsam haben müssen. Tatsächlich sind große Teile, über 50 %, dieser beiden Moleküle identisch¹²⁹. Aufgrund der oben erwähnten Ähnlichkeit der stimulierenden Wirkung zu LPS könnte man vermuten, daß die Signale beider Substanzen über den selben Rezeptor mediiert werden. Dagegen spräche jedoch das Ergebnis, daß die stimulierende Wirkung von mykobakteriellem hsp60 nicht durch einen Antikörper gegen den LPS-Rezeptor CD14 gehemmt werden konnte¹³⁰. Das Signal von LPS wird in Maus-Zellen allerdings ebenfalls über den Toll-like 4 Rezeptor (Tlr4) mediiert¹³¹. In menschlichen Zellen scheint der Tlr2 wie auch der Tlr4 LPS-Signale zu mediieren, wobei der genaue Weg noch nicht vollständig geklärt ist¹³². Die Toll-like Rezeptoren sind das humane Homolog zu dem Toll-Protein von Drosophila. Sie gehören zu der Familie der IL-1-Rezeptoren, welche eine Verbindung zu dem Signaltransduktionsweg haben, der die IL-1-Rezeptor assoziierte Kinase wie auch NF-KB einschließt¹³³. Makrophagen aus C3H/HeJ-Mäusen, welche eine Mutation des Toll-like 4 Rezeptors aufweisen, zeigten keine Reaktion auf eine Stimulation mit hsp60¹³⁴. Sowohl die hsp60-induzierte Freisetzung von TNFα als auch die von NO waren von einem funktiontüchtigen Tlr4 abhängig, wobei LPS interessanterweise trotz des defekten Tlr4 eine abgeschwächte Reaktion der Makrophagen hervorrufen konnte, da es noch die Expression der Metalloproteinase-9 stimuliert¹³⁵. Diese Beobachtungen legen nahe, daß Tlr4 bzw. die Toll-like Rezeptoren nicht nur eine Funktion im

Rahmen des angeborenen Immunsystems gegen mikrobielle Antigene haben, sondern auch physiologische Funktionen als Rezeptor für endogene Liganden erfüllen. Extrazelluläres hsp60 scheint ein endogener Ligand des Tlr4 zu sein¹³⁴. Dafür spricht auch, daß es sich sowohl bei den Toll-like Rezeptoren wie auch beim hsp60 um evolutionär konservative Strukturen handelt, die beide schon früh in der Phylogenese zu finden sind.

Makrophagen reagieren demnach auf autologes hsp60, wenn es Zugang zu ihrer Zelloberfläche bekommt. Dieses geschieht sowohl bei der Freisetzung von hsp60 bei Nekrose von Gewebszellen als auch bei der Translokation von hsp60 zur Plasmamembran, die man als Antwort auf diverse Arten von Streß beobachten kann¹³⁶.

2. Humanes hsp60 desensibilisiert Monozyten

Der Kontakt mit humanem hsp60 verändert den Reaktionszustand humaner Monozyten. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, daß die für LPS bekannte Desensibilisierung¹³⁷ ebenfalls bei humanem hsp60 zu beobachten ist. In der Mono-Mac-6-Kultur war nicht nur eine Toleranzentwicklung bei Vorbehandlung und Stimulation mit hsp60 sondern ebenso bei Vorbehandlung mit LPS und Stimulation mit hsp60 zu finden. Eine Vorbehandlung mit hsp60 desensibilisierte auch eine Stimulation mit LPS. Die Experimente wurden mit Polymyxin B-Zusatz wiederholt, welches verdeutlichte, daß es sich hierbei um keinen Effekt aufgrund einer Endotoxinkontamination handelte. Diese Befunde unterstützen die Hypothese, daß der Wirkmechanismus des humanen hsp60 dem von LPS ähnelt. In der Vollblutkultur wurden vergleichbare Ergebnisse gefunden. Jedoch war die Toleranzentwicklung nach einer Vorbehandlung mit hsp60 und anschließender Stimulation mit LPS statistisch nicht signifikant, wenngleich der Wert niedriger als bei einer einfachen Stimulation lag. Es zeigte sich jedoch bei beiden Zellkulturen, daß die Toleranzwirkung nach Vorbehandlung mit hsp60 kürzer andauerte als nach Vorbehandlung mit LPS.

Toleranz ist ein generelles biologisches Phänomen, welches bei vielen Ligand-Rezeptor-Beziehungen beobachtet wird¹³⁸. Im Gegensatz zu dem klassischen Weg der Down-Regulation ist der CD14-LPS-Rezeptor bei desensibilisierten Monozyten und Makrophagen

weiterhin präsent¹³⁹, wenngleich er bei der Toleranz moduliert zu werden scheint¹⁴⁰. Bei LPStoleranten Zellen wurde eine Akkumulation von p50/p50 Homodimeren des NF-κB Transkriptionsfaktors beobachtet. Diese führen im Gegensatz zu dem in normalen Zellen vorhandenen p50/p65 Heterodimer nicht zu der gewünschten Genexpression. Abgesehen von der fehlenden Aktivität hemmen sie sogar die DNA-Bindung von p50/p65 Heterodimeren und können somit die Genexpression von TNFα blockieren¹⁴¹. Diese Ergebnisse unterstützen die einer Hypothese, daß die LPS-Toleranz auf Änderung des intrazellulären Signaltransduktionsweges von LPS basiert. In anderen Untersuchungen wurde jedoch gezeigt, daß es in Zusammenhang mit der LPS-Toleranz zu einer Down-Regulation der Oberflächenexpression von Tlr4 kommt¹⁴². Nach einer Vorbehandlung mit LPS wurde eine signifikant reduzierte DNA-Bindungsaktivität von NF-KB beobachtet. Dieser Befund wäre mit beiden Möglichkeiten des Toleranzmechanismus zu vereinbaren. Jedoch zeigte sich bei der Untersuchung der murinen Peritonealmakrophagen nach Desensibilisierung ebenfalls eine supprimierte Expression von Tlr4-mRNA. Bei Experimenten mit Antikörpern gegen den Tlr4 ergab sich eine reduzierte Oberflächenexpression dieses Rezeptors bei LPS-desensibilisierten Zellen¹⁴². Diesen Befunden widersprechen Untersuchungen, bei denen bei endotoxintoleranten Zellen bei einer Restimulation mit LPS keine Down-Regulation der Tlr4wurde¹⁴³. Bei Genexpression beobachtet bereits diskutierter Ähnlichkeit der Toleranzentwicklung von LPS und hsp60 wäre somit sowohl an die Möglichkeit einer Down-Regulation als auch an eine Veränderung im Bereich des intrazellulären Signaltransduktionsweges zu denken.

IL-10 hat ebenso wie TGFβ eine hemmende Wirkung auf die TNFα-Produktion¹⁴⁴. Nach der Stimulation mit humanem hsp60 wurde eine vermehrte Il-10-Freisetzung nachgewiesen. Auch bei der LPS-Toleranz hatte man erhöhte IL-10-Werte gefunden¹⁴⁵. Eine Stimulation mit IL-10 hat weder auf die humane Tlr2 noch auf die Tlr4 mRNA einen Einfluß, wenngleich es ebenso wie IL-4 zu den Makrophagen deaktivierenden Zytokinen gehört¹⁴⁶. Die in dieser Arbeit gezeigte IL-10-Expression nach Desensibilisierung bei wiederholter Stimulation mit hsp60 spricht eher für eine Veränderung des intrazellulären Signaltransduktionsweges als möglichen Mechanismus der Toleranz, da es selbst zu keiner Down-Regulation des Tlr4 führt.

GM-CSF und IFN γ sind allgemein bekannte Aktivatoren von Monozyten. Sie führen zu einer deutlichen Zunahme der LPS-induzierten Sekretion von TNF α und anderen proinflammatorischen Zytokinen¹⁴⁷. Eine Inkubation mit IFN γ und GM-CSF hebt eine durch

LPS induzierte Desensibilisierung auf¹⁴⁸. In dieser Arbeit wurde gezeigt, daß diese Zwischeninkubation auch die Toleranzentwicklung der mit hsp60 stimulierten Monozyten beeinflußt. Dieses Ergebnis ließ sich sowohl bei den Mono-Mac-6-Zellen als auch in der Vollblutkultur beobachten. Der Befund hat im Hinblick auf die Rolle des humanen Hitzeschockpoteins bei entzündlichen Erkrankungen sicherlich eine zentrale Bedeutung. Unter physiologischen Bedingungen kommt es bei mehrmaliger Stimulation mit hsp60 zur Entwicklung einer Toleranz. Sendet die Zelle bzw. der Organismus jedoch Zeichen einer Entzündung, wie es in diesen Experimenten mit der Zwischeninkubation mit IFN γ und GM-CSF nachgeahmt worden ist, bleibt die Desensibilisierung aus. Es werden weiterhin proinflammatorische Zytokine freigesetzt.

Glukose scheint ebensowenig wie Insulin oder Proinsulin einen Einfluß auf den Reaktionszustand der Monozyten zu haben. Die TNF α -Freisetzung wird durch diese Substanzen nicht moduliert.

2. Humanes hsp60 als immunstimulierendes Signal

Humanes hsp60 stimuliert ähnlich dem mikrobiellen Hitzeschockprotein¹⁴⁹ Makrophagen und aktiviert auch andere Zellen des angeborenen Immunsystems¹¹⁵. Es verändert den Reaktionszustand der Monozyten in Richtung einer proinflammatorischen Immunreaktion.

Die Relevanz der proinflammatorischen Monozytenreaktion auf mikrobielles oder humanes hsp60 ist noch nicht ganz geklärt. In eukaryontischen Zellen ist der Großteil des hsp60 in den Mitochondrien lokalisiert. Man beobachtet eine erhöhte Expression von hsp60 an der Zelloberfläche unter Entzündungsbedingungen wie auch während der Wundheilung¹⁵⁰. Die lokale Überexpression von autologem hsp60 wurde gleichzeitig mit der Bildung von zellulären Infiltraten im Gewebe gefunden¹⁵¹. Humanes hsp60 wurde ebenfalls auf der Zelloberfläche von Tumorzellen gefunden¹⁵². Hsp60 scheint als allgemeiner pathologischer Marker der Zelle von Makrophagen erkannt zu werden.

Nach diesem Konzept alarmiert autologes hsp60, das zur Zelloberfläche transloziert wurde, das angeborene Immunsystem über Zellstreß. Eine lokale Exposition mit hsp60 würde zu einer frühen Antwort führen, welche eventuell eine Aktivierung des erworbenen T-Zellabhängigen Immunsystems folgt. In diesem Kontext ist beachtenswert, daß humanes hsp60 nicht nur nicht-spezifische proinflammatorische Mediatoren wie NO¹²⁴ oder TNFα induziert. Es ist auch eine Expression von IL-12, IL-15 und IL-18 zu beobachten. Bei der adaptiven Immunantwort kann IL-12 die Entstehung von Th1-Zellen fördern¹⁵³. Die Zytokine Il-12 und IL-15 spielen eine Schlüsselrolle bei der Induktion der zellulären Th1-Typ Immunantwort und stellen eine Verbindung des angeborenen Immunsystem mit der T-Zell Immunität dar¹⁵⁴. Außerdem könnte IL-12 bei der Induktion von Antigen-spezifischen Antikörperreaktionen eine Rolle spielen¹⁵⁵. Die Th1-Zytokine IL-12 und IL-18 sind in der frühen Phase der Pathogenese des Diabetes mellitus Typ I kritisch¹⁵⁶. Bei dem Cyclophosphamid beschleunigten Diabetes in NOD-Mäusen wurde vor dem Entstehen einer Intrainsulitis eine

gesteigerte Genexpression von IL-12 und IL-18 beobachtet¹⁵⁷. Bei prädiabetischen NOD-Mäusen konnte durch eine tägliche Injektion von IL-12 eine Progredienz zur Intrainsulitis sowie eine schnellere Diabetesmanifestation provoziert werden¹⁵⁸. Weitere proinflammatorische Zytokine wie TNF α , IL-2, IFN γ oder IL-6 führten bei transgener Expression in Inselzellen von Mäusen zwar zur Insulitis, jedoch nicht zu einer beschleunigten Manifestation eines Diabetes mellitus¹⁵⁹.

Bei der Antwort auf mykobakterielle Infektionen scheint die frühe IL-12 Produktion von Makrophagen sowohl in vitro als auch im Tiermodell von IFN γ und TNF α abhängig zu sein¹⁶⁰. Murine Makrophagen, die eine Deletion entweder für den IFN γ - oder für den TNF-Rezeptor 1 (p55) aufwiesen, produzierten in vitro sowohl bei mykobakterieller Infektion als auch bei Stimulation mit rIFN γ kein IL-12. Auch in vivo wurde bei den Mäusen, die einen defekten IFN γ - oder TNF-Rezeptor hatten, nicht die bei der Infektion mit Mycobacterium bovis übliche frühe IL-12-Produktion in der Milz beobachtet. Das hieße, daß die Induktion von endogenem TNF α eine Voraussetzung für die IL-12 Gentranskription darstellt. In einem Maus-Modell für Endotoxintoleranz fand man sowohl in vivo als in vitro neben der reduzierten IFN γ -Produktion eine verminderte IL-12-Freisetzung im desensibilisierten Status¹⁶¹. Diese konnte auch bei Kostimulation mit dem Zytokin IL-18 nicht verändert werden. Man könnte diesen Befund auf eine verminderte Anzahl der NK-Zellen in den Endotoxin-toleranten Mäusen zurückführen.

Über die Regulationsmechanismen des IL-15-Gens ist noch nichts bekannt. Die Wirkung von IL-15 auf die Differenzierung in Richtung Th1 oder Th2 bleibt noch unklar. Es wurde jedoch berichtet, daß Il-15 die Entzündung durch die Induktion des von Monozyten produzierten TNF α verstärken und aufrechterhalten kann¹⁶².

Unabhängig von der Tatsache, ob das hsp60 nun an der Zelloberfläche oder in den Mitochondrien lokalisiert ist, würde es beim Zelltod und Freisetzung zu hohen lokalen Konzentrationen kommen. Diese wären sicherlich ausreichend, um das angeborene Immunsystem zu stimulieren. Es stellte ein Gefahrensignal dar. Für weitere Aussagen müßte man den stimulatorischen Effekt von membrangebundenem hsp60 mit dem von freiem hsp60 vergleichen. Es ist bekannt, daß hsp60 auch in löslicher Form von Zellen freigesetzt wird. So wurde bei Patientinnen mit Endometriose eine erhöhte Expression von hsp60 in der Perotonealflüssigkeit gefunden¹⁶³. Man beobachtete bei diesem Befund gleichzeitig proinflammatorische Zytokine und aktivierte Makrophagen.

Hsp60 ist ebenfalls ein Schlüsselantigen des erworbenen Immunsystems. Man beobachtet hsp60 in der Immunabwehr gegen infektiöse Pathogene¹⁶⁴ sowie bei chronischen Gewebsentzündungen angenommener autoimmuner Natur²³. Eine experimentell induzierte sterile Entzündung induzierte selbst hsp60-spezifische T-Zellen¹⁶⁵.

Humanes hsp60 wirkt in den stimulierenden Eigenschaften auf Makrophagen synergistisch mit IFN γ^{124} . Dieses Ergebnis stimmt mit vorhergehenden Studien mit mykobakteriellem hsp65¹⁶⁶ überein. Es spricht für die Rolle von hsp60 in den Regulationskreisen zwischen angeborenem und erworbenem Immunsystem.

Der Toll-like 4 Rezeptor (Tlr4) erscheint als möglicher Rezeptor für hsp60, da Mäuse, die eine Mutation dieses Rezeptors aufwiesen, wie im vorherigen Kapitel erläutert, keine Reaktion auf eine Stimulation mit hsp60 zeigten¹³⁵. Im Rahmen des angeborenen Immunsystems müssen eine Vielzahl von Pathogenen mit nur vergleichsweise wenigen Rezeptoren von eigenen Strukturen unterschieden werden¹⁶⁷. Dieses geschieht, indem evolutionär konservative molekulare Strukturen, sogenannte "pathogen-associated molecular patterns (PAMPs)", welche nicht in weiterentwickelten Eukaryonten zu finden sind, von den Rezeptoren erkannt werden. Ein klassisches Beispiel hierfür ist LPS, welches typischerweise das angeborenen Immunsystems aktiviert¹⁶⁸. Die essentielle Struktur stellt hierbei das konservative Lipid A, insbesondere die langkettige Fettsäurekomponente, dar¹⁶⁹. Hitzeschockproteine sind in dieser Hinsicht sicherlich problematisch, da sie zum einen als mikrobielle Pathogene zum anderen jedoch als physiologische Zellkomponenten vom Körper zu erkennen sind. Insgesamt wurden neun verschiedene Toll-like Rezeptoren in Säugetieren beschrieben¹⁷⁰. Aufgrund der genetischen Daten, die bisher über diese Rezeptorfamilie bekannt sind, scheint jeder Toll-like Rezeptor seine eigene Funktion und Bedeutung zu haben. Bisher ist jedoch noch unbekannt, ob die Toll-like Rezeptoren die PAMPs direkt binden oder ob diese Bindung über einen indirekten Weg, wie es für das Drosophila Toll vermutet wird, erfolgt¹⁶⁷. Mikrobielle Pathogene aktivieren einer Kaskade von Proteasen, welche einen Peptidliganden für den Rezeptor herstellen¹⁷¹. Hsp könnte als molekulares Chaperon mit solchen Peptidstrukturen gekoppelt sein. LPS scheint jedoch eher direkt an den Tlr4 zu binden¹⁷². Interessanterweise mediiert der Tlr4 nach Transfektion in Mäusen bei Bindung des Lipid IVa, einer Teilstruktur des Lipid A, eine proinflammatorische Antwort. Im Gegensatz dazu ist er nach Transfektion bei menschlichen Makrophagen als ein Antagonist der entzündlichen Reaktion zu beobachten. Daraus kann gefolgert werden, daß der Tlr4 entscheidet, wie die Makrophagen auf das Lipid IVa reagieren.

Tlr4 war das erste humane Homolog, welches für das Drosophila Toll entdeckt wurde¹³³. Über den Tlr4 werden durch NF- κ B kontrollierte Gene wie IL-1, IL-6 oder IL-8 aktiviert, wodurch eine Verbindung zu dem angeborenen Immunsystem hergestellt ist. Der aktive Tlr4 induziert jedoch ebenso Mitglieder der B7 Familie, Moleküle, die für eine durch Antigenpräsentierende Zellen ausgelöste Aktivierung naiver T-Zellen wichtig sind. Dadurch scheint bei dem Tlr4 eine wichtige Verbindung zwischen der Pathogenerkennung und der Induktion einer erworbenen Immunantwort zu bestehen¹⁶⁷.

3. Die Bedeutung des humanen hsp60 beim Diabetes mellitus Typ I

Humanes hsp60 könnte als ein Auslöser der Insulitis beim IDDM fungieren. Bei NOD-Mäusen beobachtete man signifikant erhöhte Werte für hsp60 im Zytosol der β -Zellen in dem Zeitraum vom Anfang der 4. Woche (0,85 % Insulitis) bis hin zur 7. Woche (100 % Insulitis)¹⁷³. Diese Veränderung der hsp60-Menge trat zeitgleich mit der Insulitis auf. Antikörper gegen humanes hsp60 waren ebenfalls ab der 7. Woche nachweisbar. Diese Antikörper erreichten in der 9. bis 15. Woche ihr Maximum. Kurz vor Auftreten des Diabetes waren sie nicht mehr nachweisbar. Die Expression von hsp60 auf der Zelloberfläche von β-Zellen könnte verschiedene Ursachen haben. Man könnte sie bei metabolischen Überbelastungen, Viren- oder Bakterieninfektionen sowie nach Einwirkung von Umwelttoxinen beobachten. Gerade Inselzellen weisen eine besonders hohe Empfindlichkeit gegenüber Sauerstoffradikalen oder Stickstoffmonoxid auf¹⁷⁴. Sie reagieren auf die Freisetzung dieser Stoffe mit einer Streßreaktion, die der Reaktion auf einen Hitzeschock gleicht. Falls die Zelloberflächenexpression von hsp60 auf β-Zellen ein bestimmtes Niveau erreichen würde, würde die Zelle als krank erkannt werden. Je nach Intensität des Signals würden die Monozyten darauf reagieren. Die isolierte Freisetzung von hsp60 reicht, wie in den Experimenten der vorliegenden Arbeit gezeigt wurde, jedoch nicht aus, um eine chronische Entzündung beispielsweise im Sinne einer progredienten Insulitis auszulösen. Vielmehr wird dazu noch ein zweites proinflammatorisches Signal wie IFNy benötigt. Falls eine solche Barriere nicht existieren würde, käme es in einem Organismus zu ständigen chronischen Entzündungen. Um eine maximale immunologische Aktivierung der Makrophagen zu erreichen, bedarf es zweier unabhängiger Stimuli¹⁷⁵. Ein Signal stellt das Th1-Zytokin IFNy das zweite zumeist ein mikrobielles Produkt wie LPS oder wie in der vorliegenden Arbeit hsp60 dar. Bei NOD-Mäusen konnte nach einer Gabe von Antikörpern gegen IFN γ^{176} oder einer Gabe von rekombinantem IL-10¹⁷⁷ die β -Zellzerstörung und somit der Diabetes mellitus verhindert werden.

Die von aktivierten Makrophagen freigesetzten Entzündungsmediatoren wie beispielsweise TNF α können die β -Zellen über eine Schädigung der Mitochondrien und der Zellmembranfunktionen zur Apoptose und Nekrose bringen. Die morphologische Beobachtung der "single cell insulitis" ⁹⁰ bei NOD-Mäusen unterstützt die Hypothese, daß aktivierte Makrophagen die entscheidende Rolle bei der Insulitisentstehung spielen. Makrophagen stellen die ersten immunoinflammatorischen Zellen dar, die die Inselzellen infiltrieren. In direkter Nachbarschaft einiger Makrophagen in den Langerhans'schen Inseln konnten abgestorbene β -Zellen beobachtet werden.

In Bezug auf die Insulitisprogression ist sicherlich beachtenswert, daß die von humanem hsp60 aktivierten Makrophagen IL-12 produzieren¹²⁴. IL-12 stellt ein Schlüsselzytokin bei der Immunregulation dar, welches T-, B- und NK-Zellen in verschiedenen Phasen aktivieren kann¹⁷⁸. IL-12 könnte ebenso wie die Zytokine IL-15 und IL-18 die Entstehung von autoimmunen Th1-Zellen fördern. Es könnte sich eine durch Th1-Zellen vermittelte zelluläre Immunität gegen Inselzellen ausbilden. Die Toleranz für β -Zellantigene würde verloren

gehen. Ausgelöst durch die Stimulierung mit den β-Zellantigenen würden autoimmune Th1-Zellen Zytokine wie TNFα, IFNγ, IL-12 und IL-18 innerhalb der Inseln produzieren. Diese Mediatoren bewirken eine fortschreitende Differenzierung von Th0- zu Th1-Zellen¹⁷⁹. Sie führen zu einer weiteren Monozytenaktivierung. Außerdem induzieren TNFα und IFNγ eine Freisetzung von NO, welche zur Schädigung des Zellkerns und der Mitochondrien führt¹⁸⁰. In Untersuchungen zeigte sich, daß gerade Inselzellen im Vergleich zu anderen Zelltypen besonders empfindlich auf NO reagieren. Auf diese Weise könnte man die progressive immunologische Zerstörung der insulinproduzierenden β-Zellen erklären.

Bei der Pathogenese des Diabetes mellitus könnte humanes hsp60 neben der Aktivierung von Makrophagen bei den Inselzellen noch andere wichtige Rollen spielen. Hsp60 scheint an der MHC-I-Zelloberflächenexpression und der endogenen Antigenpräsentation von Tumorzellen beteiligt zu sein¹⁸¹. Es hat im Rahmen seiner Funktion als Chaperon die Aufgaben, bei der Proteinfaltung, Translokation und Degradierung von Proteinen mitzuwirken. Die von hsp prozessierten Antigenfragmente werden mittels MHC-I präsentiert. Diabetische Inselzellen scheinen eine Hyperexpression von MHC-I aufzuweisen¹⁸². Diese auffällige MHC-I-Expression der Inselzellen kann durch Autoimmun-Diabetes-fördernde Nahrungsmittel wie Gluten verstärkt werden¹⁸³. Eine erhöhte MHC-I-Expression scheint für die Initiation vom Typ I Diabetes bei NOD-Mäusen erforderlich zu sein¹⁸⁴. Es wäre möglich, daß humanes hsp60 die Hyperexpression von MHC-I in den β-Zellen unterstützt. Dieser Hypothese widerspricht jedoch der Befund, daß die Inselzellen von diabetischen BB-Ratten im Vergleich zu den Inselzellen einer nicht-diabetischen Rattenart eine verminderte Streßreaktion aufweisen¹⁷⁴. Eine experimentell durch Toxine ausgelöste Streßreaktion, welche mit einer erhöhten Expression von hsp70 einherging, korrelierte positiv mit der Menge des intrazellulär vorhandenen NAD+ in den untersuchten β-Zellen. Das Fehlen einer protektiv wirksamen Streβantwort in den Inselzellen der zu Diabetes neigenden BB-Ratten könnte eine β-Zelllyse und eine Freisetzung von Autoantigenen unterstützen. Dieses könnte für den Beginn und die Progression der Erkrankung von Bedeutung sein. Jedoch wäre eine erhöhte MHC-I-Expression der Inselzellen eine Voraussetzung für die von einigen Virusantigenen durch molekulares Mimikri induzierte Immunreaktion gegenüber den Inselzellen¹⁸⁵.

In weiteren Studien gilt es, den genauen molekularen Mechanismus der hsp60-Stimulation zu erforschen. Es wäre interessant festzustellen, ob die Monozyten von Patienten mit Diabetes mellitus Typ I eine stärkere Reaktion auf hsp60 zeigen als die von gesunden Kontrollpersonen.

Bei der Pathogenese des IDDM wäre eine Schwächung der Toleranz der Monozyten gegenüber hsp60 als ein wesentlicher Faktor denkbar. In dieser Arbeit wurde gezeigt, daß Monozyten nach einer Stimulation ihren Reaktionszustand derart veränderten, daß sie auf eine weitere Stimulation mit keiner oder mit einer stark reduzierten proinflammatorischen Immunantwort reagierten. Dieses scheint ein physiologischer Mechanismus zu sein, der eine unbegrenzte Ausweitung einer proinflammatorischen Zellantwort verhindern soll. Bei einer Nachahmung eines entzündlichen Milieus jedoch, wie es in der vorliegenden Arbeit mit der Zwischeninkubation mit GM-CSF und IFNy gelungen war, fand keine Ausbildung einer Toleranz statt. In Bezug auf die Insulitis beim Diabetes mellitus Typ I bedeutet dieses Ergebnis, daß bei dem entzündlichen Geschehen in den Langerhans'schen Inseln humanes hsp60 ein wesentlicher Faktor für die weitere Progression der Insulitis darstellen könnte. Aufgrund eines noch unbekannten auslösenden Faktors könnte diese Reaktion mit der Zelloberflächenexpression von hsp60¹⁸⁶ beginnen. Bei gleichzeitiger Freisetzung von IFNy könnte es zu einer nahezu unlimitierten entzündlichen Destruktion kommen. Bei dem Zelltod würden wiederum große Mengen von humanem hsp60 freigesetzt werden, welche Makrophagen aktivieren und zu einer fortschreitenden proinflammatorischen Reaktion führen. Bei nun bekanntem Phänomen der Toleranzreaktion auf humanes hsp60 und deren Aufhebung durch ein entzündliches Milieu gilt es, den genauen molekularen Mechanismus zu erforschen. Dadurch könnte bei pathologischer Aufhebung der Toleranz, welche zwangsläufig zu einer chronischen Entzündung führen würde, der verantwortliche Rezeptor medikamentös blockiert oder moduliert werden. Ein anderer Ansatz wäre, den möglichen auslösenden Faktor, der zu der initialen Oberflächenexpression von hsp60 und der folgenden Freisetzung von proinflammatorischen Zytokinen führt, näher zu definieren, um bei den Diabetes prädisponierten Personen beispielsweise durch eine gezielte Wahl der Nahrungsmittel eine Prophylaxe betreiben zu können.

Zusammenfassung:

Aktivierung und Desensibilisierung humaner Monozyten durch humanes Hitzeschockprotein 60

Ulrike Syldath

Bei der Immunpathogenese des Diabetes mellitus Typ I kommt den Makrophagen in der frühen Phase der Insulitis eine wichtige Bedeutung zu. Das humane 60 kDa Hitzeschockprotein aus β -Zellen ist möglicherweise an der initialen Entzündung beteiligt. In dieser Arbeit wurde die Hypothese geprüft, ob humanes hsp60 immunstimulierend auf humane Monozyten wirkt und eine proinflammatorische Immunreaktion auslöst. Außerdem wurde eine mögliche Toleranzentwicklung gegen humanes hsp60 untersucht. Als Parameter der Monozytenaktivierung diente die TNF α -Sekretion, welche im Überstand von Zellkulturen mittels Sandwich-ELISA gemessen wurde. Die Th1-Zytokine IL-12, IL-15 und IL-18 wurden mittels semiquantitativer RT-PCR analysiert. Mittels ELISA untersuchte man auch IL-10 und TGF β als Zytokine, die der Monozytenaktivierung entgegenwirken.

Humanes hsp60 stimuliert sowohl die Mono-Mac-6-Zellen als auch humane Monozyten der Vollblutkultur. Die Stimulation ist dosisabhängig. Die Zeitkinetik entspricht der stimulatorischen Wirkung von LPS, welches einen Hinweis auf einen ähnlichen molekularen Mechanismus gibt.

Nach Stimulation mit humanem hsp60 wurde eine Toleranz gegenüber der stimulierenden Wirkung von hsp60 beobachtet. Diese Desensibilisierung konnte mittels einer Inkubation mit IFNγ und GM-CSF aufgehoben werden. Diese Befunde zeigen, daß humanes hsp60 eine proinflammatorische Antwort in humanen Monozyten induziert. Sowohl proinflammatorische Mediatoren wie auch Th1-Zytokine werden durch humanes hsp60 induziert. Dieses macht hsp60 zu einem Gefahrensignal von autologen Zellen. In Steßsituationen könnte die Überexpression von hsp60 eine Entzündungsreaktion des natürlichen Immunsystems einleiten und eine Immunreaktion vom Th1-Typ (des erworbenen Immunsystems) vorbereiten. Wird durch ein zweites proinflammatorisches Signal wie IFNγ oder GM-CSF die Toleranz gegen autologes hsp60 aufgehoben, könnte es zu einer chronischen Entzündung kommen. Damit könnte die lokale Expression von hsp60 einen wesentlichen pathogenetischen Faktor der progressiven Insulitis beim Diabetes mellitus Typ I darstellen.

Literatur

- Riede, U.-N., G. Klöppel: Inselorgan (endokriner Pankreas). In: U.-N- Riede, H.-E.
 Schäfer (1995): Allgemeine und spezielle Pathologie, Thieme, Stuttgart-New York 1015.
- 2 Kolb, H.: Diabetes. In: D. Gemsa, J. R. Kalden, K. Resch (1997): Immunologie. Grundlagen, Klinik, Praxis, Thieme, Stuttgart-New York 540-547.
- 3 Nepom, G. T. (1993): Immunogenetics and IDDM. Diabet. Rev. 1,93.
- 4 Thorsby, E., K. S. Ronningen (1993): Particular HLA-DQ molecules play a dominant role in determining susceptibility or resistance to type 1 (insulin-dependent) diabetes mellitus. Diabetologia 36, 371.
- 5 Zielasek, J., R. A. Jackson, G. S. Eisenbarth (1989): The potentially simple mathematics of type 1 diabetes mellitus. Clin. Immunol. Immunopathol. 52, 347-365.
- 6 Yoon, J. W. (1990): The role of viruses and environmental factors in the induction of diabetes. Curr. Top. Microbiol. Immunol. 164, 95.
- Pipeleers, D., Z. Ling (1992): Pancreatic beta cells in insulindependent diabetes.Diabet. Metab. Rev. 8, 209.

Thai, A.-C., G. S. Eisenbarth (1993): Natural history of IDDM. Diab. Rev. 1,1.

8 Vandewalle, C. L., A. Falorni, S. Svanholm, A. Lernmark, D. G. Pipeleers, F. K. Gorus, The Belgian Diabetes Registry (1995): High diagnostic sensitivity of glutamate decarboxylase autoantibodies in insulin-dependent diabetes mellitus with clinical onset between age 20 and 40 years. J. Clin. Endocrinol. Metab. 80, 846-851.

- 9 Hauner, H., L. von Ferber, I. Köster (1992): Schätzung der Diabeteshäufigkeit in der Bundesrepublik Deutschland anhand von Krankenkassen-Daten. Dtsch. med. Wschr. 117, 645-650.
- 10 Gaba, M. K., S. Gaba, L. T. Clark (1999): Cardiovascular disease in patients with diabetes: clinical considerations. J. Assoc. Acad. Minor Phys. 10, 15-22.
- Martin, S., H. Kolb, E. F. Lampeter (1996): Aktuelle therapeutische Strategie des Typ 1 Diabetes und seiner präklinischen Vorstadien. Internist 37, 1289-1304.
- Bottermann, P.: Diabetes mellitus. In: M. Classen, V. Diehl, K. Kochsiek (1994): Innere Medizin, Urban & Schwarzenberg 861-884.
- Wilson, J. D., E. Braunwald, K. J. Isselbacher, R. G. Petersdorf, J. B. Martin, A.S. Fauci, R. K. Root (1991): Harrison's Principles of internal medicine, McGraw-Hill, 1739 ff..
- 14 Lazy, P.E. (1993): Status of islet cell transplantation. Diabet. Rev. 1, 76.
- Robertson, R. P. (1991): Pancreas transplantation in humans with diabetes mellitus.Diabetes 40, 1085.
- Lampeter, E. F., A. Klinghammer, W. A. Scherbaum, E. Heinze, B. Haastert, G. Giani,
 H. Kolb (1998): The Deutsche Nicotinamide Intervention Study: an attempt to prevent
 type 1 diabetes. DENIS Group. Diabetes 47(6), 980-984.

Pozzilli, P., P. D. Browne, H. Kolb (1996): Meta-analysis of nicotinamide treatment in patients with recent-onset IDDM. The Nicotinamide Trialists. Diabetes Care 19(12), 1357-1363.

Kolb, H., V. Burkart (1999): Nicotinamide in type 1 diabetes. Mechanism of action revisited. Diabetes Care 22 Suppl. 2, B16-20.

- 17 Canadian European Randomized Control Trial Goup (1988): Cyclosporin-induced remission of IDDM after early intervention. Association of 1 yr of cyclosporin treatment with enhanced insulin secretion. Diabetes 37,1574.
- Martin, S., G. Schernthaner, J. Nerup, F. A. Gries, V. A. Koivisto, J. Dupre, E. Standl,
 P. Hamet, R. McArthur, M. H. Tan, er al (1991): Follow-up of cyclosporin A treatment
 in type 1 (insulin-dependent) diabetes mellitus: lack of long-term effects. Diabetologia 34(6), 429-434.
- Ritossa, F. (1962): A new puffing pattern induced by temperature shock and DNP in Drosophila. Experentia 18, 571-573.
- 20 Tissières, A., H. K. Mitchell, U. Tracy (1974): Protein synthesis in salivary glands of Drosophila melanogaster. Relation to chromosome puffs. J. molec. Biol. 84, 389-398.

Pauli, D., A.-P. Arrigo, A. Tissières (1992): Heat shock response in Drosophila. Experientia 48, 623-629.

Feige, U., J. Mollenhauer (1992): Heat shock proteins. Introduction. Experientia 48, 621-622.

Lindquist, S. (1986): The heat-shock response. Annu. Rev. Biochem. 55, 1151-1191.

- 22 Knowlton, A. A., S. Kapadia, G. Torre-Amione, J. B. Durand, R. Bies, J. Young, D. L. Mann (1998): Differential expression of heat shock proteins in normal and failing human hearts. J. Mol. Cell. Cardiol. 30(4), 811-818.
- Kaufmann, S. H. E. (1990): Heat shock proteins and the immune response. Immunol. Today 11, 129-136.

Nomoto, K.,Y. Yoshikai (1991): Heat-shock proteins and immunopathology: regulatory role of heat-shock protein-specific T cells. Springer Semin Immunopathol. 13, 63-80.

Res, P., J. Thole, R. de Vries (1991): Heat-shock proteins and autoimmunity in humans. Springer Semin Immunopathol. 13, 81-98.

Feige, U., I. R. Cohen (1991): The 65-kDa heat-shock protein in the pathogenesis, prevention and therapy of autoimmune arthritis and diabetes mellitus in rats and mice. Springer Semin Immunopathol. 13, 99-113.

- 24 Burel, C., V. Mezger, M. Pinto, M. Rallu, S. Trigon, M. Morange (1992): Mammalian heat shock protein families. Expression and functions. Experentia 48, 629-634.
- Nover, L. (1990): Molekulare Zellbiologie der Hitzestressantwort. Teil I.
 Naturwissenschaften 77, 310-316.

Hightower, L. E. (1991): Heat shock, stress proteins, chaperones and proteotoxicity. Cell. 66, 191-197.

Gupta, R. S. (1995): Evolution of the chaperonin families (Hsp60, Hsp10 and Tcp-1) of proteins and the origin of eukaryotic cells. Mol. Microbiol. 15, 1-11.

Jindal, S., A. K. Dudani, B. Singh, C. B. Harley, R. S. Gupta (1989): Primary structure of a human mitochondrial protein homologous to the bacterial and plant chaperonines and to the 65-kilodalton mycobacterial antigen. Mol. Cell. Biol. 9, 2279-2283.

Burel, C., V. Mezger, M. Pinto, M. Rallu, S. Trigon, M. Morange (1992): Mammalian heat shock protein families. Expression and functions. Experentia 48, 629-634.

- 27 Lindquist, S., E. A. Craig (1988): The heat-shock proteins. A. Rev. Genet. 22, 631-677.
- Becker, J., E.A. Craig (1994): Heat-shock proteins as molecular chaperones. Eur. J.
 Biochem. 219, 11-23.
- Bukau, B., A. L. Horwich (1998): The hsp70 and hsp60 chaperone machines. Cell 92, 351-366.

Becker, J., E.A. Craig (1994): Heat-shock proteins as molecular chaperones. Eur. J. Biochem. 219, 11-23.

Ellis, R. J., S. M. Van der Vies (1991): Molecular chaperones. A. Rev. Biochem. 60, 321-347.

- 30 Ellis, R. J., S. M. Hemmingsen (1989): Molecular chaperones: proteins essential for the biogenesis of some macromolecular structures. Trends Biochem. Sci. 14, 339-342.
- Hartl, F. U. (1996): Molecular chaperones in cellular protein folding. Nature 381, 571 581.

Frydman, J., E. Nimmesgern, K. Ohtsuka, F. U. Hartl (1994): Folding of nascent polypeptide chains in a high molecular mass assembly with molecular chaperones. Nature 370, 111-117.

Craig, E. A. (1993): Chaperones: helpers along the pathways to protein folding. Science 260, 1902-1903.

- 32 Burel, C., V. Mezger, M. Pinto, M. Rallu, S. Trigon, M. Morange (1992): Mammalian heat shock protein families. Expression and functions. Experentia 48, 629-634.
- 33 Pierce, S. K., D. C. DeNagel, A. M. VanBuskirk (1991): Role for heat shock proteins in antigen processing and presentation. Curr. Topics Microbiol. Immun. 167, 83-92.
- 34 Guenther, E. (1991): Heat shock protein genes and the major histocompatibility complex. Curr. Topics Microbiol. Immun. 167, 57-68.
- 35 De Nagel, D. C., S. K. Pierce (1991): Heat shock proteins in antigen processing and presentation. Semin. Immunol. 3, 65-71.
- Feige, U., J. Mollenhauer (1992): Heat shock proteins. Introduction. Experientia 48, 621-622.

- 37 Kaufmann, S. H. (1990): Heat shock proteins and the immune response. Immunol. Today 11, 129-136.
- 38 Multhoff, G., C. Botzler, R. Issels (1998): The role of heat shock proteins in the stimulation of an immune response. Biol. Chem. 878, 295-300.
- 39 Moseley, P. (2000): Stess proteins and the immune response. Immunopharmacology 25, 48, 299-302.
- 40 Szabo, A., T. Langer, H. Schroeder, J. Flangagan, B. Bukau, F. U. Hartl (1994): The ATP hydrolysis dependent reaction cycle of E. coli HSP70 system DnaK, DnaJ and GrpE. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91, 10345-10349.
- 41 Bukau, B., A. L. Horwich (1998): The hsp70 and hsp60 chaperone machines. Cell 92, 351-366.

Hallberg, E. M., Y. Shu, R. L. Hallberg (1993): Loss of mitochondrial hsp60 function: nonequivalent effects on matrix-targeted and intermembrane-targeted proteins. Mol. Cell. Biol. 13, 3050-3057.

Cheng, M. Y., F. U. Hartl, J. Martin, R. A. Pollock, F. Kalousek, W. Neupert, E. M. Hallberg, R. L. Hallberg, A. L. Horwich (1989): Mitochondrial heat-shock protein hsp60 is essential for assembly of proteins imported into yeast mitochondria. Nature 337, 620-625.

Ostermann, J., A. L. Horwich, W. Neupert, F. U. Hartl (1989): Protein folding in mitochondria requires complex formation with hsp60 and ATP hydrolysis. Nature 341, 125-130.

Briones, P., M. A. Vilaseca, A. Ribes, A. Vernet, M. Lluch, V. Cusi, A. Huckriede, E. Agsteribbe (1997): A new case of multiple mitochondrial enzyme deficiencies with decreased amount of heat shock protein 60. J. Inherit. Metab. Dis. 20,569-577.

- 43 Gupta, R.S. (1990): Sequence and structural homology between a mouse t-complex protein TCP-1 and the "chaperonin" family of bacterial (groEL, 60-65 kDa heat shock protein antigen) and eukaryotic proteins. Biochem. Int. 20, 833-841.
- 44 Soltys, B. J., R. S. Gupta (1997): Cell surface localization of the 60 kDa heat shock chaperonin protein hsp60 in mammalian cells. Cell Biol. Internat. 21, 315-320.
- 45 De-Bruyn, J., R. Bosmann, J. Nyabenda, M. Turneer, M. Weeks, J.-P. Van Vooren, P. Falmagne, H. G. Wiker, M. Harboe (1987): Purification, partial characterization and identification of a skin reactive protein antigen of Mycobacterium bovis, BCG. Infect. Immun. 55, 245-252.

Gills, T. P., R. A. Miller, D. B. Young, S. R. Khanolkar, T. M. Buchanan (1985): Immunochemical characterization of a protein associated with Mycobacterium leprae cell wall. Infect. Immun. 49, 371-377.

Wand-Württenberger, A., B. Schoel, J. Ivanyi, S. H. E. Kaufmann (1991): Surface expression by mononuclear phagocytes of an epitope shared with mycobacterial heat shock protein 60. Eur. J. Immunol. 21, 1089-1092.

Soltys, B. J., R. S. Gupta (1997): Cell surface localization of the 60 kDa heat shock chaperonin protein (hsp60) in mammalian cells. Cell Biol. Internat. 21, 315-320.

46 Poccia, F., P. Piselli, S. DeCesare, S. Bach, V. Colizzi, M. Mattel, A. Bolognesi, F. Stirpe (1992): Recognition and killing of tumor cells expressing heat shock protein 65 kD with immunotoxins containing saporin. Brit. J. Cancer 66, 427-432.

Kaur, I., S. D. Voss, R. S. Gupta, K. Schell, P. Fisch, P. M. Sondel (1993): Human peripheral gamma delta T cells recognize hsp60 molecules on Daudi Burkitt's lymphoma cells. J. Immunol. 150, 2046-2055.

- 47 Kaufmann, S. H. E., B. Schoel, J. D. A. van Embden, T. Koga, A. Wand-Württenberger, M. E. Munk, U. Steinhoff (1991): Heat-shock protein 60: implication for pathogenesis of and protection against bacterial infections. Immunol. Rev. 121, 67-90.
- Young, D. B., A. Mehlert, D. F. Smith: Stress proteins and infectious diseases. In: R. I.
 Morimoto, A. Tissières, C. Georgopoulos (1990): Stress Proteins and Biology and
 Medicine. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 131-165.
- 49 Shinnick, T. M. (1991): Heat shock proteins as antigens of bacterial and parasitic pathogens. Curr. Top. Microbiol. Immunol. 167, 145-160.
- 50 Kaufmann, S. H. E. (1992): The cellular immune response to heat shock proteins. Experientia 48, 640-643.
- 51 Born, W., L. Hall, A. Dallas, J. Boymel, T. Shinnick, D. Young, P. Brennan, R. O'Brien (1990): Recognition of a peptide antigen by heat shock reactive γ/δ T lymphocytes. Science 249, 67-69.

Haregewoin, A., B. Signh, R. S. Gupta, R. W. Finberg (1990): A mycobacterial heat shock protein responsive γ/δ T cell clone also responds to the homologous human heat shock protein: a possible link between infection and autoimmunity. J. Infect. Dis. 163, 156-159.

- 52 Garbe, T. R. (1992): Heat shock proteins and infection: Interactions of pathogen and host. Experientia 48, 635-639.
- 53 Multhoff, G., C. Botzler, R. Issels (1998): The role of heat shock proteins in the stimulation of an immune response. Biol. Chem. 378, 295-300.

Chouchane, L., S. Bowers, S. Sawasdikosol, R. M. Simpson, T. J. Kindt (1994): Heat shock proteins expressed on the surface of human leukemia virus Type I-infected cell lines induce autoantibodies in rabbits. J. Infect. Disease 169, 253-257.

- 54 Castellino, F., P. E. Boucher, K. Eichelberg, M. Mayhew, J. E. Rothman, A. N. Houghton, R. N. Germain (2000): Receptor-mediated uptake of antigen/heat shock protein complexes results in major histocompatibility complex class I antigen presentation via two distinct processing pathways. J. Exp. Med. 191, 1957-1964.
- Blachere, N., Z. Li, R. Y. Chandawarkar, R. Suto, N. S. Jaikaria, S. Basu, H. Udono,
 P. K. Srivastava (1997): Heat shock protein-peptide complexes reconstituted in vitro,
 elicit peptide-specific cytotoxic T lymphocyte response and tumor immunity. J. Exp.
 Med. 186, 1315-1322.

Ferrarini, M., S. Heltai, M. R. Zocchi, C. Rugarli (1992): Unusual expression and localization of heat-shock proteins in human tumor cells. Int. J. Cancer 51, 613-619.

- 56 Harada, M., G. Kimura, K. Nomoto (1998): Heat shock proteins and the antitumor T cell response. Biotherapy 10, 229-235.
- 57 Chu, N. R., H. B. Wu, T. Wu, L. J. Boux, M. I. Siegel, L. A. Mizzen (2000): Immunotherapy of a human papillomavirus (HPV) type 16 E7-expressing tumour by administration of fusion protein comprising Mycobacterium bovis bacille Calmette-Guerin (BCG) hsp65 and HPV16 E7. Clin. Exp. Immunol. 121,216-225.
- 58 Multhoff, G., C. Botzler, M. Wiesnet, E. Müller, T. Meier, W. Wilmanns, R. D. Issels (1995): A stress-inducible 72-kDa heat-shock protein (HSP72) is expressed on the surface of human tumor cells, but not on normal cells. Int. J. Cancer 61, 272-279.
- 59 Hsu, P. L., S. M. Hsu (1998): Abundance of heat shock proteins (hsp89, hsp60, and hsp27) in malignant cells of Hodgkin's disease. Cancer Res. 58, 5507-5513.
- 60 Holoshitz, J., A. Klajman, I. Drucker, Z. Lapidot, A. Yaretzky, A. Frenkel, W. van Eden, I. R. Cohen (1986): T-lymphocytes of rheumatoid arthritis patients show augmented reactivity to a fraction of mycobacterial cross-reactive with cartilage. Lancet 2, 305-309.

Brudzynski, K. (1993): Insulitis-caused redistribution of heat-shock protein hsp60 inside β -cells correlates with induction of hsp60 autoantibodies. Diabetes 42, 908-913.

Baca-Estrada, M., R. S. Gupta, R. H. Stead, K. Croitoru (1992): Expression of human heat shock protein 60 kD (hsp60) in the intestinal mucosa. Gastroenterology 102, 592 (Abstr.).

Peetermans, W. E., G. R. D'Haens, J. L. Cueppens, P. Rutgeerts, K. Geboes (1995): Mucosal expression by B7-positive cells of the 60-kilodalton heat shock protein in inflammatory bowel disease. Gastroenterology 108, 75-82.

Xu, Q., R. Kleindienst, W. Waitz, H. Dietrich, G. Wick (1993): Increased expression of heat shock protein 65 coincides with a population of infiltrating T lymphocytes in atherosclerotic ledions of rabbits specifically responding to heat shock protein 65. J. Clin. Invest. 91, 2693-2702.

Podolsky, D. K. (1991): Inflammatory bowel disease. N. Engl. J. Med. 325, 1008-1016.

Nomoto, K.,Y. Yoshikai (1991): Heat-shock proteins and immunopathology: regulatory role of heat-shock protein-specific T cells. Springer Semin Immunopathol. 13, 63-80.

- 61 Steinhoff, U., B. Schoel, S. H. E. Kaufmann (1990): Lysis of interferon- γ activated Schwann cells by crossreactive CD8 α/β T cells with specificity to the mycobacterial 65 kDa heat shock protein. Int. Immun. 2, 279-284.
- 62 Res, P., J. Thole, R. de Vries (1991): Heat-shock proteins and autoimmunity in humans. Springer Semin Immunopathol. 13, 81-98.
- Kaufmann, S. H. E. (1990): Heat shock proteins and the immune response. Immunol. Today 11, 129-136.

- 64 Van Eden, W., J. E. R. Thole, R. Van der Zee, J. D. A. Van Embden, E. J. Hensen, I.
 R. Cohen (1988): Cloning of the mycobacterial epitope recognized by T lymphocytes in adjuvant arthritis. Nature 331, 171-173.
- 65 Res, P. C., C. G. Schaar, F. C. Breedveld, W. van Eden, J. D. van Embden, I. R. Cohen, R. R. de Vries (1988): Synovial fluid T cell reactivity against 65 kD heat shock protein of mycobacteria in early chronic arthritis. Lancet 2, 478-480.
- 66 Zugel, U., B. Schoel, S. Yamamoto, H. Hengel, B. Morein, S. H. Kaufmann (1995): Crossrecognition by CD8 t cell receptor alpha beta cytotoxic T lymphocytes of peptides in the self and the mycobacteria hsp60, which share intermediates sequence homology. Eur. J. Immunol. 25, 451-458.
- 67 Feige, U., I. R. Cohen (1991): The 65-kDa heat-shock protein in the pathogenesis, prevention and therapy of autoimmune arthritis and diabetes mellitus in rats and mice. Springer Semin. Immunopath. 13, 99-113.

Yang, X.-D., U. Feige (1992): Heat shock proteins in autoimmune disease. From causative antigen to specific therapy? Experientia 48, 650-656.

68 Lamb, J. R., D. B. Young (1990): T cell recognition of stress proteins. A link between infectious and autoimmune disease. Molec. Biol. Med. 7, 311-321.

Cohen, I. R.: The immunological homunculus and autoimmune disease. In: N. Talal (1991): Molecular Autoimmunity. Academic Press, New York, 437-463.

Harboe, M., A. J. Quayle (1991): Heat shock proteins: friend or foe? Clin. exp. Immun. 86, 2-5.

- 69 Winfield, J. B. (1989): Stress proteins, arthritis, and autoimmunity. Arthritis Rheum.32, 1497-1504.
- 70 Georgopoulos, C., H. McFarland (1993): Heat shock proteins in multiple sclerosis and other autoimmune diseases. Immunology Today 14, 373-376.

Yang, X.-D., U. Feige (1992): Heat shock proteins in autoimmune disease. From causative antigen to specific therapy? Experientia 48, 650-656.

- 71 Jones, D. B., A. F. Coulson, G. W. Duff (1993): Sequence homologies between hsp60 and autoantigens. Immunol. Today 14, 115-118.
- 72 Mustafa, A. S., K. E. Lundin, R. H. Meloen, T. M. Shinnick, A. F. Coulson, F. Oftung (1996): HLA-DR4-restricted T-cell epitopes from the mycobacterial 60,000 MW heat shock protein (hsp 60) do not map to the sequence homology regions with the human hsp 60. Immunology 87, 421-427.
- 73 Van Roon, J. A., W. van Eden, J. L. van Roy, F. J. Lafeber, J. W. Bijlsma (1997): Stimulation of suppressive T cell responses by human but not bacterial 60-kDa heatshock protein in synovial fluid of patients with rheumatoid arthritis. J. Clin. Invest. 100, 459-463.
- 74 Boog, C. J., E. R. de Graeff-Meeder, M. A. Lucassen, R. van der Zee, M. M. Voorhorst-Ogink, P. J. van Kooten, H. J. Geuze, W. van Eden (1992): Two monoclonal antibodies generated against human hsp60 show reactivity with synovial membranes of patients with juvenile chronic arthritis. J. Exp. Med. 175, 1805-1810.
- 75 Rohane, P., C. G. Fathman (1993): Initiation of autoimmunity in NOD mice. Diabet. Rev. 1, 166.

Mordes, J. P., J. Desemone, A. A. Rossini (1987): The BB rat. Diabet. Metab. Rev. 3, 725-750.

- Elias, D., D. Markovits, T. Reshef, R. van der Zee, I. R. Cohen (1990): Induction and therapy of autoimmune diabetes in the non-obese diabetic (NOD/Lt) mouse by a 65-kDa heat shock protein. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87, 1576-1580.
- 77 Ozawa, Y., A. Kasuga, H. Nomaguchi, T. Maruyama, T. Kasatani, A. Shimada, I. Takei, J. Miyazaki, T. Saruta (1996): Detection of autoantibodies to the pancreatic islet
heat shock protein 60 in insulin-dependent diabetes mellitus. J. Autoimmun. 9(4), 517-24.

- 78 Brudzynski, K., V. Martinez, R. S. Gupta (1992): Immunocytochemical localization of heat-shock protein 60-related protein in beta-cell secretory granules and its altered distribution in non-obese diabetic mice. Diabetologia 35, 316-324.
- 79 Birk, O. S., D. Elias, A. S. Weiss, A. Rosen, R. van der Zee, M. D. Walker, I. R. Cohen (1996): NOD mouse diabetes: the ubiquitous mouse hsp60 is a beta-cell target antigen of autoimmune T cells. J. Autoimmunity 9, 159-166.
- Bockova, J., D. Elias, I. R. Cohen (1997): Treatment of NOD diabetes with a novel peptide of the hsp60 molecule induces Th2-type antibodies. J. Autoimmun. 10(4), 323-9.

Shpigel, E., D. Elias, I. R. Cohen, O. Shoseyov (1998): Production and purification of a recombinant human hsp60 epitope using the cellulose-binding domain in Escherichia coli. Protein Expr. Purif. 14(2), 185-91.

Abulafia-Lapid, R., D. Elias, I. Raz, Y. Keren-Zur, H. Atlan, I. R. Cohen (1999): T cell proliverative responses of type 1 diabetes patients and healthy individuals to human hsp60 and its peptides. J. Autoimmun. 12(2), 121-9.

Trikochinski, Y., D. Elias, C. Steeg, H. Marcus, M. Kantorowitz, T. Reshef, V. Ablamunits, I. R. Cohen, A. Friedmann (1999): A shared TCR CDR3 sequence in NOD mouse autoimmune diabetes. Int. Immunol. 11(6), 951-6.

- 81 Shimada, A., T. Kasatani, I. Takei, T. Maruyama, H. Nomaguchi, Y. Ozawa, M. Ishii, A. Kasuga, F. Tashiro, J. Miyazaki, K. Yamamura, T. Saruta (1996): Immune response to heat-shock protein correlates with induction of insulitis in $I-E_{\alpha}^{d}$ transgenic NOD. Diabetes 45, 165-169.
- Elias, D., D. Markovits, T. Reshef, R. van der Zee, I. R. Cohen (1990): Induction and therapy of autoimmune diabetes in the non-obese diabetic (NOD/Lt) mouse by a 65-kDa heat shock protein. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87, 1576-1580.

- Elias, D., H. Prigozin, N. Polak, M. Rapoport, A. Lohse, I. R. Cohen (1994):
 Autoimmune diabetes induced by the beta-cell toxin streptozotocin: Immunity to the 60 kDa heat shock protein and to insulin. Diabetes 43, 992-998.
- 84 Elias, D., I. R. Cohen (1996): The hsp60 peptide p227 arrests the autoimmune diabetes induced by the toxin streptozotocin. Diabetes 45(9), 1168-1172.
- Birk, O. S., D. C. Douck, D. Elias, K. Takacs, H. Dewchand, S. L. Gur, M. D. Walker,
 R. van der Zee, I. R. Cohen (1996): The role of hsp60 in autoimmune diabetes: analysis in a transgenic model. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93, 1032-1037.
- 86 Elias, D., A. Meilin, V. Ablamunits, O. S. Birk, P. Carmi, S. Konen-Waisman, I. R. Cohen (1997): Hsp60 peptide therapy of NOD mouse diabetes induces a Th2 cytokine burst and down-regulates autoimmunity to various beta-cell antigens. Diabetes 46, 758-764.
- Bajramovic, J. J., M. Bsibsi, S. B. Geutskens, R. Hassankhan, K. C. Verhulst, G. J. Stege, C. J. de Groot, J. M. van Noort (2000): Differential expression of stress proteins in human adult astrocytes in response to cytokines. J. Neuroimmunol. 106 (1-2), 14-22.
- 88 Shinomiya, M., S. Nadano, H. Shinomiya, M. Onji (2000): In situ characterization of dendritic cells occurring in the islets of nonobese diabetic mice during the development of insulitis. Pancreas 20, 290-296.
- 89 Kolb, H., V. Burkart, B. Appels, H. Hanenberg, G. Kantwerk-Funke, U. Kiesel, J. Funda, U. Schraermeyer, V. Kolb-Bachofen (1990): Essential contribution of macrophages to islet cell destruction in vivo and in vitro. J. Autoimmun. 3 (Suppl.), 117-120.

Kolb-Bachofen, V., S. Epstein, U. Kiesel, H. Kolb (1988): Low-dose streptozotocininduced diabetes in mice. Electron microscopy reveals single-cell insulitis before diabetes onset. Diabetes 37, 21-27.

- 90 Kolb-Bachofen, V., H. Kolb (1983): New concept of insulitis and β-islet destruction.
 Diabetes 32, Suppl. 1, A 22.
- 91 Prowse S. J., J. Lafferty, J. N. Nomikos, P. Carotenuto (1986): The pathogenesis of spontaneous diabetes. Annu. Inst. Pasteur, 137D, 459-462.
- 92 Zimmerman, B. T., B. P. Canono, P. A. Campbell (1986): Silica decreases phagocytosis and bactericidal activity of both macrophages and neutrophils in vitro. Immunology 59, 521-525.
- 93 Charlton, B., A. Bacelj, T. E. Mandel (1988): Administration of silica particles or anti-Lyt2 antibody prevents β-cell destruction in NOD mice given cyclophosphamide. Diabetes 37, 930-935.

Kiesel, U., U. Oschilewski, G. Kantwerk, M. Maruta, H. Hanenberg, U. Treichel, V. Kolb-Bachofen, H. P. Hartung, H. Kolb (1986): Essential role of macrophages in the development of type 1 diabetes in BB rats. Transplant. Proc. 18, 1525-1527.

Oschilewski, U., U. Kiesel, H. Kolb (1985): Administration of silica prevents diabetes in BB-rats. Diabetes 34, 197-199.

Oschilewski, U., E. Schwab, U. Kiesel, U. Opitz, K. Stünkel, V. Kolb-Bachofen, H. Kolb (1986): Administration of silica or monoclonal antibody to Thy-1 prevents low-dose streptozotocin induced diabetes in mice. Immunol. Lett. 12, 289-294.

Appels, B., V. Burkart, G. Kantwerk-Funke, J. Funda, V. Kolb-Bachofen, H. Kolb (1989): Spontaneous cytotoxcity of macrophages against pancreatic islet cells. J. Immunol. 142, 3803-3808.

- 95 Kröncke, K. D., V. Kolb-Bachofen, B. Berschick, V. Burkart, H. Kolb (1991): Activated macrophages kill pancreatic syngeneic islet cells via arginine-dependent nitric oxide generation. Biochem. Biophys. Res. Commun. 175, 752-758.
- 96 Malaisse, W. J., F. Mallaisse-Lagae, A. Sener, D. G. Pipeleers (1982): Determinants of the selective toxicity of alloxan to pancreatic B cell. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79, 927-930.
- Mandrup-Poulsen, T., K. Bendtzen, J. H. Nielsen, G. Bendixen, J. Nerup (1985):
 Cytokines cause fundtional and structural damage to isolated islets of Langerhans.
 Allergy 40, 424.

Nerup, J., T. Mandrup-Poulsen, J. Molvig (1986): Effector mechanisms in type 1 diabetes mellitus. Annu. Inst. Pasteur. 137D, 463-468.

- 98 Pukel, C., H. Baquerizo, A. Rabinovitch (1988): Destruction of rat islet cell monolayers by cytokines: synergistic interactions of interferon-gamma, tumor necrosis factor, lymphotoxin and interleukin-1. Diabetes 37, 133-136.
- 99 Kolb, H., V. Kolb-Bachofen (1992): Type 1 (insulin-dependent) diabetes mellitus and nitric oxide. Diabetologia 35, 796-797.
- 100 Bergmann, L., K. D. Kröncke, C. Suscheck, H. Kolb, V. Kolb-Bachofen (1992): Cytotoxic action of IL-1 beta against pancreatic islets is mediated via nitric oxide formation inhibited by NG-monomethyl-L-arginine. FEBS Lett. 299, 103-106.
- Vieira, P., R. deWaal-Malefyt, M. N. Dang, K. E. Johnson, R. Kastelein, D. F. Fiorentino, J. E. deVries, M. G. Roncarolo, T. R. Mosmann, K. W. Moore (1991): Isolation and expression of human cytokine synthesis inhibitory factor cDNA clones: homology to Epstein-Barr virus open reading frame BCRFI. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88 (4), 1172-1176.

- 102 Ziegler-Heitbrock, H. W., E. Thiel, A. Futterer, V. Herzog, A. Wirtz, G. Riethmüller (1988): Establishment of a human cell line (Mono Mac 6) with characteristics of mature monocytes. Int. J. Cancer 41, 456-461.
- 103 Freudenberg, M. A., C. Galanos (1988): Induction of tolerance to lipopolysaccharide (LPS)-D-galactosamine lethality by pretreatement with LPS is mediated by macrophages. Infect. Immun. 56, 1352.
- Haas, J. G., P. A. Bäuerle, G. Riethmüller, H. W. L. Ziegler-Heitbrock (1990): Molecular mechanism in down-regulation of tumor necrosis factor expression. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87, 9563-9567.

Mackensen, A., C. Galanos, U. Wehr, R. Engelhardt (1992): Endotoxin tolerance: Regulation of cytokine production and cellular changes in response to endotoxin application in cancer patients. Eur. Cytoc. Netw. 3, 571-579.

Virca, G. D., S. Y. Kim, K. B. Glaser, R. J. Ulevitch (1989): Lipopolysaccharide induces hyporesponsiveness to its own action in RAW 264.7 cells. J. Biol. Chem. 264, 21951-21956.

Evans, G. F., S. H. Zuckerman (1991): Glucocorticoid-dependent and -independent mechanisms involved in lipopolysaccharide tolerance. Eur. J. Immunol. 21, 1973-1979.

Astiz, M. E., D. C. Saha, K. Brooks, C. M. Carpati, E. C. Rackow (1993): Comparison of the induction of endotoxin tolerance in endotoxemia and peritonitis by monophosphoryl Lipid A and lipopolysaccharide. Circ. Shock 39, 194-198.

Mathison, J. C., G. D.Virca, E. Wolfson, P. S. Tobias, K. Glaser, R. J. Ulevitch (1990): Adaptation to bacterial lipopolysaccharide controls lipopolysaccharide-induced tumor necrosis factor production in rabbit macrophages. J. Clin. Invest. 85, 1108-1118.

Takasuka, N., T. Tokunaga, K. S. Akagawa (1991): Preexposure of macrophages to low doses of lipopolysaccharide inhibits the expression of tumor necrosis factor-alpha mRNA but not of IL-1 β mRNA. J. Immunol. 146, 3824-3830.

Sanchez-Cantu, L., H. N. Rode, N. V. Christou (1989): Endotoxin tolerance is associated with reduced secretion of tumor necrosis factor. Arch. Surg. 124, 1432-1436.

Wakabayashi, G., J. G. Cannon, J. A. Gelfand, B. D. Clark, K. Aiura, J. F. Burke, S. M. Wolff, C. A. Dinarello (1994): Altered interleukin-1 and tumor necrosis factor production and secretion during pyrogenic tolerance to LPS in rabbits. Am. Phys. Soc. 267, 329-336.

Matic, M., S. R. Simon (1992): Effects of gamma interferon on release of tumor necrosis factor alpha from lipopolysaccharide-tolerant human monocyte-derived macrophages. Infect. Immun. 60, 3756-3762.

Fahmi, H., R. Chaby (1993): Desensitization of macrophages to endotoxin effects is not correlated with a down-regulation of lipopolysaccharide-binding sites. Cell. Immunol. 150, 219-229.

Ziegler-Heitbrock, H. W. L. (1995): Molecular mechanism in tolerance to lipopolysaccharide. J.of Inflamm. 45, 13-26

- 105 Frankenberger, M., H. Pechumer, Ziegler-Heitbrock, H. W. L. (1994): Interleukin 10 is upregulated in LPS tolerance. J. Inflammation 45, 56-63.
- 106 deWaal, M. R., J. Abrams, B. Bennett, C. G. Figdor, J. E. deVries (1991): Interleukin-10 (IL-10) inhibits cytokine synthesis by human monocytes: An autoregulatory role of IL-10 produced by monocytes. J. Exp. Med. 174, 1209.

Wang, P., P. Wu, M. I. Siegel, R. W. Egan, M. M. Billah (1994): IL-10 inhibits transcription of cytokine genes in human peripheral blood mononuclear cells. J. Immunol. 153, 811.

Fiorentino, D. F., A. Zlotnik, T. R. Mosmann, M. Howard, A. Ogarra (1991): IL-10 inhibits cytokine production by activated macrophages. J. Immunol. 147, 3815-3822.

Bogdan, C., Y. Vodovotz, C. Nathan (1991): Macrophage deactivation by interleukin-10. J. Exp. Med. 174, 1549-1555.

- 107 Randow, F., U. Syrbe, C. Meisel, D. Krausch, H. Zuckermann, C. Platzer, H.-D. Volk (1995): Mechanism of endotoxin desensitization: involvement of interleukin 10 and transforming growth factor beta. J. Exp. Med. 181: 1887.
- Randow, F., W.-D. Döcke, D. S. Bundschuh, T. Hartung, A. Wendel, H.-D. Volk (1997): In vitro prevention and reversal of lipopolysaccharide desensitization by IFN-γ, IL-12, and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. J. Immunol. 158, 2911-2918.

Haas, J. G., N. Meyer, G. Riethmüller, H. W. L. Ziegler-Heitbrock (1990): Inhibition of lipopolysaccharide-induced in vitro desensitization by interferon-γ. Eur. J. Immunol. 20, 1181-1184.

- 109 Jones, D. B., A. F. Coulson, G. W. Duff (1993): Sequence homologies between hsp60 and autoantigens. Immunol. Today 14, 115-118.
- 110 Gupta, R. S. (1995): Evolution of the chaperonin families (Hsp60, Hsp10 and Tcp-1) of proteins and the origin of eukaryotic cells. Mol. Microbiol. 15, 1-11.
- 111 De Graeff-Meeder, E. R., W. van Eden, G. T. Rijkers, B. J. Prakken, W. Kuis, M. M. Voorhorst-Ogink, R. van der Zee, H. J. Schuurman, P. J. Helders, B. J. Zegers (1995): Juvenil chronic arthritis: T cell reactivity to human HSP60 in patients with a favorable course of arthritis. J. Clin. Invest. 95, 934-940.

Van Roon, J. A., W. van Eden, J. L. van Roy, F. J. Lafeber, J. W. Bijlsma (1997): Stimulation of suppressive T cell responses by human but not bacterial 60-kDa heatshock protein in synovial fluid of patients with rheumatoid arthritis. J. Clin. Invest. 100, 459-463. 112 Metzler, B., G. Schett, R. Kleindienst, R. van der Zee, T. Ottenhoff, A. Hajeer, R. Bernstein, Q. Xu, G. Wick (1997): Epitope specificity of anti-heat shock protein 65/60 serum antibodies in atherosclerosis. Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 17, 536-541.

Schett, G., B. Metzler, M. Mayr, A. Amberger, D. Niederwieser, R. S. Gupta, L. Mizzen, Q. Xu, G. Wick (1997): Macrophage-lysis mediated by autoantibodies to heat shock protein 65/60. Atherosclerosis 128, 27-38.

Schett, G., B. Metzler, R. Kleindienst, I. Moschen, R. Hattmannsdorfer, H. Wolf, T. Ottenhoff, Q. Xu, G. Wick (1997): Salivary anti-hsp65 antibodies as a diagnostic marker for gingivitis and a possible link to atherosclerosis. Int. Arch. Allergy Immunol. 114, 246-250.

- 113 Yang, X.-D., U. Feige (1992): Heat shock proteins in autoimmune disease. From causative antigen to specific therapy? Experientia 48, 650-656.
- 114 Chen, W. (1998): Wirkung von humanem Hitzeschockprotein 60 auf die Funktionen von Makrophagen und die mögliche Bedeutung beim Typ 1 Diabetes. Diss. med. H.-Heine-Universität Düsseldorf.
- 115 Kol, A., T. Bourcier, A. H. Lichtman, P. Libby (1999): Chlymydial and human heat shock protein 60s activate human vascular endothelium, smooth muscle cells, and macrophages. J. Clin. Invest. 103, 571.
- 116 Peetermans, W. E., C. J. Raats, R. van Furth, J. A. Langermans (1995): Mycobacterial 65-kilodalton heat shock protein induces tumor necrosis factor alpha and interleukin 6, reactive nitrogen intermediates, and toxoplasmatic activity in murine peritoneal macrophages. Infect. Immun. 63, 3454-3458.

Zhang, Y., M. Doefler, T. C. Lee, B. Guillemin, W. N. Rom (1993): Mechanisms of stimulation of interleukin-1 β and tumor necrosis factor- α by Mycobacterium tuberculosis components. J. Clin. Invest. 91, 2076-2083.

- 117 Rabinovitch, A. (1993): Roles of cytokines in IDDM pathogenesis and islet β-cell destruction. Diabetes Rev. 1, 215-240.
- 118 Greisman, S. E., E. J. Young, W. E.Woodward (1966): Mechanisms of endotoxin tolerance. IV. Specificity of the pyrogenic refractory state during continuous intravenous infusions of endotoxin. J. Exp. Med. 124, 983-1000.

Freudenberg, M. A., C. Galanos (1988): Induction of tolerance to lipopolysaccharide (LPS)-D-galactosamine lethality by pretreatement with LPS is mediated by macrophages. Infect. Immun. 56, 1352.

- 119 Yoshino, S., E. Sasatomi, M. Ohsawa (2000): Bacterial lipopolysaccharide acts as an adjuvant to induce autoimmune arthritis in mice. Immunology 99, 607-614.
- 120 Retzlaff, C., Y. Yamamoto, P. S. Hoffman, H. Friedman, T. S. Klein (1994): Bacterial heat shock proteins directly induce cytokine mRNA and interleukin-1 secretion in macrophage cultures. Infect. Immunity 62, 5689-5693.
- 121 Held, W., S. MacDonald (1990): Genes encoding TNF-α and others are expressed during development of autoimmune diabetes. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87, 2239-2243.

Mueller, C., W. Held, M. A. Imboden, C. Carnaud (1995): Accelerated beta-cell destruction in adoptively transferred autoimmune diabetes correlates with an increased expression of the gene coding for TNF-alpha and granzyme A in the intra-islet infiltrates. Diabetes 44, 112-117.

122 Hunger, R. E., C. Carnaud, I. Carcia, P. Vassali, C. Mueller (1997): Prevention of autoimmune diabetes mellitus in NOD mice by transgenic expression of soluble tumor necrosis factor receptor p55. Eur. J. Immunol. 27, 255-261.

- 123 Burchett, S. K., W. M. Weaver, J. A. Westall, A. Larsen, S. Kronheim, C. B. Wilson (1988): Regulation of tumor necrosis factor / cachectin and IL-1 secretion in human mononuclear phagocytes. J. Immunol. 140, 3473-3481.
- 124 Chen, W., U. Syldath, K. Bellmann, V. Burkart, H. Kolb (1999): Human 60-kDa Heat-Shock Protein: A Danger Signal to the Innate Immune System. J. Immunol. 162, 3212-3219.
- 125 Skeen, M. J., M. A. Miller, T. M. Shinnick, H. K. Ziegler (1996): Regulation of murine macrophage IL-12 production. J. Immunol. 156, 1196-1206.
- 126 Doherty, T. M., R. A. Seder, A. Sher (1996): Induction and regulation of IL-15 expression in murine macrophages. J. Immunol. 156, 735-741.
- 127 Hemmingsen, S. M., C. Woolford, M. van der Vies, K. Tilly, D. T. Dennis, C. P. Georgopoulos, R. W. Hendrix, R. J. Ellis (1988): Homologous plant and bacterial proteins chaperone oligomeric protein assembly. Nature 333, 330-334.
- Becker, J., E.A. Craig (1994): Heat-shock proteins as molecular chaperones. Eur. J. Biochem. 219, 11-23.

Ellis, R. J., S. M. van der Vies (1991): Molecular chaperons. Annu. Rev. Biochem. 60, 321-347.

Bukau, B., A. L. Horwich (1998): The hsp70 and hsp60 chaperone machines. Cell 92, 351-366.

Gupta, R. S. (1995): Evolution of the chaperonin families (Hsp60, Hsp10 and Tcp-1) of proteins and the origin of eukaryotic cells. Mol. Microbiol. 15, 1-11.

129 Jindal, S., A. K. Dudani, B. Singh, C. B. Harley, R. S. Gupta (1989): Primary structure of a human mitochondrial protein homologous to the bacterial and plant chaperonines and to the 65-kilodalton mycobacterial antigen. Mol. Cell. Biol. 9, 2279-2283.

- 130 Zhang, Y., M. Doefler, T. C. Lee, B. Guillemin, W. N. Rom (1993): Mechanisms of stimulation of interleukin-1β and tumor necrosis factor-α by Mycobacterium tuberculosis components. J. Clin. Invest. 91, 2076-2083.
- Poltorak, A., X. He, I. Smirnova, M.-Y. Liu, C. van Huffel, X. Du, D. Birdwell, E. Alejos, M. Silva, C. Galanos, M. Freudenberg, P. Ricciardi-Castagnoli, B. Layton, B. Beutler (1998): Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene. Science 282, 2085.

Qureshi, S. T., L. Lariviere, G. Leveque, S. Clermont, K. J. Moore, P. Gros, D. Malo (1999): Endoxin-tolerant mice have mutations in Toll-like receptor 4 (Tlr4). J. Exp. Med. 189, 615.

Yang, R.-B., M. R. Mark, B. Gray, A. Huang, M. H. Xie, M. Zhang, A. Goddard, W I.
 Wood, A. L. Gurney, P. J. Godowski (1998): Toll-like receptor-2 mediates lipopolysaccharide-induced cellular signalling. Nature 395, 284.

Heine, H., C. J. Kirschning, E. Lien, B. G. Monks, M. Rothe, D. T. Golenbock (1999): Cutting edge: Cells that carry a null allele for toll-like receptor 2 are capable of responding to endotoxin. J. Immunol. 162, 6971.

133 Medzhitov, R., P. Preston-Hurlburt, C. A. Janeway Jr. (1997): A human homologue of the Drosophila Toll protein signals activation of adaptive immunity. Nature 388, 394.

Kopp, E. B., R. Medzhitov (1999): The Toll-receptor family and control of innate immunity. Curr. Opin. Immunol. 11,13.

Ohashi, K., V. Burkart, S. Flohé, H. Kolb (2000): Cutting edge: Heat shock protein 60 is a putative endogenous ligand of the toll-like receptor-4 complex. J. Immunol. 164, 558-561.

- 135 Jin, F.-Y., C. F. Nathan, A. Ding (1999): Paradoxical preservation of a lipopolysaccharide response in C3H/HeJ macrophages: induction of matrix metalloproteinase-9. J. Immunol. 162,3596.
- 136 Wand-Württenberger, A., B. Schoel, J. Ivanyi, S. H. E. Kaufmann (1991): Surface expression by mononuclear phagocytes of an epitope shared with mycobacterial heat shock protein 60. Eur. J. Immunol. 21, 1089-1092.

Soltys, B. J., R. S. Gupta (1997): Cell surface localization of the 60 kDa heat shock chaperonin protein (hsp60) in mammalian cells. Cell Biol. Internat. 21, 315-320.

137 Berger, F. M., G. M. Fukui (1963): Endotoxin induced resistance to infections and tolerance. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 114, 780-783.

Greisman, S. E., E. J. Young, F. A. Carozza (1969): Mechanisms of endotoxin tolerance. V. Specificity of the early and late phases of pyrogenic tolerance. J. Immunol. 103, 1223-1236.

- Hausdorff, W. P., M. G. Caron, R. J. Lefkowitz (1990): Turning off the signal: Desensitization of β-adrenergic receptor function. FASEB J. 4, 2881-2889.
- 139 Ziegler-Heitbrock, H. W. L., A. Wedel, W. Schraut, M. Ströbel, P. Wendelgass, T. Sternsdorf, P. Bäuerle, J. G. Haas, G. Riethmüller (1994): Tolerance to lipopolysaccharide involves mobilizatio of nuclear factor KB with predominance of p50 homodimers. J. Biol. Chem. 269, 17001-17004.
- 140 Labeta, M. O., J. J. Durieux, G. Spagnoli, N. Fernandez, J. Wijdenes, R. Herrmann (1993): CD14 and tolerance to lipopolysaccharide: biochemical and functional analysis. Immunology 80, 415-423.
- 141 Kastenbauer, S., H. W. L. Ziegler-Heitbrock (1999): NF-κB1 (p50) is upregulated in lipopolysaccharide tolerance and can block tumor necrosis factor gene expression. Infect. Immun. 67, 1553.

- 142 Nomura, F., S. Akashi, Y. Sakao, S. Sato, T. Kawai, M. Matsumoto, K. Nakanishi, M. Kimoto, K. Miyake, K. Takeda, S. Akira (2000): Cutting edge: Endotoxin tolerance in mouse peritoneal macrophages correlates with down-regulation of surface toll-like receptor 4 expression. J. Immunol. 164, 3476-3479.
- 143 Medvedev, A. E., K. M. Kopydlowski, S. N. Vogel (2000): Inhibition of lipopolysaccharide-induced signal transduction in endotoxin-tolerized mouse macrophages: dysregulation of cytokine, chemokine, and toll-like receptor 2 and 4 gene expression. J. Immunol. 164, 5564-5574.
- 144 Hausmann, E. H., S. Y. Hao, J. L. Pace, M. J. Parmely (1994): Transforming growth factor beta 1 and gamma interferon provide opposing signals to lipopolysaccharideactivated mouse macrophages. Infect. Immun. 62, 3625-3632.

Wang, P., P. Wu, M. I. Siegel, R. W. Egan, M. M. Billah (1994): IL-10 inhibits transcription of cytokine genes in human peripheral blood mononuclear cells. J. Immunol. 153, 811.

- 145 Frankenberger, M., H. Pechumer, Ziegler-Heitbrock, H. W. L. (1994): Interleukin 10 is upregulated in LPS tolerance. J. Inflammation 45, 56-63.
- 146 Staege, H., A. Schaffner, M. Schneemann (2000): Human toll-like receptors 2 and 4 are targets for deactivation of mononuclear phagocytes by interleukin-4. Immunol. Letters 71, 1-3.
- 147 Tiegs, G., J. Barsig, B. Matiba, S. Uhlig, A. Wendel (1994): Potentiation by granulocyte macrophage colony-stimulating factor of lipopolysaccharide toxicity in mice. J. Clin. Invest. 93, 2616.

Chomarat, P., M. C. Rissoan, J. Banchereau, P. Miossec (1993): Interferon gamma inhibits interleukin 10 production in monocytes. J. Exp. Med. 177, 523.

- Randow, F., W.-D. Döcke, D. S. Bundschuh, T. Hartung, A. Wendel, H.-D. Volk (1997): In vitro prevention and reversal of lipopolysaccharide desensitization by IFN-γ, IL-12, and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. J. Immunol. 158, 2911-2918.
- 149 Friedland, J. S., R. Shattock, D. G. Remake, E. Griffin (1993): Mycobacterial 65-kD heat shock protein induces release of proinflammatory cytokines from human monocytic cells. Clin. Exp. Immunol. 91, 58-62.

Peetermans, W. E., C. J. Raats, R. van Furth, J. A. Langermans (1995): Mycobacterial 65-kilodalton heat shock protein induces tumor necrosis factor alpha and interleukin 6, reactive nitrogen intermediates, and toxoplasmatic activity in murine peritoneal macrophages. Infect. Immun. 63, 3454-3458.

Peetermans, W. E., J. A. Langermans, M. E. B. Vanderhulst, J. D. A. Vanembden, R. Vanfurth (1993): Murine peritoneal macrophages activated by the mycobacterial 65-kilodalton heat shock protein express enhanced microbicidal activity in vitro. Infect. Immun. 61, 868-875.

Retzlaff, C., Y. Yamamoto, P. S. Hoffman, H. Friedman, T. S. Klein (1994): Bacterial heat shock proteins directly induce cytokine mRNA and interleukin-1 secretion in macrophage cultures. Infect. Immun. 62, 5689-5693.

Verdegaal, E. M. E., S. T. Zegveld, R. van Furth (1996): Heat shock protein65 induce CD62e, CD106, and CD54 on cultured human endothelial cells and increases their adhesiveness for monocytes and granulocytes. J. Immunol. 157, 369-376.

Galdiero, M., G. C. DeLEro, and A. Marcatili (1997): Cytokine and adhesion molecule expression in human monocytes and endothelial cells stimulated with bacterial heat shock proteins. Infect. Immun. 65, 699-707.

150 Soltys, B. J., R. S. Gupta (1997): Cell surface localization of the 60 kDa heat shock chaperonin protein (hsp60) in mammalian cells. Cell Biol. Int. 21, 315.

Soltys, B. J., R. S. Gupta (1996): Immunoelectron microscopic localization of the 60kDa heat shock chaperonin protein (Hsp60) in mammalian cells. Exp. Cell Res. 222, 16.

Hohlfeld, R., A. G. Engel (1992): Expression of 65-kd heat shock proteins in the inflammatory myopathies. Ann. Neurol. 32, 821.

Xu, Q., R. Kleindienst, W. Waitz, H. Dietrich, G. Wick (1993): Increased expression of heat shock protein 65 coincides with a population of infiltrating T lymphocytes in atherosclerotic lesions of rabbits specifically responding to heat shock protein 65. J. Clin. Invest. 91, 2693.

Hiranuma, K., K. Hirata, T. Abe, T. Hirano, K. Matsuno, H. Hirano, K. Suzuki, K. Higashi (1993): Induction of mitochondrial chaperonin, hsp60, by cadmium in human hepatoma cells. Biochem. Biophys. Res. Commun. 194, 531.

Peetermans, W. E., G. R. D'Haens, J. L. Ceuppens, P. Rutgeerts, K. Geboes (1995): Mucosal expression by B7-positive cells of the 60-kilodalton heat-shock protein in inflammatory bowel disease. Gastroenterology 108, 75.

Barker, R. N., A. D. Wells, M. Ghoraishian, A. J. Easterfield, Y. Hitsumoto, C. J. Elson, S. J. Thompson (1996): Expression of mammilian 60-kD heat shock protein in the joints of mice with pristane-induced arthritis. Clin. Exp. Immunol. 103, 83.

Frostegard, J., B. Kjellmann, M. Gidlund, B. Andersson, S. Jindal, R. Kiessling (1996): Induction of heat shock protein in monocytic cells by oxidized low density lipoprotein. Atherosclerosis 121, 93.

Otaka, M., A. Okuyama, S. Otani, M. Jin, S. Itoh, H. Itoh, A. Iwabuchi, H. Sasahara, M. Odashima, Y. Tashima, O. Masamune (1997): Differential induction of HSP60 and HSP72 by different stress situations in rats: correlation with cerulein-induced pancreatitis. Dig. Dis. Sci. 42, 1473.

Laplante, A. F., V. Moulin, F. A. Auger, J. Landry, H. Li, G. Morrow, R. M. Tanguay, L. Germain (1998): Expression of heat shock proteins in mouse skin during wound healing. J. Histochem. Cytochem. 46, 1291.

151 Brudzynski, K. (1993): Insulitis-caused redistribution of heat-shock protein hsp60 inside β-cells correlates with induction of hsp60 autoantibodies. Diabetes 42, 908-913.

Xu, Q., R. Kleindienst, W. Waitz, H. Dietrich, G. Wick (1993): Increased expression of heat shock protein 65 coincides with a population of infiltrating T lymphocytes in atherosclerotic ledions of rabbits specifically responding to heat shock protein 65. J. Clin. Invest. 91, 2693-2702.

Podolsky, D. K. (1991): Inflammatory bowel disease. N. Engl. J. Med. 325, 1008-1016.

Res, P. C., C. G. Schaar, F. C. Breedveld, W. van Eden, J. D. van Embden, I. R. Cohen, R. R. de Vries (1988): Synovial fluid T cell reactivity against 65 kD heat shock protein of mycobacteria in early chronic arthritis. Lancet 2, 478-480.

Poccia, F., P. Piselli, S. DeCesare, S. Bach, V. Colizzi, M. Mattel, A. Bolognesi, F. Stirpe (1992): Recognition and killing of tumor cells expressing heat shock protein 65 kD with immunotoxins containing saporin. Brit. J. Cancer 66, 427-432.

Kaur, I., S. D. Voss, R. S. Gupta, K. Schell, P. Fisch, P. M. Sondel (1993): Human peripheral gamma delta T cells recognize hsp60 molecules on Daudi Burkitt's lymphoma cells. J. Immunol. 150, 2046-2055.

153 Manetti, R., F. Gerosa, M. G. Giudizi, R. Biagiotti, P. Parronichi, M. Piccinni, S. Sampognaro, E. Maggi, S. Romagnani, G. Trinchieri (1994): Interleukin-12 induces stable priming for interferon-γ (IFN-γ) production during differentiation of human T helper (Th) cells and transient IFN-γ production in established Th2 cell clones. J. Exp. Med. 179, 1273-1283.

Wu, C. Y., C. Demeure, M. Kiniwa, M. Gately, G. Delespresse (1993): IL-12 induces the production of IFN-gamma by neonatal human CD4 T cells. J. Immunol. 151, 1938-1949.

154 Trinchieri, G. (1994): Interleukin-12: a cytokine produced by antigen-presenting cells with immunregulatory functions in the generation of T-helper cells type I and cytotoxic lymphocytes. Blood 48, 4008-4027.

Kennedy, M. K., L. S. Park (1996): Characterization of interleukin-15 (IL-15) and the IL-15 receptor complex. J. Clin. Immunol. 16, 134-143.

- 155 Luzzati, A. L., L. Giordani, E. Giacomini (1997): Interleukin-12 up-regulates the induction of an antigen-specific antibody response in cultures of human lymphocytes. Eur. J. Immunol. 27, 2696-2701.
- 156 Kolb, H. (1997): Benign versus destructive insulitis. Diabetes/Metab. Rev. 13, 139-146.
- Rothe, H., V. Burkart, A. Faust, H. Kolb (1996): Interleukin-12 gene expression is associated with rapid development of diabetes mellitus in non-obese diabetic mice. Diabetologia 39, 119-122.
- 158 Trembleau, S., G. Penna, A. Bosi, Mortara, K. Gately, L. Adorini (1995): Interleukin-12 administration induces T helper type 1 cells and accelerates autoimmune diabetes in NOD mice. J. Exp. Med. 181, 817-821.
- 159 Dicosmo, B. F., D. Picarella, R. A. Flavell (1994): Local production of human IL-6 promotes insulitis but retards the onset of insulindependent diabetes mellitus in nonobese diabetic mice. Int. Immunol. 6, 1829-1837.

Picarella, D. E., A. Kratz, C.-B. Li, N. H. Ruddle, R. A. Flavella (1993): Transgenic tumor necrosis factor (TNF)-alpha production in pancreatic islets leads to insulitis, not diabetes. J. Immunol. 150, 4136-4150.

Allison, J., L. Malcolm, N. Chosich, J. F. A. P. Miler (1992): Inflammation but not autoimmunity occurs in transgenic mice expression constitutive levels of interleukin-2 in islet beta cells. Eur. J. Immunol. 22, 1115-1121.

Higuchi, Y., P. Herrera, P. Muniesa, J. Huarte, D. Belin, P. Ohashi, P. Aichele, L. Orci, J. D. Vassalli, P. Vassalli (1992): Expression of a tumor necrosis factor alpha transgene in murine pancreatic beta cells results in severe and permanent insulitis without evolution towards diabetes. J. Exp. Med. 176, 1719-1732.

- 160 Flesch, I. E. A., J. H. Hess, S. Huang, M. Aguet, J. Rothe, H. Bluethamenn, S. H. E. Kaufmann (1995): Early interleukin-12 production by macrophages in response to mycobacterial infection depends on interferon γ and tumor necrosis factor α. J. Exp. Med. 181, 1615-1621.
- 161 Balkhy, H. H., F. P. Heinzel (1999): Endotoxin fails to induce IFNγ in endotoxintolerant mice: deficiencies in both IL-12 heterodimer production and IL-12 responsiveness. J. Immunol. 162, 3633-3638.
- 162 McInnes, I. B., Y. F. Liew (1998): Interleukin 15: a proinflammatory role in rheumatoid arthritis synovitis. Immunology Today 19, 75-79.
- 163 Kligman, I., J. A. Grifo, S. S. Witkin (1996): Expression of the 60 kDa heat shock protein in peritoneal fluids from women with endometriosis: implications for endometriosis-associated infertility. Hum. Reprod. 11, 2736.
- Kaufmann, S. H. E., B. Schoel, J. D. A. van Embden, T. Koga, A. Wand-Württenberger, M. E. Munk, U. Steinhoff (1991): Heat-shock protein 60: implication for pathogenesis of and protection against bacterial infections. Immunol. Rev. 121, 67-90.
- 165 Anderton, S. M., R. van der Zee, J. A. Goodacre (1993): Inflammation activates self hsp60-specific T cells. Eur. J. Immunol. 23, 33-38.

- 166 Peetermans, W. E., C. J. Raats, R. van Furth, J. A. Langermans (1995): Mycobacterial 65-kilodalton heat shock protein induces tumor necrosis factor alpha and interleukin 6, reactive nitrogen intermediates, and toxoplasmatic activity in murine peritoneal macrophages. Infect. Immun. 63, 3454-3458.
- 167 Aderem, A., R. J. Ulevitch (2000): Toll-like receptors in the induction of the innate immune response. Nature, 406, 782-787.
- 168 Darveau, R. P. (1998): Lipid A diversity and the innate host response to bacterial infection. Curr. Opin. Microbiol. 1, 36-42.
- 169 Poltorak, A., P. Ricciardi-Castagnoli, S. Citterio, B. Beutler (2000): Physical contact between lipopolysaccharide and toll-like receptor 4 revealed by genetic complementation. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97, 2163-2167.
- 170 Rock, F. L., G. Hardiman, J. C. Timans, R. A. Kastelein, J. F. Bazan (1998): A family of human receptors structurally related to Drosophila Toll. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95, 588-593.
- 171 Hoffmann, J. A., F. C. Kafatos, C. A. Janeway, R. A. Ezekowitz (1999): Phylogenetic perspectives in innate immunity. Science 284, 1313-1318.
- 172 Lien, E. et al. (2000): Toll-like receptor 4 imparts ligand-specific recognition of bacterial lipopolysaccharide. J. Clin. Invest. 105, 497-504.
- 173 Brudzynski, K. (1993): Insulitis-caused redistribution of heat-shock protein hsp60 inside β-cells correlates with induction of hsp60 autoantibodies. Diabetes 42, 908-913.
- 174 Bellmannn, K., H. Liu, J. Radons, V. Burkart, H. Kolb (1997): Low stress response enhances vulnerability of islet cells in diabetes-prone BB rats. Diabetes 46, 32-36.
- Stoiber, D., P. Kovarik, S. Cohney, J. A. Johnston, P. Steinlein, T. Decker (1999):Lipopolysaccharide induces in macrophages the synthesis of the suppressor of cytokine

signaling 3 and suppresses signal transduction in response to the activating factor IFN- γ . J. Immunol. 163, 2640-2647.

- 176 Debray-Sachs, M., C. Carnaud, C. Boitard, J.-F. Bach (1991): Prevention of diabetes in NOD mice with antibody to IFN-γ. J. Autoimmun. 4, 237-248.
- Pennline, K. J., E. Roque-Gaffney, M. Monahan (1994): Recombinant human IL-10 (rHUIL-10) prevents the onset of diabetes in the non-obese diabetic (NOD) mouse. Clin. Immunol. Immunopathol. 71, 169-175.
- 178 Lamont, A. G., L. Adorini (1996): IL-12: a key cytokine in immune regulation. Immunology Today 17, 214-217.
- 179 Rabinovitch, A. (1994):Perspectives in Diabetes: Immunoregulatory and cytokine imbalances in the pathogenesis of IDDM. Therapeutic intervention by immunostimulation? Diabetes 43, 613-621.
- 180 Kröncke, K. D., H. H. Brenner, M. L. Rodriguez, K. Etzkorn, E. A. Noack, H. Kolb, V. Kolb-Bachofen (1993): Pancreatic islet cells are highly susceptible towards the cytotoxic effects of chemically generated nitric oxide. Biochem. Biophys. Acta 1182, 221-229.
- 181 Wells, A. D., S. K. Rai, M. S. Salvato, H. Band, M. Malkovsky (1997): Restoration of MHC class I surface expression and endogenous antigen presentation by a molecular chaperone. Scand. J. Immunol. 45, 605-612.
- 182 Kay, T. W., I. L. Campell, L. Oxbrow, L. C. Harrison (1991): Overexpression of class I major histocompatibility complex accompanies insulitis in the non-obese diabetic mouse and is prevented by interferon-γ antibody. Diabetologia 34, 779-785.

Hanenberg, H., V. Kolb-Bachofen, G. Kantwerk-Funke, H. Kolb (1989): Macrophage infiltration precedes and is a prerequisite for lymphocytic insulitis in pancreatic islets of pre-diabetic BB rats. Diabetologia 32, 126-134.

- 183 Li, X. B., F. W. Scott, Y. H. Park, J.-W. Yoon (1995): Low incidence of autoimmune type I diabetes in DP-BB rats fed a hydrolyzed casein-based diet associated with early inhibition of non-macrophage-dependent hyperexpression of MHC class I molecules on beta cells. Diabetologia 38, 1138-1147.
- 184 Kay, T. W., J. L. Parker, L. A. Stephens, H. E. Thomas, J. Allison (1996): RIP- β_2 microglobulin transgene expression restores insulitis, but not diabetes, in β_2 microglobulin^{null} nonobese diabetic mice. J. Immunol. 157, 3688-3693.
- 185 Oldstone, M. B. A. (1997): Viruses and autoimmune diseases. Scand. J. Immunol. 46, 320-325.
- 186 Soltys, B. J., R. S. Gupta (1997): Cell surface localization of the 60 kDa heat shock chaperonin protein (hsp60) in mammalian cells. Cell Biol. Int. 21, 315

Soltys, B. J., R. S. Gupta (1996): Immunoelectron microscopic localization of the 60kDa heat shock chaperonin protein (Hsp60) in mammalian cells. Exp. Cell Res. 222, 16

Hohlfeld, R., A. G. Engel (1992): Expression of 65-kd heat shock proteins in the inflammatory myopathies. Ann. Neurol. 32, 821.

Xu, Q., R. Kleindienst, W. Waitz, H. Dietrich, G. Wick (1993): Increased expression of heat shock protein 65 coincides with a population of infiltrating T lymphocytes in atherosclerotic lesions of rabbits specifically responding to heat shock protein 65. J. Clin. Invest. 91, 2693.

Hiranuma, K., K. Hirata, T. Abe, T. Hirano, K. Matsuno, H. Hirano, K. Suzuki, K. Higashi (1993): Induction of mitochondrial chaperonin, hsp60, by cadmium in human hepatoma cells. Biochem. Biophys. Res. Commun. 194, 531.

Peetermans, W. E., G. R. D'Haens, J. L. Ceuppens, P. Rutgeerts, K. Geboes (1995): Mucosal expression by B7-positive cells of the 60-kilodalton heat-shock protein in inflammatory bowel disease. Gastroenterology 108, 75.

Barker, R. N., A. D. Wells, M. Ghoraishian, A. J. Easterfield, Y. Hitsumoto, C. J. Elson, S. J. Thompson (1996): Expression of mammilian 60-kD heat shock protein in the joints of mice with pristane-induced arthritis. Clin. Exp. Immunol. 103, 83.

Frostegard, J., B. Kjellmann, M. Gidlund, B. Andersson, S. Jindal, R. Kiessling (1996): Induction of heat shock protein in monocytic cells by oxidized low density lipoprotein. Atherosclerosis 121, 93.

Otaka, M., A. Okuyama, S. Otani, M. Jin, S. Itoh, H. Itoh, A. Iwabuchi, H. Sasahara, M. Odashima, Y. Tashima, O. Masamune (1997): Differential induction of HSP60 and HSP72 by different stress situations in rats: correlation with cerulein-induced pancreatitis. Dig. Dis. Sci. 42, 1473.

Laplante, A. F., V. Moulin, F. A. Auger, J. Landry, H. Li, G. Morrow, R. M. Tanguay, L. Germain (1998): Expression of heat shock proteins in mouse skin during wound healing. J. Histochem. Cytochem. 46, 1291.

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Hubert Kolb für die Überlassung des Themas, seine hervorragende Betreuung, seine zahlreichen Anregungen und weiterführenden Diskussionen.

Frau Priv.-Doz. Dr. Helga Rothe danke ich für die Einführung in die gentechnischen Arbeiten.

Frau Dr. Kerstin Bellmann möchte ich für die Einführung in die Auswertung am Pospho-Imager danken.

Frau Monika Schulte danke ich für die technischen Hilfestellungen beim ELISA.

Allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe möchte ich für die gute Zusammenarbeit und die vielen kleinen und großen Hilfestellungen danken, die das Arbeitsklima im Labor so angenehm gemacht haben und wesentlich dazu beitrugen, daß mir die Arbeit so viel Freude bereitet hat.

Lebenslauf

Ulrike Syldath

* 25.06.1975 in Düsseldorf, evangelisch
Tochter von Dr. rer. nat. Andreas und Heike Syldath, geb. Herbst
verheiratet seit 02.09.1999 mit Rechtsreferendar Holger Syldath, geb. Rembges

1981-1985	Kath. Grundschule Itterstraße, Düsseldorf
1985-1993	Schloß-Gymnasium Benrath, Düsseldorf
1993	Abitur
WS 1993/94 - WS 1998/99	Humanmedizin an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
31.08.1995	Ärztliche Vorprüfung
29.08.1996	Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
22.03.1999	Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
4/1999 - 3/2000	Praktisches Jahr im Marien-Hospital, Düsseldorf; Wahlfach Neurologie
04.05.2000	Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
seit dem 01.07.2000	Ärztin im Praktikum im Marien-Hospital, Düsseldorf