

Aus der
**Klinischen Abteilung des
Deutschen Diabetes-Forschungsinstituts
an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf**
Leiter: Prof. Dr. med. Werner A. Scherbaum

**Spezifität der Makrophagen-aktivierenden Wirkung von
Hitzeschockprotein 60**

Dissertation

Zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Medizin

Der Medizinischen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von
Robert Christian Rümenapf

2003

Als Inauguraldissertation gedruckt mit der Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Heinrich-Heine Universität Düsseldorf

gez.:

Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. dent. Wolfgang H.-M. Raab

Referent: Prof. Dr. Kolb

Korreferentin: Prof. Dr. Soboll

Inhaltsverzeichnis

Einleitung	1
1. <u>Diabetes mellitus</u>	1
1.1. Hormone und Stoffwechsel bei Diabetes	1
1.2. Klinik	2
1.3. Verschiedene Diabetesformen	3
1.4. Epidemiologie des Diabetes mellitus	4
2. <u>Pathogenese des Typ 1 Diabetes</u>	5
2.1. Genetische Prädisposition	5
2.2. Umweltfaktoren	7
2.3. Immunologie des Typ 1 Diabetes	7
2.4. Makrophagen und der Typ 1 Diabetes	8
2.5. LPS als Aktivator von Makrophagen	10
2.6. ODN 1668 stimuliert Makrophagen	11
3. <u>Hitzeschockproteine</u>	12
3.1. Hitzeschockproteine und ihre Rolle bei der Entstehung von Autoimmunerkrankungen	13
3.2. Die Rolle des HSP 60 bei der Pathogenese des Typ 1 Diabetes	16
4. <u>Fragestellung der Arbeit</u>	19
Material und Methoden	20
1. <u>Material</u>	20
1.1. Zelllinie J774 A1	20
1.2. Geräte	20
1.3. Chemikalien/ Reagenzien	20
1.4. Enzyme	22
1.5. Proteine und Antikörper	22
1.6. Sterilisation der Chemikalien und Geräte	24
1.7. Einwegartikel für die Zellkultur	24
1.8. Medien für die Zellkultur	24
1.9. Stammlösungen und –puffer	25

2. <u>Methoden</u>	27
2.1. Methoden der Zellkultur	27
2.2. Stimulation der Mausmakrophagen	28
2.3. Bestimmung des Tumornekrosefaktor-alpha mittels ELISA	29
2.4. Nachweis der Stickstoffmonoxid-Produktion der Makrophagen	31
2.5. Bestimmung der metabolischen Aktivität von Zellen	32
2.6. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	33
2.6.1. Proteinfärbung nach Coomassie	34
2.6.2. Western Blotting	34
2.7. Limulus Amebozyten-Lysat-Test	36
2.8. Statistik	37
Ergebnisse	38
1. <u>Humanes Hitzeschockprotein 60</u>	38
1.1. Charakterisierung und Analyse der eigenen Präparation	38
1.2. Nachweis der stimulatorischen Wirkung von humanem HSP 60 auf Zellen der J774 Mausmakrophagenlinie	40
1.3. Bakteriellcs Lipopolysaccharid induziert die TNF- α - und NO-Produktion	42
1.4. Oligodesoxynucleotid 1668	43
1.5. Einfluss von Polymyxin B auf die Zellstimulation mit huHSP 60, LPS und ODN 1668	45
2. <u>Inhibitionsexperimente</u>	
2.1. Unspezifische Inhibition der Makrophagenaktivierung durch Mizoribine	47
2.2. Phosphatidylinositol: Ein spezifischer Hemmstoff der Makrophagenstimulation?	53
2.3. Magainin I, II und Magainin II Amide	56
2.4. LAL-Assay: Magainin interagiert mit LPS und verhindert dessen biologische Aktivität	59
2.5. Humanes Neutrophiles Peptid	60
2.6. Amyloid- β -Protein	61
2.7. Synthetische Peptide	65

2.8.	Myelin-Basisches Protein	66
2.9.	C-Peptid	61
2.10.	ADNF-14	62
3.	<u>Makrophagen-aktivierendes Lipopeptid als zusätzliches Kontrollsystem</u>	71
3.1.	Zellstimulation durch MALP-2	72
3.2.	Inhibitionsversuche MALP-2	75
	Diskussion	78
1.	<u>Humanes HSP 60 stimuliert murine Makrophagen</u>	78
2.	<u>Inhibitionsexperimente</u>	80
2.1.	Mizoribin bewirkt eine unspezifische Hemmung der Makrophagenstimulation	81
2.2.	Test verschiedener Peptide auf mögliche Hemmung der Aktivierung von Makrophagen durch humanes HSP 60	82
2.2.1.	Myelin Basisches Protein und Amyloid- β -Protein	82
2.2.2.	C-Peptid	83
2.2.3.	SBP	84
2.2.4.	VSV-C	84
2.2.5.	ADNF-14	85
2.3.	Können Defensine die Makrophagenstimulation durch HSP 60 beeinflussen?	85
2.4.	MALP-2 als zusätzliches Kontrollsystem	90
	Literaturverzeichnis	91
	Zusammenfassung	120
	Danksagung	121

Abkürzungsverzeichnis

ABP	Amyloid Beta Protein
ADNF	activity-dependent neurotrophic factor (aktivitätsabhängiger neurotropher Faktor)
APCs	antigen presenting cells (Antigen-präsentierende Zellen)
ATP	Adenosintriphosphat
BB	Bio-Breeding
BSA	Bovines Serumalbumin
Da	Dalton (Molmassen-Einheit)
DNA	Desoxyribonucleinsäure (-acid)
DMF	Dimethyl-Formamid
ELISA	Enzyme Linked Immunoabsorbent Assay
FCS	Fötales Kälberserum
GAD	Glutamatdecarboxylase
HNP-1	Humanes neutrophiles Peptid
HSP	Hitzeschockprotein
hTLR	human toll-like-receptor
HuHsp 60	humanes Hitzeschockprotein 60
IDDM	Insulin dependent Diabetes mellitus (insulinabhängiger Diabetes m.)
IFN- γ	Interferon-gamma
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IMPDH	Inosin-5'-Monophosphat-Dehydrogenase
LPS	Lipopolysaccharid
MALP	Mycoplasmatisches Lipopeptid
MBP	Myelin-Basisches Protein
MHC	Major histocompatibility complex (Haupthistokompatibilitätskomplex)
MTT	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide
NO	Stickstoffmonoxid
NOD	non-obese diabetic (nicht adipös diabetisch)
ODN	Oligodesoxynucleotid
OVA	Ovalbumin

PBS	Phosphat-gepufferte Saline
Pip	Phosphatidylinositolphosphat
RPMI	Roswell Park Memorial Institut
SBP	strongly-binding peptide (stark-bindendes Protein)
SDS	Natrium Dodecyl Sulfat
TBS	Tris gepufferte Salzlösung
Tris	Tris-(hydroxymethyl-)Aminomethan
Tween 20	Polyoxyethylsorbitmonolaureat

Einleitung

1. Diabetes mellitus

Diabetes mellitus, auch Zuckerkrankheit genannt, ist eine chronisch verlaufende Stoffwechselerkrankung, bei der ein absoluter oder relativer Mangel an Insulin besteht (Herold et al., 1999)

Unmittelbare Folge dieses Hormonmangels sind vor allem Störungen im Kohlenhydratstoffwechsel, aber auch im Fett- und Eiweißstoffwechsel. Die Krankheit und ihre Symptome sind bereits seit Jahrhunderten bekannt. Der griechische Arzt Aretaios von Kappadokien (ca. 80-130 n. Chr.) benannte sie Diabetes mellitus.

Der Wortteil „Diabet“ stammt aus dem Griechischen und hat die Bedeutung „hindurchgehen“, das Wort „mellitus“ ist lateinisch und heißt wörtlich übersetzt „mit Honig versüßt“. Der Name Diabetes mellitus weist also darauf hin, dass der Blutzucker mit einer erhöhten Urinmenge durch die Nieren hindurchgeht und in Folge dessen der Harn bei Zuckerkranken „süß schmeckt“.

Der Diabetes ist in unserer heutigen Überflussgesellschaft unter anderem aufgrund des Nahrungsüberangebotes sehr häufig. Die Prävalenz manifester Diabetiker beträgt in Europa und den USA ca. 7.5 %, weltweit ca. 2% (Herold et al., 1999). Damit hat sich der Diabetes mellitus inzwischen zu einer der häufigsten Zivilisationskrankheiten entwickelt.

1.1. Hormone und Stoffwechsel bei Diabetes

Für alle Lebensvorgänge, ob in Ruhe oder Bewegung, braucht unser Körper Energie. Diese Energie liefert die tägliche Nahrung, vorzugsweise in Form von Kohlenhydraten (Stärke und Zucker). Die Kohlenhydrate werden im Darm gespalten und über die Darmwand in das Blut aufgenommen. Der Glucosegehalt des Blutes muss sich immer innerhalb bestimmter Grenzen bewegen. Er sollte nicht unter 50 mg% absinken und nach dem Essen auch nicht über 140 mg% ansteigen. Damit der Blutzuckerspiegel innerhalb dieser Grenzen bleibt und aus dem Blut zur Energiegewinnung in die Zellen aufgenommen werden kann, ist ein Hormon, das Insulin, notwendig. Insulin wird in den β -Zellen der Langerhans'schen Inseln in der Bauchspeicheldrüse produziert und sezerniert. Steigt der Blutzuckerspiegel an, so

wird Insulin freigesetzt, und der Blutzuckerspiegel durch die gesteigerte Zuckerverwertung in den Zellen gesenkt. Der Insulinmangel führt zu folgenden Veränderungen beim Diabetiker:

- Erhöhung der Blutzuckerkonzentration
- Herabsetzung der Glucoseaufnahme in die Körperzellen
- Verminderung des Glucoseabbaus
- Erhöhte Glucoseausschüttung aus der Leber
- Glucoseausscheidung über den Harn

1.2. Klinik:

Die ersten Anzeichen eines Diabetes sind großer Durst und häufiges Wasserlassen, Gewichtsabnahme, Müdigkeit und Abgeschlagenheit. Daneben finden sich häufig Muskelkrämpfe, Infektionsneigung, Sehstörungen, lokalisierter oder generalisierter Pruritus, Amenorrhoe und Hungergefühl. Eine lebensgefährliche Komplikation des absoluten Insulinmangel ist das ketoazidotische Koma. Durch das Fehlen von Insulin kommt es zu einer Hemmung der Fettsäuresynthese und zur Freisetzung von Fettsäuren aus den Depots. Das dadurch entstehende Überangebot von freien Fettsäuren und Acetyl-CoA im Blut führt zu einer verstärkten Ketogenese, und damit zur Ketoazidose.

Bleibt der Diabetes über Jahre hinweg unbehandelt, entwickeln sich häufig Spätschäden an verschiedenen Organen. Ursache dieser Spätschäden sind unter anderem die durch den Diabetes hervorgerufenen Veränderungen an den Gefäßen (diabet. Mikro- und Makroangiopathie).

Die diabetische Makroangiopathie hat eine frühzeitig auftretende Arteriosklerose zur Folge, welche ihrerseits die Entstehung von Komplikationen wie Myokardinfarkt, cerebraler Infarkt oder auch einer peripheren arteriellen Verschlusskrankheit begünstigt (Koschinsky und Griess 1992).

Die Mikroangiopathie führt ebenfalls zu schwerwiegenden und häufigen Komplikationen beim Diabetiker. Im Vordergrund stehen dabei krankhafte Gefäßveränderungen an Niere (diabet. Nephropathie), Retina (diabet. Retinopathie) und Nervensystem (diabet. Neuropathie). Daneben können auch die intramuralen

kleinen Koronararterien betroffen sein, wodurch die Blut- und Sauerstoffversorgung des Herzens verschlechtert wird.

1.3. Verschiedene Diabetesformen:

Der Diabetes mellitus kann in verschiedene Klassen untergliedert werden. 1998 hat die Weltgesundheitsorganisation WHO eine neue Empfehlung für die Diagnose und Einteilung des Diabetes mellitus erarbeitet und herausgegeben. Nach dieser Klassifikation wird der Diabetes mellitus anhand seiner Ätiopathogenese wie folgt eingeteilt:

a) Typ 1 Diabetes mellitus

Der Typ 1 Diabetes mellitus ist durch einen absoluten Mangel an Insulin gekennzeichnet. Dieser absolute Insulinmangel wird durch eine Destruktion der β -Zellen (Inselzellen des Pankreas, welche sonst Insulin bilden) verursacht. Der Typ 1 Diabetes mellitus wird weiterhin unterteilt in:

- Typ 1 A ist immunologisch bedingt
- Typ 1 B ist ein idiopathisch vermittelter Diabetes.

b) Typ 2 Diabetes mellitus

Als Typ 2 Diabetes mellitus werden alle Formen bezeichnet, die durch vorwiegende Insulinresistenz mit relativem Insulinmangel bis hin zu vorwiegend sekretorischen Defekten einschließlich einer Insulinresistenz gekennzeichnet sind.

c) Typ 3 Diabetes mellitus

In dieser Gruppe werden alle anderen spezifischen Typen zusammengefasst. Der Typ 3 unterteilt sich in folgende Typen:

- 3 A: Genetische Schädigung der β -Zellen
- 3 B: Genetische Schädigung der Insulinwirkung
- 3 C: Krankheit der exokrinen Bauchspeicheldrüse
- 3 D: Endokrinopathien
- 3 E: Diabetes durch Drogen oder Chemikalien
- 3 F: Diabetes infolge von Infektionen
- 3 G: Seltene immunologisch bedingte Formen

- 3 H: Genetische Syndrome, die gelegentlich mit Diabetes vergesellschaftet sind.

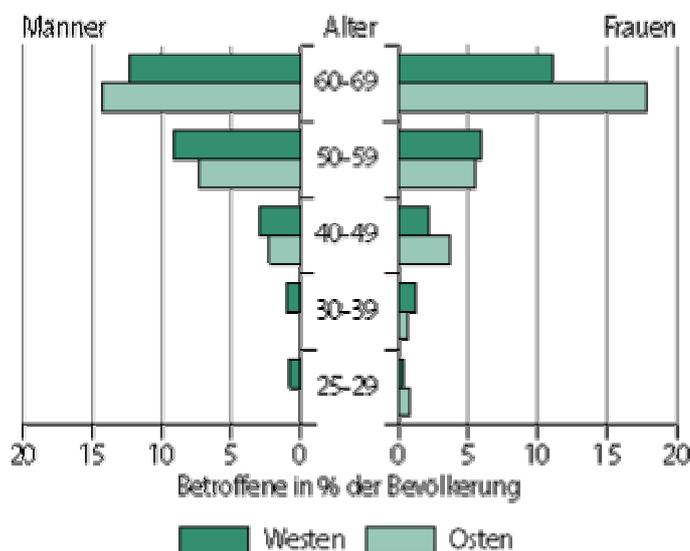
d) Typ 4 Diabetes mellitus

Der Typ 4 Diabetes mellitus umfasst den Schwangerschafts- bzw. Gestationsdiabetes. Darunter versteht man jede während der Schwangerschaft erstmals erkannte Störung des Kohlenhydratstoffwechsels.

1.4 Epidemiologie des Diabetes mellitus

Nach Schätzungen aus dem Jahre 1998 leiden in Deutschland 4,6% (3,7 Millionen Menschen) der Bevölkerung an einem erkannten Diabetes mellitus (Gesundheitsbericht für Deutschland 1998). Die Zahl der Einwohner mit einem nicht erkannten Diabetes mellitus wird auf 2 Millionen, also 1,6%, geschätzt. Der Anteil der Diabetiker an der Gesamtbevölkerung nimmt mit dem Lebensalter zu (siehe Abbildung 1)

Abb.1: Prävalenz von Diabetes mellitus 1991



Quelle: RKI, Gesundheitssurveys

Nur etwa 5-7% der 3,7 Mio. Diabetiker leiden an einem Typ 1 Diabetes, wohingegen 93-95% der Diabetiker einen Typ 2 Diabetes aufweisen. Die Zahl der Typ 2 Diabetiker ist in den letzten 50 Jahren auf das 20fache gestiegen. Mit verantwortlich

für diese Zunahme sind die Folgen unserer Überflussgesellschaft, wie Übergewicht und Bewegungsmangel. Auch die höhere Lebenserwartung der Diabetiker trägt zu dieser Entwicklung bei. Neuere Studien zeigen, dass auch die Inzidenz der Typ 1 Diabetiker zunimmt (Karvonen et al., 1993). Die Lebenserwartung von Patienten mit einem Typ 1 Diabetes ist signifikant verkürzt. Das Risiko eine kardiovaskuläre Erkrankung zu entwickeln ist für Diabetiker 2-4 größer als für nichtdiabetische Personen (Gaba et al., 1999).

2. Pathogenese des Typ 1 Diabetes

Der Typ 1 Diabetes mellitus stellt eine multifaktorielle Erkrankung dar, in deren Verlauf die insulinproduzierenden β -Zellen der Langerhans'schen Inseln des Pankreas durch immunologische Vorgänge zerstört werden.

Genetische Faktoren, eine Vielzahl von immunologischen Vorgängen und Umweltfaktoren werden als mögliche Ursachen der Entstehung des Typ 1 Diabetes mellitus diskutiert. Genetische Faktoren stellen die Prädisposition, Umwelteinflüsse die Realisationsfaktoren zur Entwicklung des Typ 1 Diabetes dar.

Für die Erforschung der Pathogenese des Typ 1 Diabetes stehen zwei Tiermodelle mit spontaner Diabetesentwicklung zur Verfügung: die non-obese diabetic (NOD)-Maus und die BioBreeding (BB)-Ratte. Beide entwickeln einen insulinabhängigen Diabetes mit einem Krankheitsverlauf, der dem des Menschen sehr ähnlich ist, weshalb sie für die Erforschung des Diabetes sehr wertvoll sind. Die NOD-Maus wurde in Japan im Jahre 1974 entdeckt und danach weitergezüchtet (Makino & Tochino, 1979). Die BioBreeding-Ratte wurde 1977 in Kanada entdeckt (Nakhoda et al., 1977).

2.1. Genetische Prädisposition

Hinweise auf eine genetische Ursache des Diabetes geben eine Vielzahl von Studien. So steigt z.B. das Erkrankungsrisiko für Kinder, bei denen ein Elternteil erkrankt ist von 0.3-0.6% auf 5-10%. Sind beide Eltern erkrankt steigt das Risiko sogar auf 30-50%. Untersuchungen mit eineiigen Zwillingen zeigten, dass diese ein signifikant höheres Risiko haben einen Typ 1 Diabetes zu entwickeln als zweieiige Zwillinge oder nicht-Zwillinge. So weisen genetisch identische Zwillinge eine

Konkordanzrate von 35-50% für die Erkrankung an Diabetes mellitus Typ 1 auf (Barnett et al., 1981; Rossini et al., 1985; Lo et al., 1991)

Bereits Ende der 80ziger Jahre wurde eine Verbindung zwischen der Entstehung des Typ 1 Diabetes und dem Haupt-Histokompatibilitäts-Komplexes (major histocompatibility complex: MHC) beschrieben (Mc Laren et al., 1989). Der MHC ist ein Genkomplex auf Chromosom 6 beim Menschen, welcher für die Codierung von MHC-Antigenen verantwortlich ist. MHC-Antigene sind Zelloberflächenproteine des Organismus, die auf fast allen Zellen vorhanden sind. Zuerst entdeckt wurden sie auf Leukozyten, weshalb sie auch als HLA-Antigene (human leukocyte antigen: HLA) bezeichnet werden (Flavell et al., 1986).

Ihre Funktion besteht unter anderem in der Regulation der Immunantwort. Die MHC-Antigene werden entsprechend dreier Gengruppen des MHC in die Klassen I, II und III unterteilt.

Klasse I und II Antigene sind Glycoproteine, welche in erster Linie der Antigenpräsentation dienen. Klasse I-Antigene befinden sich vor allem auf kernhaltigen Zellen und präsentieren zytotoxischen T-Zellen Antigene. MHC-Proteine der Klasse II hingegen finden sich vorwiegend auf Makrophagen, β -Zellen und aktivierten T-Zellen. Sie sind jedoch auch auf anderen Zellen durch Interferon- γ induzierbar. Ihre Hauptaufgabe stellt die Antigenpräsentation gegenüber T-Helferzellen dar.

MHC-Klassen III- Antigene beschreiben die anderen im MHC-Komplex kodierten Antigene. Unter anderen werden die Komponenten C2, C4a, C4b, Hitzeschockprotein 70, 21 Hydroxylase sowie Tumornekrosefaktor- α und β (TNF) zu dieser Gruppe gezählt.

Für die Entwicklung des Typ 1 Diabetes hat die HLA-Klasse-II-Region des MHC-Komplexes Bedeutung. Nerup et al. konnten als erste 1987 zeigen, dass Träger der HLA-Merkmale DR3 und/oder DR4 ein relativ erhöhtes Risiko aufweisen an einem Typ 1 Diabetes zu erkranken. So tragen 95% der Typ 1 Diabetiker diese HLA-Merkmale, im Vergleich zu 50 bis 60% der Normalbevölkerung. Neben dieser HLA-Region wird aber auch einer Reihe anderer Genloci eine Bedeutung bei der Entstehung des Typ 1 Diabetes zugesprochen (Wicker et al., 1995; Vyse und Todd, 1996)

Dass noch weitere Faktoren für die Entstehung des Typ 1 Diabetes von Bedeutung sein müssen, zeigt sich in der Beobachtung, dass eineiige Zwillinge nur eine

Konkordanzrate von 30-50% und nicht 100% für die Erkrankung an Typ 1 Diabetes aufweisen.

2.2 Umweltfaktoren

Es wird vermutet, dass Umweltfaktoren, wie z.B. Viren, Chemikalien und Ernährungsfaktoren Auslöser für die autoimmunvermittelte Zerstörung der β -Zellen sind (Yoon, 1990). Leslie et al., vermuten den Zeitpunkt dieser initialen β -Zellschädigung in der frühen Kindheit (Leslie et al., 1994).

In den letzten Jahrzehnten wurde besonders den Viren eine bedeutende Rolle in der Entstehung der Insulitis zugesprochen. Der Mechanismus der virusvermittelten Zellschädigung ist nicht völlig geklärt, es werden jedoch folgende Mechanismen diskutiert:

- a) die virale Infektion führt unmittelbar zu einer Zerstörung der infizierten Zellen, ohne dass autoimmune Mechanismen dazu beitragen (EMC-D/Mengo-Virus 2T).
- b) persistierende virale Infektionen (z.B. Retroviren, Rubella virus, CMV) führen zur Initialisierung einer Autoimmunreaktion gegen insulinproduzierende Zellen (Yoon 1991)

Eine Vielzahl strukturell unterschiedlicher Chemikalien, wie beispielsweise Alloxan, Streptozotocin, Chlorozotocin, Vacor und Cyproheptadin wirken ebenfalls diabetogen. Sie beeinträchtigen die β -Zellfunktion durch die Erzeugung von Sauerstoffradikalen, Schädigung der DNA und Hemmung des aktiven Calciumtransporters und der Calmodulin-aktivierten Proteinkinase (Yoon et al., 1990)

Scott und Kolb zeigten, dass auch dietätische Faktoren eine Rolle in der Entstehung des Typ1 Diabetes mellitus spielen (Scott & Kolb, 1996).

2.3. Immunologie des Typ 1 Diabetes

Beobachtungen an Tiermodellen legen die Vermutung nahe, dass die Entstehung des Typ 1 Diabetes mit einer chronisch progredient verlaufenden Entzündung der Langerhans'schen Inseln des Pankreas einhergeht. Die entzündlichen Vorgänge in den Inselzellen können offenbar über Monate und Jahre fortlaufen, ohne dass sich der Typ 1 Diabetes klinisch manifestiert. Erst bei einer Zerstörung von mehr als 80 %

der Betazellen kommt es zur klinischen Manifestation des Diabetes. Obwohl die Entstehung des Typ 1 Diabetes mellitus noch nicht vollständig geklärt ist, deuten die Forschungsergebnisse der letzten Jahrzehnte auf eine autoimmunologische Genese dieser Erkrankung hin. So weiß man, dass durch die Behandlung mit Immunsuppressiva die Zerstörung humaner β -Zellen verzögert werden kann (Canadian European Diabetes Study Group, 1988). Als Zeichen des autoimmunologischen Geschehens finden sich schon vor der Manifestation des Typ 1 Diabetes in 70-90 % Autoantikörper gegen Inselzellgewebe. Inwieweit diese Autoantikörper zur Pathogenese des Typ 1 Diabetes beitragen ist umstritten, da weder die Infiltration der Inseln mit Immunzellen, noch klinische Zeichen der Erkrankung durch Autoantikörper transferierbar sind.

Eine wichtige Rolle bei der Entstehung des Typ 1 Diabetes scheinen die T-Lymphozyten zu spielen. Im Tiermodell wurde nachgewiesen, dass sowohl $CD8^+$, MHC-Klasse-I restringierte, als auch $CD4^+$, MHC-Klasse II restringierte T-Lymphozyten an der Entstehung des Typ 1 Diabetes beteiligt sind (Wicker et al., 1995). Des Weiteren konnten autoreaktive gegen β -Zellantigene gerichtete T-Zellen bei Patienten mit Typ 1 Diabetes (Lohmann und Scherbaum, 1997) und in verschiedenen Tiermodellen für den Typ 1 Diabetes nachgewiesen werden. Ein weiterer Hinweis auf die zentrale Rolle der zellulären Immunität bei der Pathogenese des Typ 1 Diabetes beim Menschen wurde gefunden als eine nicht diabetische Frau wenige Jahre nach einer Knochenmarkspende von ihrem an Typ 1 Diabetes erkrankten HLA-identischen Bruder einen Typ 1 Diabetes entwickelte (Lampeter et al., 1993)

2.4. Makrophagen und der Typ 1 Diabetes

Makrophagen sind mononukleäre Phagozyten, welche bereits 1884 von Metschnikow als Effektorzellen der Infektabwehr identifiziert werden konnten. Die wichtigsten Funktionen der Makrophagen sind Phagozytose, Zytotoxizität, Kooperation mit Lymphozyten und Sekretion verschiedener biologisch aktiver Produkte.

Aus der Fülle der immunologischen Prozesse sticht in letzter Zeit besonders die Rolle der Makrophagen bei der Entwicklung des Typ 1 Diabetes hervor. So konnte bereits Ende der 80ziger Jahre in Tiermodellen nachgewiesen werden, dass

Makrophagen die ersten infiltrierenden Immunzellen der Frühphase der Inselzellentzündung sind (Kolb-Bachofen et al., 1988; Lee et al. 1988; Hanenberg et al., 1989; Kolb et al., 1990; Ziegler et al., 1992; Jansen et al., 1994). Diese Infiltration der Langerhans'schen Inseln konnte anhand von licht- und elektronenmikroskopischen Untersuchungen von Hanenberg et al. (1989) spezifiziert werden. Hanenberg et al. analysierten dabei das Verteilungsmuster der infiltrierenden Immunzellen in Serienschnitten von über 700 Langerhans'schen Inseln der diabetes suszeptiblen BB Ratte. Das Ergebnis zeigte eine spezifische Sequenz der Einwanderung der Immunzellen im Verlauf der Insulitis. Folgende Phasen der Inselentzündung lassen sich demnach unterscheiden:

- Phase 1: Diese Phase ist gekennzeichnet durch Infiltration der Langerhans'schen Inseln mit Makrophagen. Weder T-, noch NK- oder B-Zellen sind zu diesem Zeitpunkt nachweisbar.
- Phase 2: Neben der weiteren Zunahme der infiltrierenden Makrophagen, werden in dieser Phase auch infiltrierende T-Lymphozyten und NK-Zellen beobachtet.
- Phase 3: Hauptmerkmal dieser Phase ist die massive Infiltration der Langerhans'schen Inseln mit B-Lymphozyten.

Die Behandlung der Makrophagen mit makrophagentoxischen Silikapartikeln (Zimmerman et al., 1986) konnte sowohl die Infiltration der Makrophagen und Lymphozyten, als auch die Diabetesentwicklung verhindern. Diese Beobachtung wurde sowohl bei der NOD-Maus (Lee et al. 1988; Charlton et al., 1988) und der BB-Ratte (Oschilewski et al. 1985) als auch im Modell des Niedrig-Dosis-Streptozotocin induzierten Diabetes der Maus (Oschilewski et al., 1986) gemacht.

Appels et al. konnten anhand elektronenmikroskopischer Untersuchungen 1989 die spontane Zytotoxizität von aktivierten Peritonealmakrophagen gegenüber pankreatischen β -Zellen feststellen. Dieser zytotoxische Effekt beruht nicht auf einem direktem Zell-Zell-Kontakt, sondern wird wahrscheinlich durch die von den aktivierten Makrophagen gebildeten humoralen Sekretionsprodukte vermittelt (Prowse et al., 1986). Eine betazelltoxische Wirkung ist für einige dieser Sekretionsprodukte beschrieben. So wirken z.B. Interleukin-1 β und TNF- α in Kombination mit Interferon-gamma betazelltoxisch (Mandrup-Poulsen et al., 1988; Pukel et al., 1988; Rabinovitch, 1993). Die bedeutende Rolle des TNF- α bei der Entstehung der Insulitis

konnte in neueren Studien gefestigt werden. So wurde nachgewiesen, dass das Fehlen von TNF- α -Rezeptoren auf den Inselzellen die Progression und das Ausmaß der Insulitis vermindert (Pakala et al., 1999).

IL-1 β induziert in den körpereigenen Zellen die Bildung freier Radikale und wirkt auf diese Weise inselzelltoxisch (Nerup et al., 1988; Delaney et al., 1993; Corbett et al., 1993; Sjöholm, 1998). Verschiedene Arbeitsgruppen konnten zeigen, dass die von aktivierten Makrophagen gebildeten reaktiven Radikale, insbesondere das Stickstoffmonoxid, zu einer Zerstörung der pankreatischen β -Zellen führt (Sumoski et al., 1989; Kröncke et al., 1991; Kolb und Kolb-Bachofen, 1992; Reddy et al., 1999). Die besondere Bedeutung des NO bei diesem Prozess konnte durch Kröncke et al. 1991 belegt werden. Diese zeigten, dass aktivierte Makrophagen trotz effektiver Neutralisation von IL-1 β und TNF- α pankreatische Inselzellen NO-abhängig lysierten. Der Mechanismus dieser NO-medierten β -Zellzerstörung ist noch nicht vollständig geklärt, es wird jedoch angenommen, dass NO die Induktion von DNA-Strangbrüchen verursacht (Fehsel et al., 1993). Infolge dieser DNA-Schädigung wird das Enzym Poly-(Adenosin-Diphosphoribose)-Polymerase zur Reparatur des Schadens aktiviert (Yamagami et al., 1981). Dieses Enzym katalysiert die Synthese von (Adenosin-Diphosphoribose)-Polymeren aus Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid (NAD). Der erhöhte Verbrauch von NAD und der daraus resultierende NAD-Mangel führen letztlich zum Tod der Zellen (Radons et al., 1994)

2.5. LPS als Aktivator von Makrophagen

Bakterielle Lipopolysaccharide stellen einen Bestandteil der Wand gramnegativer Bakterien dar. Aufgrund ihrer pathophysiologischen Wirkung auf den Organismus werden sie auch als Endotoxine bezeichnet. Dabei übt das LPS seine Wirkung nicht direkt über die Hemmung oder Schädigung von Geweben aus, sondern aktiviert das Immunsystem. Zu dieser Aktivierung des Immunsystems zählt auch die direkte Stimulation von Makrophagen, die daraufhin Zytokine und Sauerstoffradikale, wie z.B. TNF- α und NO freisetzen. Die Interaktion zwischen LPS und den Makrophagen ist dabei durch folgende Prozesse gekennzeichnet: Offenbar bindet das LPS im Serum an ein spezifisches LPS-Bindungsprotein (LBP) (Tobias et al. 1989). Dieses LBP bewirkt eine deutliche Erhöhung der Sensitivität der Makrophagen gegenüber LPS. Dabei erkennt das LBP den biologisch reaktiven Lipid-A-Anteil des LPS

(Schumann et al., 1990). Der dadurch entstandene LPS-LBP-Komplex bindet nun an das Protein CD14. CD 14 befindet sich sowohl in löslicher Form im Plasma als auch in gebundener Form an der Zelloberfläche von Monozyten. CD14 bindet das LPS und erleichtert so dessen Signaltransduktion (Wright et al., 1990&1995). CD 14 ist mit einem Glykosylphosphatidylinositolmolekül in der Membran befestigt, besitzt jedoch keine transmembranöse Domäne, die das LPS-Signal in die Zelle weiterleiten könnte. Es wurde vermutet, dass ein anderes Molekül diese Funktion übernimmt. Tatsächlich konnten kürzlich sogenannte „Toll-like“ Rezeptoren als transmembranöse Signalmoleküle für die Weiterleitung des LPS-Signals identifiziert werden (Medzhitov et al., 1997; Rock et al., 1998). TLRs sind transmembranöse Moleküle, die aus einer leucinreichen extrazellulären und einer intrazellulären Signaldomäne bestehen, die dem Typ I IL-1 Rezeptor ähnlich ist. Besonders der TLR4 ist für die Weiterleitung des LPS-Signals verantwortlich (Poltorak et al., 1998; Qureshi et al., 1999; Hoshino et al., 1999). Allerdings ist der TLR4 alleine nicht in der Lage das LPS zu erkennen und dessen Signal weiterzuleiten (Shimazu et al., 1999). Hierzu benötigt er die Hilfe des MD-2 Moleküls, das mit dem TLR4 assoziiert ist (Shimazu et al., 1999). Der TLR4-MD-2 Komplex stellt somit das Erkennungsmolekül für LPS auf Monozyten dar. Die Bindung von LPS an CD 14 erhöht die Sensitivität des TLR4-MD-2 Komplex gegenüber LPS auf das Doppelte (Akashi et al. 1999). Diese transmembrane Signaltransduktion, in deren Rahmen es zur Phosphorylierung von Proteinen durch die MAP-Kinasen („mitogen activated protein kinase“) kommt, führt schließlich zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B („nuclear factor- κ B“) (Übersicht: Ulevitch und Tobias, 1995). Durch die anschließende Bindung des NF- κ B an das TNF- α - und iNOS-Gen kommt es zur Expression und Produktion von TNF- α und NO.

2.6. ODN 1668 stimuliert Makrophagen

1668 ist ein synthetisches Oligodesoxynucleotid welches eine unmethylierte CpG-Sequenz beinhaltet. Diese CpG-Sequenz wurde von Krieg et al. 1995 als eine biologisch aktive Nucleotidsequenz beschrieben. Tatsächlich ist dieses CpG ODN in der Lage die Zellen des angeborenen Immunsystems, wie zum Beispiel Makrophagen und dendritische Zellen stark zu stimulieren (Stacy et al., 1996, Lipford et al., 1997; Sparwasser et al., 1997). Dieses Ergebnis ist auch in dieser Arbeit

bestätigt worden, zeigt doch das 1668 eine konzentrationsabhängige Stimulation der J774 Mausmakrophagen zur TNF- α und NO-Freisetzung. Der molekulare Mechanismus, der zu der Aktivierung von Makrophagen durch CpG-ODN führt, ist noch nicht vollständig aufgeklärt. Erste Hinweise für die Interaktion zwischen Oligodesoxynucleotiden und Makrophagen konnten Loke et al. bereits 1988 gewinnen, als sie demonstrierten, dass ODNs aktiv über einen endozytotischen Prozess in die Zelle aufgenommen werden. Häcker et al. zeigten zehn Jahre später, dass CpG-DNA unspezifisch an Zelloberflächenproteine gebunden und anschließend in endosomalen Vesikeln in die Zelle eingeschleust wird, und dass die in die Zelle aufgenommene CpG-ODN zu einer spezifischen Aktivierung des Stress-Kinase-Pathway führt. Hemmi et al. wiesen kürzlich nach, dass die Zellaktivierung durch CpG DNA über die Bindung an einen Toll-like receptor, TLR9, mediiert wird (Hemmi et al., 2000).

2.7. Makrophagen-aktivierendes Lipopeptide (MALP)

Mykoplasmen sind zellwandlose Bakterien, welche die Fähigkeit besitzen Makrophagen zu stimulieren (Mühlradt et al., 1991). Diese Stimulation erfolgt nicht wie bei anderen gram-negativen Bakterien durch LPS und andere in der Zellwand lokalisierter Stoffe sondern durch Lipopeptide (Mühlradt et al., 1997 und 1998) und Lipoproteine (Feng et al., 1994; Herbelin et al., 1994; Kostyal et al., 1994). Mühlradt et al. gelang es eines dieser Lipopeptide, das 2kDa Makrophagen-aktivierendes Lipopeptide-2 (MALP-2) von Mycoplasma fermentans genauer zu charakterisieren und zu synthetisieren. In in vitro Versuchen konnte gezeigt werden, dass das synthetisierte S, R Racemat des MALP-2 bereits in picomolaren Konzentrationen zu einer deutlichen Zellstimulation führt (Mühlradt et al., 1997). Der Mechanismus der Zellstimulation durch MALP-2 ist noch nicht vollständig geklärt, jedoch konnten Takeuchi et al. nachweisen, dass MALP-2 Immunzellen vor allem über den Toll-like-receptor-2 aktiviert (Takeuchi et al., 2000).

3. Hitzeschockproteine

Zellen reagieren auf unterschiedlichste Belastungen mit der Bildung sogenannter Stressproteine. Dabei handelt es sich um eine heterogene Gruppe von Proteinen,

welche universell bei allen Organismen zu finden sind. Die bekannteste Gruppe der Stressproteine sind die Hitzeschockproteine (HSPs), welche 1962 von Ritossa zuerst in der Fruchtfliege *Drosophila* entdeckt wurden. Ihren Namen verdanken sie der vermehrten Expression durch Hitzeeinwirkung. Seit längerem ist bekannt, dass die Synthese der Hitzeschockproteine durch eine Vielzahl unterschiedlicher Reize induziert werden kann (Lindquist et al., 1986; Feige et al., 1992). In ungestressten Zellen sind die Hitzeschockproteine nur in geringen Mengen vorhanden, wohingegen sie in gestressten Zellen akkumulieren. In *E.coli* z.B. repräsentiert das von Hendrix et al. zuerst beschriebene HSP60-Homolog GroEL unter normalen Bedingungen 1-2% des Gesamtproteingehaltes (Hendrix et al., 1979). Unter Stressbedingungen erhöht sich der Anteil des GroEL um das 4-5fache (Shinnick et al., 1991). Die Funktion der Hitzeschockproteine in Stresssituationen besteht im wesentlichen in der Stabilisierung von Proteinen und der Verhinderung von Proteinaggregationen (Craig et al., 1993/1994; Becker et al., 1994; Hartl et al., 1994/1996). Die Hitzeschockproteine haben jedoch auch unter Ruhebedingungen wichtige Funktionen, so sind sie für die korrekte Faltung, Zusammenlagerung, den Transport und den Abbau von Proteinen essentiell (Ellis et al., 1989; Becker et al., 1994; Craig et al., 1993/1994; Hartl et al., 1994/1996; Frydman et al., 1994; Burel et al., 1992). Auf Grund ihrer Funktion werden sie auch als molekulare Chaperone bezeichnet. Die Synthese der Hitzeschockproteine wird bei Eukaryonten hauptsächlich von einem spezifischen Hitzeschock-Transkriptionsfaktor HSF-1 kontrolliert. Dieser liegt in ungestressten Zellen in einer inaktiven monomeren Form vor. In Folge von Stress bildet der HSF-1 Trimere, akkumuliert im Zellkern und initiiert dort die Transkription der Stressgene (Morimoto et al., 1994).

Die Hitzeschockproteine werden nach ihrem Molekulargewicht klassifiziert und benannt (Lindquist & Craig, 1988). So unterscheidet man HSP60, 70, 90 und 100, sowie eine Vielzahl niedermolekularer Hitzeschockproteine. Hitzeschockproteine finden sich in vielen Kompartimenten der Zelle. In Mitochondrien, im Nucleus, im endoplasmatischen Retikulum (ER), im Zytosol, in den Lysosomen und an der Plasmamembran wurden HSP nachgewiesen (Multhoff et al., 1998).

Neben den genannten Funktionen sind Hitzeschockproteine auch an der Prozessierung und Präsentation von Antigenen beteiligt (Pierce et al., 1991; Christau et al., 1994). Dabei fördern die HSPs unter anderem die Faltung und den Zusammenbau der MHC-Peptid-Komplexe, bestehend aus einem MHC I oder II

Molekül und dem zu präsentierenden Peptid (DeNagel et al., 1992; Melnick et al., 1995; Williams et al., 1995). Besonders die Mitglieder der HSP70 Familie sind an der Antigenprozessierung und –präsentation beteiligt (Vanbuskirk et al., 1989; Schirmbeck et al., 1994; Williams et al., 1995). Srivastava und seine Mitarbeiter konnten herausfinden, dass Mitglieder der HSP70 und HSP90-Familien unmittelbar am Transport von Peptiden von den Proteosomen in das ER und die Bindung dieser Peptide an MHC-Klasse I Moleküle beteiligt sind (Li et al., 1993; Srivastava et al., 1993/1994). In neueren Studien konnte das gp96 im ER als Akzeptor zytosolischer Peptide identifiziert werden. Nach ihrem Transport durch die Membran des ER werden die zu präsentierenden Peptide an das gp96 gebunden, welches dann an das Klasse I MHC-Molekül bindet und das Peptid in einem ATP-abhängigen Prozess auf dieses überträgt (Srivastava et al., 1994; Lammert et al., 1997).

3.1. Hitzeschockproteine und ihre Rolle bei der Entstehung von Autoimmunerkrankungen:

Durch die mikrobielle Invasion eines Wirtsorganismus entsteht sowohl für den Wirt als auch für den Mikroben Stress. Dieser Stress führt bei beiden zu der Bildung von Hitzeschockproteinen. Die mikrobiellen Hitzeschockproteine werden dabei als Antigene vom Immunsystem des Wirtes erkannt und bekämpft (Kaufmann et al., 1990 a/b;1991). Aufgrund ihrer starken evolutionären Konservierung zwischen den unterschiedlichen pathogenen Organismen werden Hitzeschockproteine als Hauptantigene angesehen. Dabei wurde für HSP60 und 70 eine hoher Grad an Sequenzhomologie zwischen einer Vielzahl pathogener und nicht-pathogener Bakterien nachgewiesen (Shinnick et al., 1991). Diese Homologie lässt sich zum Beispiel zwischen mykobakteriellem HSP60 und dem GroEL von E.coli nachweisen (Shinnick et al., 1988). In einer Vielzahl von Untersuchungen konnte die Immunantwort gegen mikrobielles HSP beobachtet werden. Besonders bei Infektionen mit Mykobakterien wurde das HSP60 als immundominantes Ziel der Antikörper- und T-Zell-Antwort sowohl in Mäusen als auch Menschen identifiziert (Young et al., 1990; Kaufmann et al., 1990). Neben dem HSP60 stellen auch andere Mitglieder der HSP-Familie immundominante Antigene in einer Vielzahl von infektiösen Erkrankungen dar. So zum Beispiel das HSP70 bei der Malaria oder Candidiasis (Shinnick et al., 1990).

Den Hitzeschockproteinen, speziell dem HSP60 und 70, wird eine entscheidende Rolle bei der Entstehung einer Vielzahl von Autoimmunerkrankungen zugesprochen. So sollen sie als Hauptantigene bei der Entstehung z.B. der rheumatoiden Arthritis, der Arteriosklerose, der Psoriasis und des Typ 1 Diabetes beteiligt sein. Dabei wird die molekulare Mimikry als mögliche Ursache der Entstehung von Autoimmunerkrankungen erachtet (Theofilopoulos, 1995). Man vermutet, dass im Rahmen einer Immunantwort gegen mikrobielles HSP aufgrund einer unzureichenden Focussierung der Immunantwort auch HSP-Regionen auf wirtseigenem HSP60 als Antigen erkannt werden. Tatsächlich wurden erhöhte Antikörperspiegel gegen eigenes HSP60 z.B. in Patienten mit der Lyme-Krankheit festgestellt (Shanafelt et al., 1991). Genauso konnten in Seren von Patienten mit Malaria Antikörper nachgewiesen werden, welche das HSP70 von *P.falciparum* und das körpereigene HSP70 als Antigen erkannten (Mattei et al., 1988). Diese Ergebnisse lassen eine hohe Sequenzhomologie zwischen mikrobiellen und humanem HSP vermuten. Und tatsächlich konnte von Jindal et al. eine 60%ige Übereinstimmungen der Aminosäuresequenz von mykobakteriellem und humanem HSP60 entdeckt werden (Jindal et al., 1989). In diesem Zusammenhang überrascht es nicht, dass genau diese homologen Sequenzen des eigenen HSP60 als Antigenmuster erkannt werden.

Bei der Pathogenese einer Vielzahl von Autoimmunerkrankungen spielt dieser Mechanismus eine bedeutende Rolle. Erhöhte Antikörperspiegel gegen HSP60 konnten u.a. für die folgenden Erkrankungen nachgewiesen werden: Arteriosklerose, Systemische Sklerose, Psoriasis, Rheumatoide Arthritis, Zystische Fibrose, Systemischer Lupus erythematodes, chronisch juvenile Arthritis (Danieli et al., 1992; Xu et al., 1993; Rambukkana et al., 1993; de Graeff-Meeder et al., 1993). Dabei werden nicht nur kreuzreaktive humorale (Kaufmann et al., 1994), sondern auch T-zelluläre Vorgänge gegen eigenes HSP beobachtet (Lamb et al., 1989; Munk et al., 1989; Quayle et al., 1992; Anderton et al., 1993). So konnte z.B. gezeigt werden, dass einige $\gamma\delta$ T-Zellen mit HSP60 interagieren, da diese Interaktion durch spezifische anti-HSP60-Antikörper gehemmt werden konnte (Fisch et al., 1990; Kaur et al., 1993). Auch für $\alpha\beta$ T-Zellen konnte diese Kreuzreaktivität gegen mykobakterielles und humanes HSP60 nachgewiesen werden (Li et al., 1992).

Fraglich ist jedoch, wie das eigene HSP, welches normalerweise hauptsächlich im Zytosol der Zelle lokalisiert ist, der kreuzreaktiven Immunantwort zugänglich wird. In

einer Vielzahl von Untersuchungen wurde nachgewiesen, dass Hitzeschockproteine während mikrobieller Infektionen an der Zelloberfläche vermehrt exprimiert werden und so durch Antikörper erkannt werden können (Multhoff et al., 1996). Beispielsweise wird bei Patienten mit systemischem Lupus Erythematoses HSP90 auf Lymphozyten und Monozyten exprimiert (Erkeller-Yueksel et al., 1992). Ein weiteres Beispiel für die Zelloberflächenlokalisation von HSP60 wurde für die chronische Autoimmunencephalomyelitis festgestellt (Gao et al., 1995).

In vielen Studien an Mensch und Tier konnte das eigene HSP als Zielantigen für T-Zellen nachgewiesen werden. Dies ist einerseits durch die genannte Homologie zwischen Fremd- und Selbst-HSP zu erklären und andererseits durch die Präsentation eigener HSP-Peptide durch MHC-Moleküle (Jardetzky et al., 1993; Newcomb et al., 1993; Rammensee et al., 1993). Unter Stressbedingungen steigt die HSP-Synthese und folglich auch der Abbau von HSP in der Zelle. Im Zytosol befinden sich demnach auch Peptide des eigenen HSP, die wie andere Peptide Zugang zu den Beladungsstellen der MHC Klasse I Moleküle erhalten und in Assoziation mit diesen präsentiert werden. Erstaunlicherweise werden eigene HSP Peptide auch in Assoziation mit MHC-Klasse II Molekülen, die normalerweise ausschließlich exogene Peptide verarbeiten, präsentiert.

3.2. Die Rolle des HSP 60 bei der Pathogenese des Typ 1 Diabetes :

Elias et al., identifizierten bereits 1990 HSP 60 als ein Betazell-Antigen in der NOD-Maus. Dabei konnten in den NOD-Mäusen, welche einen Diabetes entwickelten, anti-HSP 60 Antikörper nachgewiesen werden. In den NOD-Mäusen, die keinen Diabetes entwickelten, wurden diese nicht festgestellt. Das Auftreten der Antikörper war schon Wochen vor Manifestation des IDDM zu beobachten. Mit Beginn der β -Zelldestruktion assoziiert war zudem das Auftreten von anti-HSP60 T-Lymphozyten, denen eine diabetogene Wirkung nachgewiesen werden konnte. Dies zeigte sich nachdem Elias und Mitarbeiter anti-HSP-60 reaktive T-Lymphozyten von 3 Monate alten NOD-Mäusen entnahmen und diese 1,5 Monate alten prädiabetischen NOD-Mäusen injizierten. Diese entwickelten daraufhin bedeutend rascher als vergleichbare Kontrolltiere einen Diabetes.

Eine wichtige Beobachtung zur Klärung der Rolle des HSP 60 bei der Entstehung des IDDM machten Brudzynski et al. 1992 und 1993. Mit Hilfe der

Immunoelektronenmikroskopie untersuchten Brudzinski et al. die zelluläre Verteilung eines mit HSP60 verwandten Proteins in pankreatischen β -Zellen von NOD- und Kontrollmäusen. Dabei zeigte sich, dass dieses Protein unter physiologischen Bedingungen vor allem in den Insulinsekretionsgranula und den Mitochondrien der β -Zellen lokalisiert ist. Dieses Verteilungsmuster konnte in den β -Zellen von prädiabetischen NOD-Mäusen nicht mehr nachgewiesen werden. Hier zeigte sich vielmehr eine völlig veränderte Verteilung des mit anti-HSP60-Antikörpern reagierenden Proteins. Dieses wurde nicht wie zuvor in den Sekretionsgranula, sondern im Zytoplasma und auf der Zellmembran der β -Zelle lokalisiert. Die Umverteilung des 62 kDa Proteins erschien umso ausgeprägter, je stärker die Insulinitis war. Weiterhin fiel auf, dass die Neuverteilung des Proteins ausschließlich bei Mäusen mit schon bestehender Insulinitis zu beobachten war. NOD-Mäuse ohne Insulinitis zeigten hingegen ein normales Verteilungsmuster des dem HSP-60 verwandtem Proteins. Welche Faktoren letztendlich für die Umverteilung dieses Proteins verantwortlich sind ist nicht bekannt. Es ist jedoch denkbar, dass zellulärer Stress, z.B. durch Umwelteinflüsse, Infektionen oder Entzündungen eine Rolle für diesen Vorgang spielen.

In einer anderen Studie konnten Brudzinski et al. zeigen, dass diese Neuverteilung des dem HSP60 verwandtem Proteins zeitlich mit dem Auftreten von Autoantikörpern gegen HSP60 im Serum prädiabetischer NOD-Mäuse verbunden ist. Diese Ergebnisse stützten die Vermutung, dass das eigene HSP60 als Autoantigen in der Entwicklung des IDDM fungiert.

Birk et al., konnten eine stärkere spontane T-Zell-Proliferation gegen humanes bzw. murines HSP60 als gegen mykobakterielles HSP60 nachweisen (Birk et al., 1996).

Elias und Mitarbeiter identifizierten 1991 ein Epitop des humanen HSP60 (p277) als Zielepitop, welches von $CD4^+$ T-Lymphozyten erkannt wird. Das p277 umfaßt die Aminosäuren 437 bis 460 von murinem und humanem HSP60. Interessanterweise unterscheiden sich das murine und humane p277 nur in einer Aminosäure und sind kreuzreaktiv. Die Rolle des p277 bei der Entstehung des Typ 1 Diabetes ist zwiegespalten, konnte doch sowohl eine diabetogene als auch eine diabetesprotektive Wirkung dieses Peptids nachgewiesen werden. Die p277-reaktiven T-Zellklone bewirken bei jungen prädiabetischen NOD-Mäusen die Entwicklung einer Hyperglykämie, wohingegen in diabetesresistenten NON-Mäusen kein Effekt dieser T-Zellen nachzuweisen ist. Auch in normalen Mäusestämmen wie

C57BL/6 und C3HeB/FeJ, welche normalerweise keinen Diabetes entwickeln, konnte durch die Immunisierung mit p277 die Entwicklung eines Diabetes beobachtet werden. Das p277 war dabei an Trägermoleküle wie Ovalbumin oder bovines Serumalbumin gebunden (Elias et al., 1995). Des Weiteren wurde bei transgenen I-E_α^d NOD-Mäusen zwischen der Immunantwort auf mykobakterielles HSP65 und der Induktion der Insulitis eine Beziehung festgestellt. (Shimada et al., 1996).

Auf der anderen Seite konnte durch die Immunisierung von NOD-Mäusen mit p277 die Entwicklung und Progression eines Diabetes verhindert werden (Elias et al., 1994 a/b). Dies wurde auch für den durch Streptozotocin induzierten immunmedierten Diabetes nachgewiesen (Elias et al., 1996). Neuere Daten belegen, dass die Behandlung der NOD-Maus mit p277 zu einer vermehrten Freisetzung von TH2 Zytokinen und somit zu einer Herunterregulierung der TH1 vermittelten Autoimmunantwort gegen HSP60 führt (Elias et al., 1997).

Aus diesen Daten geht hervor, dass HSP60 womöglich eine zentrale Rolle bei der Entstehung der Insulitis und des Typ 1 Diabetes spielt. Dabei stellt sich jedoch die Frage, auf welche Weise HSP60 die zelluläre und humorale Immunantwort aktiviert. Das frühe Auftreten von antigenpräsentierenden Zellen zu Beginn der Insulitis und die einmalige Fähigkeit der APCs Antigen zu prozessieren und an das spezifische Immunsystem zu präsentieren deuten auf eine entscheidende Rolle der APCs bei diesen Prozessen.

Und in der Tat konnten Chen et al. 1999 zeigen, dass humanes HSP60 von Zellen des unspezifischen Immunsystems wie Makrophagen erkannt wird. Auf den Kontakt mit humanem HSP60 reagieren die Makrophagen mit der rapiden Bildung und Freisetzung von TNF- α und Stickstoffmonoxid. Diese entzündungsfördernde Makrophagenantwort ist dosisabhängig und bezüglich ihrer Kinetik der Stimulation mit LPS ähnlich. Außerdem bewirkt humanes HSP60 eine verstärkte Expression der Zytokine IL-12 und IL-15. Dieser Effekt wurde nicht nur bei murinen Makrophagen, sondern auch bei humanen Monozyten (Chen et al., 1999) nachgewiesen.

Die entscheidende Frage ist nun, auf welche Art und Weise das HSP60 zu einer Aktivierung der Makrophagen führt.

Erste Hinweise zur Beantwortung dieser Frage stammen von Untersuchungen von Arnold-Schild et al. 1999. In ihren Versuchen inkubierten sie die goldmarkierten Hitzeschockproteine gp96 und HSC70 mit Monozyten und dendritischen Zellen.

Durch die elektronenmikroskopische Untersuchung der Zellen konnte eine rezeptorvermittelte Endozytose für gp96 und HSC70 nachgewiesen werden.

Binder et al. postulieren eine rezeptorvermittelte Wirkung der Hitzeschockproteine HSP90, HSP70 und gp 96 (Srivastava et al., 2000). Auch Ohashi et al. halten eine rezeptorvermittelte Aktivierung der murinen Makrophagen durch humanes HSP60 für wahrscheinlich, konnten sie doch zeigen, dass Makrophagen mit einer Mutante des Toll-like-receptor 4 nicht durch HSP60 aktiviert werden können (Ohashi et al., 2000).

4. Fragestellung der Arbeit:

In dieser Arbeit sollte anhand eines Modellsystems in vitro die Aktivierung muriner Makrophagen durch humanes HSP60 anhand von Inhibitionsversuchen spezifiziert werden. Die Charakterisierung dieser Interaktion ist von wesentlicher Bedeutung, da HSP60 durch die Aktivierung von Makrophagen zur Initiation bzw. Progression der Insulitis beitragen kann. Durch genaue Kenntnis dieser Interaktion könnten Medikamente entwickelt werden, die diese Zellaktivierung und somit die Progression der Insulitis hemmen.

Material und Methoden

1. Material

1.1. Zelllinie J774 A1

Bei der in dieser Arbeit benutzten Zelllinie handelt es sich um eine Tumor-Makrophagen-Zelllinie der Maus. Sie stammt aus der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, Bereich menschliche und tierische Zellkulturen, Braunschweig , Kat. Nr.: DSM ACC 170. Die Zellen wurden in RPMI 1640-Medium (mit 10 % FCS) bei 37 °C mit 5 % CO₂ gehalten.

1.2. Geräte

Elektrophoresekammer	Biorad, Hercules, USA
Lumi-Imager	Boehringer Mannheim, Deutschland
Mikroplate Reader	MWG-Biotech, Ebersberg, Deutschland
Mikroskop	Leitz, Deutschland
Nunc-Immuno-Wash 12	Nalge Nunc, Rochester, NY, USA
Sterilbank LaminAir HLB 2472	Heraeus, Osterode, Deutschland
Wärmeschrank	Heraeus, Osterode, Deutschland
Wasserbad	Julabo, Allentown, PA, USA
Zentrifuge Sepatech	Heraeus, Osterode, Deutschland

1.3. Chemikalien/ Reagenzien

Acrylamid (ProSieve 50)	FMC Bio Products, Rockland, USA
Ampicillin	Serva, Heidelberg, Deutschland
Coomassie Brilliant Blue	Serva, Heidelberg, Deutschland
Hepes	Serva, Heidelberg, Deutschland
L- α -Phosphatidylinositol	Sigma, Deisenhof, Deutschland, Lot:79H7040
Laemmli-Puffer, Roti-Load 4x Konz.	C.Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
L-Glutamin	Gibco, Eggenstein, Deutschland
Magnesium-Chlorid ($MgCl_2$)	Gibcol BRL, Eggenstein, Deutschland
Mizoribin	Sigma, Deisenhof, Deutschland Lot: 47H4087
Nicht essentielle Aminosäuren	100x, Gibco, Eggenstein, Deutschland
n-Octylglucosid	Calbiochem, La Jolla, Canada
Penicillin	Serva, Heidelberg, Deutschland
Polymyxin-B-Sulfat	Sigma, Deisenhof, Deutschland Lot:028H06466
Streptomycin	Serva, Heidelberg, Deutschland
Temed (Tetramethylethyldiamin)	Serva, Heidelberg, Deutschland

Thiazolyl-blue	Biomol, Hamburg, Deutschland
Trypanblau (0,4% in 0,85% NaCl)	Gibco , Eggenstein, Deutschland
Tween 20	Calbiochem, La Jolla, Canada

Alle hier nicht aufgelisteten Chemikalien, sind von Merck (Darmstadt, Deutschland), Sigma (Deisenhofen, Deutschland) oder Boehringer Mannheim (Mannheim, Deutschland) bezogen.

1.4. Enzyme

Accutase	PAA Laboratories, Wien, Austria
Avidin-Peroxidase	Pharmingen, San Diego, USA, Lot: M049530

1.5. Proteine und Antikörper

Amyloid- β -Protein Frag.:1-16	Sigma, Deisenhofen, Deutschland Lot. 59H12561
Biotinylierter Antikörper anti-Maus TNF- α	0,5 mg (1ml), Pharmingen, San Diego, USA, Lot: M051278
Defensin HNP-1 (human)	Bachem, Heidelberg, Deutschland
Fötales Kälberserum (FCS)	Gibco, Eggenstein, Deutschland
Gereinigter Antikörper anti-Maus TNF- α	0,5 mg (1ml), Pharmingen, San Diego, USA, Lot: M051281
Lipopolysaccharid von E.coli 026:B6*C	Sigma, Deisenhofen, Deutschland, Lot: 129H4020

Magainin I	Sigma, Deisenhofen, Deutschland, Lot: 107H49521
Magainin II	Sigma, Deisenhofen, Deutschland Lot: 77H49501
Magainin II Amid	Sigma, Deisenhofen, Deutschland Lot: 37H40501
Mycoplasmatisches Lipopeptid	freundlicherweise von Prof. Mühlradt, Braunschweig, zur Verfügung gestellt. Zur optimalen Lösung wurde das MALP-2 mit Octylglucopyranosid verdünnt. Die Endkonzentration des Octylglucopyranosids betrug in dieser Arbeit maximal 20µM.
Myelin-Basisches Protein Frag.68-82	Sigma, Deisenhofen, Deutschland Lot: 107H4953
1668 Oligodesoxynucleotid	Tib Molbiol, Berlin, Deutschland, Produkt-Nr.:176515
Peroxidase-gekoppelter Kaninchen anti-MausAntikörper	1,3 g/l , DAKO, Glostrup, Denmark, Code No. P0161, Lot 095
Rekombinantes Humanes C-Peptid	Sigma, Deisenhofen, Deutschland, Lot: 118H49501
Rekombinantes Humanes huHsp60	Peptor Limited, Rehovot, Israel
Rekombinantes Humanes huHSP65 Fragment 437-450	Sigma, Deisenhofen, Deutschland, Lot. 67H1686

Monoklonaler Maus-Antikörper gegen rekombinantes hu-HSP60	0,64 mg/ml, Stress Gen, Victoria, Canada, Clone:LK-1, Lot:912404
Rekombinantes Maus TNF- α	100 ng, Pharmingen, San Diego, USA, Lot: M050304
Synthetisches Peptid aus GroEL	Affina, Berlin, Deutschland AS-Sequenz: N-SWMTTPWGFLHP
Synthetisches Peptid vsv-C	Affina, Berlin, Deutschland AS-Sequenz: KLIGVLSSLFRPK

1.6. Sterilisation der Chemikalien und Geräte

Hitzebeständige Lösungen und Glaswaren wurden bei 121 °C und 2 Bar für 20 Minuten autoklaviert. Nicht autoklavierbare Lösungen wurden durch Filter mit der Porengröße von 0,2 μ m sterilfiltriert.

1.7. Einwegartikel für die Zellkultur

Verbrauchsmaterialien für die Zellkultur (96-Well-Flachboden-Mikrotiterplatten, Zentrifugenröhrchen, Zellkulturschalen und Zellkulturplatten), für ELISA- und NO-Messung wurden von Falcon (Becton Dickson Labware, New Jersey, USA) und Greiner (Solingen, Deutschland) bezogen.

1.8. Medien für die Zellkultur

RPMI1640 Medium: PAA Laboratories, Wien, Austria, Kat. Nr. E15-039
mit den folgenden Zusätzen:

Ampicillin 25mg/l

Penicillin 120 mg/l

Streptomycin 270 mg/l

10 ml/l nicht-essentielle Aminosäuren (100x)

	Hepes 2,38 g/l
	Glutamin 192 mg/l
Lösung A	NaCl 9g/l
	Hepes 2,38g/l
	Phenolrot 1ml/l
	KCl (1M) 10ml/l
	Glucose (10%) 10ml/l

1.9. Stammlösungen und -puffer

Coating Buffer:	NaHPO ₄ 1,18g
	NaH ₂ PO ₄ 1,61g
	100 ml H ₂ O
	pH 6,5, bei 2-8°C lagern
Phosphat-gepufferte Saline:	NaCl 8,0g
	NaH ₂ PO ₄ 1,16g
	KH ₂ PO ₄ 0,2g
	KCl 0,2g
	Ad 1000µl H ₂ O, pH 7,0
Verdünnungslösung (Assay Diluent)	PBS mit 10% FCS, pH 7,0
Waschpuffer	PBS mit 0,05% Tween-20
Stopp-Lösung	2N H ₂ SO ₄
Substrat-Lösung	Set von Pharmingen, San Diego, USA
	Substrat 1: Tetramethylbenzidin in organischem Lösungsmittel

Substrat 2: Hydrogenperoxid in gepufferter Lösung

Durch Mischung gleicher Mengen von Substrat 1 und 2 erhält man die Substratlösung.

Vor der Benutzung auf Raumtemperatur erwärmen.

Lagerung bei 2-8°C

Natrium Dodecyl Sulfat (SDS) (10%) Bio Whittaker, Walkersville, USA

Lösung A (Griess-Reaktion): 0,1g Sulfanilamid
ad 10 ml 2,5% H₃PO₄

Lösung B (s.o.) N-(1-Naphtyl)Ethylendiamin Dihydrochlorid
(NEDDC), 0,03 g, in 10ml 2,5% H₃PO₄ gelöst.

Beide Lösungen sind lichtempfindlich und sollten bei 4°C dunkel gelagert werden.

Laufpuffer 10x: 30,3 g Tris
144 g Glycin
10 g SDS
pH 8,3
ad 1 Liter H₂O

Übertragungspuffer 3,03 g Tris
14,41 g Glycin
200 ml Methanol
ad 1 Liter H₂O, Lagerung bei 4°C

Tris gepufferte Salzlösung 50ml 3M NaCl
20 ml 1M Tris-HCl
ad 1 Liter H₂O, pH 7,6

Zellen aus der Flasche zu entfernen. Um die Zellen von der Flaschenwand zu lösen wurden diese mit 4ml Accutase für 5 min. inkubiert und anschließend vorsichtig mit Hilfe einer Pasteurpipette vom Flaschenboden abgespült. Nach dem Ablösen der Zellen folgte die Zentrifugation der Zellsuspension bei 1100 U/min und 4° C für 5 min. Das entstandene Zellpellet wurde mit 5ml RPMI 1640-Medium resuspendiert und die Zellen anschließend im Verhältnis 1:10 verdünnt und in einer neuen Flasche kultiviert.

Bestimmung der Zellzahl:

Mittels des Vitalfarbstoffes Trypanblau ist es möglich die Zahl der lebenden Zellen in einer Kultur zu bestimmen. Die Zellmembranen toter Zellen sind für diesen Farbstoff durchlässig, wodurch die toten Zellen im Gegensatz zu den lebenden eine blaue Farbe annehmen. Mittels eines Lichtmikroskops lässt sich die Zahl der lebenden Zellen nun wie folgt in der Neubauer-Zählkammer bestimmen:

Anzahl der lebenden Zellen = Gesamtzellzahl - Anzahl der toten Zellen

Ein Aliquot der zu bestimmenden Zellsuspension wurde mit einer physiologischen Trypanblaulösung im Verhältnis 1:10 verdünnt, in einer Neubauer-Zählkammer aufgetragen und die Zellzahl wie folgt berechnet: Zellzahl in 16 Quadranten x Verdünnungsfaktor x 10^4 (Kammerkonstante) = Zellzahl/ml

2.2. Stimulation der Mausmakrophagen

Makrophagen reagieren auf unterschiedliche Reize u.a. mit der Bildung von Sauerstoffradikalen, Stickstoffmonoxid und Zytokinen, wie z.B. TNF- α , IL-6 oder IL-12. Diesem Mechanismus wird eine bedeutende Rolle in der Entwicklung des Diabetes mellitus zugesprochen. In dieser Arbeit wurden Mausmakrophagen der J774-Zelllinie mit definierten Stimulantien inkubiert und die Beeinflussung der Stimulierbarkeit durch die Zugabe potentieller Inhibitoren untersucht.

Zur Objektivierung des Ausmaßes der Zellreizung wurden in den Zellüberständen die TNF- α - und NO- Konzentrationen bestimmt. Die Zellstimulation wurde dabei nach folgendem Schema durchgeführt:

- Aussaat der Zellen auf einer 96-well Zellkulturplatte in einer Konzentration von 1×10^6 Zellen/ml RPMI 1640 Medium. In jedes well wurden $200 \mu\text{l}$ (2×10^5 Zellen/well) der Zellsuspension gefüllt und für 18 Stunden bei 37°C im Wärmeschrank kultiviert.
- Anschließend wurden die Zellen durch die Zugabe von LPS, huHSP 60, 1668 oder MALP-2 in unterschiedlichen Konzentrationen stimuliert, oder sie blieben unstimuliert. Vor der Stimulation wurden die Zellen bzw. die Stimulantien mit verschiedenen Substanzen („Inhibitoren“), wie z.B. Mizoribin, Polymyxin-B oder Phosphatidylinositol, in verschiedenen Konzentrationen und für verschiedene Zeiträume vorinkubiert.
- Nach 6 Stunden Inkubation bei 37°C im Wärmeschrank wurden $70 \mu\text{l}$ pro well des Zellüberstandes abgenommen und auf eine 96-well Mikrotiterplatte überführt. Die Überstände wurden bei -20°C eingefroren, bevor der Gehalt an $\text{TNF-}\alpha$ bestimmt wurde.
Nach weiteren 18 Stunden bei 37°C wurden $50 \mu\text{l}$ pro well des Zellüberstandes abgenommen und der NO-Gehalt mittels der Griess-Reaktion bestimmt.

2.3. Bestimmung des Tumornekrosefaktor-alpha (TNF- α) mittels ELISA

Zur Bestimmung des $\text{TNF-}\alpha$ -Gehalts der Zellüberstände wurde in dieser Arbeit die Methode des Sandwich-ELISA genutzt. Diese Methode basiert auf folgendem Prinzip: Ein für $\text{TNF-}\alpha$ spezifischer Antikörper (primärer AK) wird an einen festen Träger adsorbiert. An diesen Antikörper lagert sich das Antigen ($\text{TNF-}\alpha$) der Probenlösung an, und der Probenrest wird abgewaschen. Anschließend wird ein an ein Enzym gekoppelter zweiter Antikörper (sekundärer AK) zugesetzt, welcher sich an jedes im Erstschrift fixierte Antigen-Molekül ($\text{TNF-}\alpha$) lagert. Der Rest wird gewaschen. Die Enzymaktivität des über AK-AG-AK (Sandwich-Technik) mit dem Träger verbundenen Enzyms wird nach Zugabe des entsprechenden Substrates photometrisch gemessen. Die Messdaten der im Versuch mitgeführten

Standardlösungen werden genutzt um eine Eichkurve als Funktion der Antigenkonzentration zu erstellen, aus der die Konzentration des Antigens in der Testlösung berechnet werden kann.

Ablauf:

1) Bindung des primären Antikörpers

- Der TNF- α -Antikörper wurde mit dem Coating-Puffer 1:250 zu einer Endkonzentration von 5 μ g/ml verdünnt.
- 50 μ l dieser Lösung wurden pro Well auf eine 96-well-ELISA-Platte pipettiert und über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert. Um die Verdunstung der Lösung zu verhindern wurden die Platten mit Folie abgedeckt.
- im Anschluss an die Inkubation wurden die Platten am nächsten Morgen mit Waschpuffer 3 mal ausgewaschen, wobei jedes Well vollständig mit Waschpuffer gefüllt, und auf einem Papiertuch kräftig ausgeschlagen wurde.

2) Blockierung

- Die Platten wurden mit 250 μ l Waschpuffer pro Well gefüllt und für 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert; darauf erfolgten erneut 3 Waschschritte.

3) Bindung

- 2,5 μ l des Zellkulturüberstandes wurden mit 47,5 μ l (1:20 Verdünnung) Assay Diluent im well verdünnt.
Anschließend wurde als Standard 50 μ l/Well einer Verdünnungsreihe von TNF- α (in Assay Diluent gelöst) aufgetragen. Sowohl die Proben, als auch die Standardlösungen wurden als Triplikate appliziert. Es folgte eine Inkubation für 2 Stunden bei Raumtemperatur auf dem Schüttler.

4) Sekundärer Antikörper

- Nach 5 Waschgängen wurden pro well 50µl des biotinylierten anti Maus-TNF- α Antikörpers (1:250 Verdünnung in Assay Diluent) zugegeben. Ebenfalls 1:250 in Assay Diluent verdünnt wurden 50µl pro well der Avidin Peroxidase auf die Platte pipettiert. Die Platte wurde erneut mit einer Folie bedeckt und für 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert.

5) Farbreaktion

- Die Platten wurden vor der Auftragung der Substratlösung erneut 7 mal gewaschen. 50 µl Substratlösung wurden pro well aufgetragen und die Platten im Anschluss daran für 30 Minuten unbedeckt im Dunkeln gelagert.

6) Reaktionsstopp

- Die Farbreaktion wurde durch Zugabe von 50µl Stopp-Lösung pro Well gestoppt. Die Farbe der Lösung in den Wells wechselte dabei von blau nach gelb.

7) Auswertung

- Die Extinktion wurde im Photometer bei einer Wellenlänge von 450 nm gegen eine Referenzwellenlänge von 550 nm gemessen. Der ELISA-Reader erstellte anhand der Standardverdünnungsreihe eine Eichkurve und ordnete den Extinktionen der Proben die jeweilige TNF- α Konzentration zu.

2.4. Nachweis der Stickstoffmonoxid-Produktion der Makrophagen

Der Nachweis der NO-Produktion durch Makrophagen wurde in dieser Arbeit mit Hilfe der Reaktion nach Griess durchgeführt. NO selbst ist sehr instabil und kurzlebig, wodurch der direkte Nachweis von NO schwierig ist. Bei der Griess- Reaktion nutzt man die Eigenschaft von NO in Anwesenheit von Wasser und Sauerstoff stabile

Nitrite (NO_2^-) und Nitrate (NO_3^-) zu bilden. Das stabile NO_2^- wird in der Griess Reaktion mittels einer spektralphotometrischen Messung quantitativ nachgewiesen. Das Prinzip dieser Methode besteht darin einen Azofarbstoff zu messen, der durch Diazotierung eines aromatischen Amins und Kupplung mit einem zweitem Amin entsteht. NO_2^- diazotiert dabei Sulfanilamid in schwach saurem Milieu. Naphthylethylenediamine (NEDDC) dient als Kupplungsreagenz, das mit dem Diazotierungsprodukt einen Azofarbstoff bildet, welcher bei einer Wellenlänge von 540 nm photometrisch messbar ist. Der Griess-Test wurde nach folgendem Schema durchgeführt:

Zunächst wurde eine NaNO_2 Standardverdünnungsreihe hergestellt. Folgende Konzentrationen wurden dabei berücksichtigt: 100 μM , 50 μM , 25 μM , 12,5 μM , 6,25 μM und 3,125 μM . Die Verdünnung wurde mit RPMI 1640 Medium durchgeführt. Sowohl die Standardverdünnungen als auch die Proben wurden a 50 μl pro well auf der Platte verteilt. Dabei wurden für jeden Standard- und Probenwert Dreieransätze(Triplikate) pipettiert.

Die Griess A- und Griess B-Lösung wurden zu gleichen Teilen gemischt., wodurch die Lösung C entsteht (1% Sulfanilamide, 0,3% NEDDC, 2,5% H_3PO_4). Nach Erwärmung dieser Lösung auf 37,5° C wurden 50 μl pro well auf die Mikrotiterplatte überführt, und somit mit den Standardverdünnungen bzw. den Zellkulturüberständen vermischt.

Anschließend wurde bei einer Wellenlänge von 540 nm die optische Dichte der erhaltenen Lösung photometrisch im ELISA-Reader gemessen. Anhand der auf jeder Platte mitgeführten Standardkurve wurden die absoluten NO_2^- Konzentrationen in μM ermittelt.

2.5. Bestimmung der metabolischen Aktivität von Zellen

Der von Mosmann 1983 eingeführte MTT-Test ist ein colorimetrisches Nachweisverfahren zur Ermittlung der Zellvitalität. Das Prinzip dieses Testes beruht auf der Umsetzung des Tetrazoliumfarbstoffes MTT zu einem wasserunlöslichen blauen Produkt. Die Umsetzung wird durch mitochondriale Dehydrogenasen katalysiert, deren energieabhängige enzymatische Aktivität mit der Vitalität von Zellen korreliert. Das Enzymprodukt Formazan wird mit Hilfe organischer Lösungsmittel, wie SDS und DMF, gelöst. Durch gleichzeitige Lyse der Zellen kann

die Intensität der Färbung bei 570 nm mittels ELISA-Reader gemessen werden und so auf den Vitalitätsgrad der Zellen geschlossen werden.

Durchführung:

Am Ende der Inkubationszeit wurde den kultivierten Zellen in einem Restvolumen von 80µl Zellen pro well 20µl des MTT-Reagenz (5mg/ml) zugegeben. Die Konzentration des MTT-Reagenz pro well betrug somit 1mg/ml. Nach vier Stunden Inkubation bei 37°C folgten die Abnahme von 50µl des Zellüberstandes und die Zugabe von 150µl 10%igen SDS pro well. Die Platte wurde anschließend über Nacht bei 37°C inkubiert. Am nächsten Tag erfolgte dann die Messung der optischen Dichte bei 570 nm Mittels ELISA-Reader. Die Proben wurden gegebenenfalls vor der Messung noch mit PBS verdünnt.

2.6. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Mittels dieses Analyseverfahrens kann die Größe von Proteinen ermittelt werden.

Auf Grund ihrer Aminosäurezusammensetzung besitzen Proteine eine positive oder negative Nettoladung. Wird ein elektrisches Feld an eine Proteinlösung angelegt, so wandern die Proteine mit einer bestimmten Geschwindigkeit innerhalb dieses elektrischen Feldes. Wie schnell die Proteine dabei wandern hängt von der Nettoladung, Größe und Gestalt ab.

Bei diesem Verfahren wandern die Proteine in einer inerten Matrix aus stark vernetzten Polyacrylamidmolekülen. Die Zusammenlagerung dieser Moleküle kann variiert werden, so dass Gele mit definierter Porengröße hergestellt werden können.

Im Probenpuffer sind oftmals Substanzen enthalten, die die natürliche Konformation der Proteine lösen, um eine genauere Charakterisierung des Proteins zu ermöglichen. Zu diesen Substanzen zählen sowohl das Natriumdodecylsulfat (SDS) als auch das Mercaptoethanol. Das stark negativ geladene SDS bindet an die hydrophoben Regionen des Proteins, wodurch die Proteinuntereinheiten voneinander abdissoziieren. β -Mercaptoethanol hingegen spaltet Disulfidbrücken zwischen einzelnen Proteinen.

Die Elektrophorese wurde in folgenden Arbeitsschritten durchgeführt:

Das 0,75mm dicke SDS-Gel wurde mit Hilfe einer speziellen Halterung der Firma Biorad (Minden, Deutschland) zwischen 2 Glasplatten gegossen. Das Laufgel ist aus 2 unterschiedlichen Gelen zusammengesetzt. Dabei nimmt das sogenannte „untere

Gel“ (weil dieses zuerst in die Halterung gegossen wird und somit unten liegt) ca. 2/3 des Gesamtgels ein. Unmittelbar nachdem das untere Gel zwischen die Glasplatten gegossen wurde, wurde es mit Butanol überschichtet, um Luftblasen zu entfernen und eine bessere Polymerisation zu gewährleisten.

Nach 30 Minuten Inkubationszeit war das untere Gel soweit polymerisiert, dass nach Abschütten des Butanols das obere Gel auf das untere gegossen werden konnte. Anschließend wurde ein Kamm in das obere Gel eingeführt, um so die Geltaschen, in welche später die Proben gefüllt werden sollten, zu fertigen. Zur vollständigen Polymerisation wurde das Gel bei 4° C über Nacht gelagert. Nach Entfernung des Kammes am nächsten Tag wurden die Geltaschen vorsichtig mit Milli-Q-Wasser gespült und daran anschließend mit den Proteinproben geladen (10µl/Geltasche). Als Standard diente eine 10 kDa Proteinleiter (10-200 kD) (Gibco BRL). Kurz darauf wurde die Elektrophoresekammer mit 1x Laufpuffer gefüllt und die Elektrophorese bei 90 V für ca. 2 Stunden gestartet.

Nach Ablauf der Elektrophorese folgte der Proteinnachweis durch folgende Methoden:

2.6.1. Proteinfärbung nach Coomassie

Diese Färbemethode dient dem Proteinnachweis in Polyacrylamid-Gelen. Unmittelbar nach der Elektrophorese wurde das Gel für 20 Minuten bei Raumtemperatur in einer Coomassie-Farbstofflösung gelagert. Unspezifisch gebundene Farbstoffmoleküle konnten anschließend durch Entfärbungslösung vom Gel entfernt werden.

Das Prinzip dieser Proteinfärbung beruht auf der Interaktion des Coomassie-Farbstoffes mit den Aminogruppen der Proteine. Grundlage dieser Interaktion ist die elektrostatische Anziehung zwischen den sauren Farbstoffmolekülen und den basischen Aminogruppen der Proteine.

2.6.2. Western Blotting

Ein spezifisches Protein kann in Gelen durch die Markierung mit einem Antikörper nachgewiesen werden. Dabei ist der Antikörper oftmals an ein radioaktives Isotop, einen Fluoreszenzfarbstoff oder wie in dieser Arbeit an ein Enzym gekoppelt. Diese Antikörperbindung wurde durchgeführt, nachdem die im Gel getrennten Proteine auf

ein Blatt Nitrocellulose-Papier (durch „blotting“=Abklatschen) übertragen wurden. Diese Proteinnachweismethode wird *Western Blotting* genannt.

Nach Beendigung der Elektrophorese wurde das untere Gel nach Entfernung der Glasscheiben in Blotting-Puffer gegeben. Das obere Gel wurde verworfen.

Zur Übertragung der Proteine vom Gel auf eine Nitrozellulose-Membran (Hybond ECL Membran/ Boehringer Mannheim) wurde der Blot in Blotting-Puffer wie folgt zusammengesetzt:

- 2 Schichten Watman Papier
- Gel
- Hybond-Membran
- 2 Schichten Watman Papier

Der Blot wurde in einer speziellen mit Blotting-Puffer gefüllten Kammer (Biorad) fixiert und unter Rühren bei 4°C und 90V für 1 Stunde gebloftet.

Die Effektivität des Proteintransfers wurde durch eine Färbung der Nitrozellulosemembran mit Ponceau S beurteilt. Dabei wurde die Membran 2 Minuten mit Ponceau S gefärbt und anschließend 3x mit TBS Tween 20 für je 2 Minuten gewaschen.

Nachweis der Proteine auf der Nitrozellulosemembran

Die transferierten Proteine wurden mit Hilfe der ECL-Methode (enhanced chemiluminescence; Whithead et al. , 1979) auf der Nitrozellulosemembran nachgewiesen. Grundlage dieser Methode ist das Prinzip der Lumineszenz. Bei der Rückkehr angeregter Atome in ihren Ruhezustand setzen diese Energie frei. Diese Energie wird unter anderem in Form von elektromagnetischer Strahlung abgegeben und kann zum Beispiel mit Hilfe eines Lumineszenz-Imager gemessen werden.

Die Anregung bei der ECL-Methode beruht auf der Oxidation von Luminol durch Peroxidase in Anwesenheit von Hydrogenperoxid. Nach der Oxidation befindet sich Luminol im angeregten Zustand, der durch Lichtemission der Wellenlänge 428nm abklingt.

Zur Vermeidung von unspezifischer Antikörperbindung wurde die Membran nach dem Blotten mit 5% Trockenmilchpulver in 1xTBS für 30min bei Raumtemperatur geblockt. Daran anschließend wurde die Membran mit dem jeweilig spezifischen

Primärantikörper über Nacht bei 4°C inkubiert. Der Primärantikörper war in 0.5%iger Trockenmilchlösung mit 1xTBS im Verhältnis 1:1000 verdünnt. Die Funktion dieses Antikörpers ist die spezifische Proteinbindung auf der Nitrozellulosemembran.

Nach Ablauf der Inkubation erfolgte die Reinigung der Membran für 3x 10 min in TBS Tween 20. Der mit Peroxidase konjugierte Sekundärantikörper wurde ebenfalls im Verhältnis 1:1000 verdünnt und mit der Membran für 45 min inkubiert. In der Zwischenzeit wurde das ECL-Detectionskit (BM Chemiluminescence, Boehringer Mannheim) vorbereitet. Hierzu wurden die Komponenten im Verhältnis 1:1000 gemischt und bei Raumtemperatur für 30 min in Dunkelheit gelagert.

Nach drei weiteren Waschschritten in TBS Tween 20 wurde die Membran für 1 min mit der ECL-Detektionslösung inkubiert und die Lumineszenz anschließend mittels des Lumineszenz-Imagers ermittelt.

2.7. Limulus Amöbozyten Lysat Test

Dieser Test dient dem quantitativen Nachweis von bakteriellem Endotoxin in Lösungen. Es handelt sich dabei um eine colorimetrische Messung, welche nach folgendem Prinzip abläuft:

Das in der Wand von gram-negativen Bakterien vorhandene Lipopolysaccharid katalysiert die Aktivierung eines Proenzym, das in dem Limulus Amöbozyten Lysat (LAL) enthalten ist. Die Menge an aktiviertem Proenzym ist dabei abhängig von der Konzentration des bakteriellen Lipopolysaccharids in der zu untersuchenden Lösung. Das aktivierte Enzym katalysiert nun die Abspaltung von p-nitroaniline (p-NA) von dem farblosen Substrat Ac-Ile-Glu-Ala-Arg-pNA. Durch diese Abspaltung entsteht eine Gelbfärbung der Substratlösung, welche photometrisch bei einer Wellenlänge von 405-410nm quantifiziert werden kann. Dabei ist das Verhältnis zwischen der Farbintensität und Endotoxinkonzentration in dem Bereich zwischen 0,1 und 1,0 Endotoxin-Einheiten (EU) pro ml linear. Die Endotoxinkonzentration der Proben wird durch den Vergleich der Absorptionswerte der Proben mit denen definierter Standardlösungen ermittelt.

Der Versuchsablauf ist durch die folgende Vorgehensweise gekennzeichnet: Die zu untersuchende Probe, bzw. Standardlösung wird mit dem LAL gemischt und für 10 min bei 37 C inkubiert. Anschließend wird diesem Gemisch die Substratlösung beigefügt. Nach einer weiteren Inkubationsphase von 6min Dauer wird die Reaktion

durch die Zugabe der Stopplösung beendet. Falls die Probenlösung Endotoxin enthält, ist die Entwicklung eines gelben Farbtones erkennbar. Die Absorption der Probe wird nun bei einer Wellenlänge von 405-410nm photometrisch ermittelt. Da die Absorption der Endotoxinkonzentration direkt proportional ist, kann anhand der Standardkurve die Endotoxinkonzentration in der Probe errechnet werden.

2.8. Statistik

Alle Ergebnisse sind als Mittelwerte + Standardabweichung dargestellt. Die Signifikanzberechnung erfolgte mit dem gepaarten Student' t-Test. Ein Unterschied konnte als signifikant betrachtet werden, wenn für die Irrtumswahrscheinlichkeit $p < 0,05$ erfüllt war.

Ergebnisse

1. Humanes Hitzeschockprotein 60 (huHSP60)

1.1. Charakterisierung der eingesetzten HSP 60 Präparation

In den ersten Versuchen meiner Arbeit sollte untersucht werden, welche Effekte huHSP 60 auf die Aktivität von Mausmakrophagen der J774-Zelllinie besitzt. Anhand der SDS-Page-Gelelektrophorese und der Westernblot-Analyse sollte zunächst das humane rekombinante HSP60-Präparat analysiert werden. Dazu wurden denaturiertes huHSP60 sowie zum Vergleich andere denaturierte Proteine und ein Molekulargewichtsmarker auf ein 8%iges SDS-Gel aufgetragen. HuHSP60 wurde in den Konzentrationen 250 und 500ng/10µl auf das Gel geladen. Die anderen beiden Proteine OVA und BSA wurden mit 500ng/10µl eingesetzt. Im Anschluss an die Elektrophorese erfolgte die Proteinfärbung nach Coomassie, wodurch die Proteine im SDS-Gel zur Darstellung gebracht wurden. Bei Betrachtung der Proteinbanden (siehe Abbildung 3.1.) zeigt sich, dass huHSP60 und BSA vergleichbar weit im Gel wanderten. In Bezug auf den Molekulargewichtsmarker stellten sich die Banden von huHSP60 und BSA im Bereich der 60 Kilodaltonbande dar. Die huHSP60-Bande mit 250ng/10µl färbte sich dabei deutlich schwächer als die 500ng/10µl Bande. Im Vergleich zu huHSP60 und BSA, wanderte das kleinere OVA erwartungsgemäß schneller im Gel und seine Bande trat folglich weiter unten im Bereich von 30 Kilodalton auf.

Das Auftreten einer einzigen Bande bei 60 kDa bestätigt, dass huHSP60 in seiner denaturierten Form ein Molekulargewicht von etwa 60 Kilodalton aufweist, was der zu erwarteten Größe eines Monomers entspricht. Eine Zusammensetzung des huHSP60 aus unterschiedlichen molaren Untereinheiten ließe zusätzliche Banden vermuten. Des weiteren konnte gezeigt werden, dass das verwendete huHSP60 nicht mit anderen Proteinen verunreinigt ist. Dies ist aus der Betrachtung der Laufspur des huHSP60 ersichtlich. Hier ist lediglich die bereits beschriebene Bande im Bereich von 60 Kilodalton sichtbar. Eine Verunreinigung des huHSP60 mit anderen Proteinen ließe sich anhand zusätzlicher Banden erkennen.

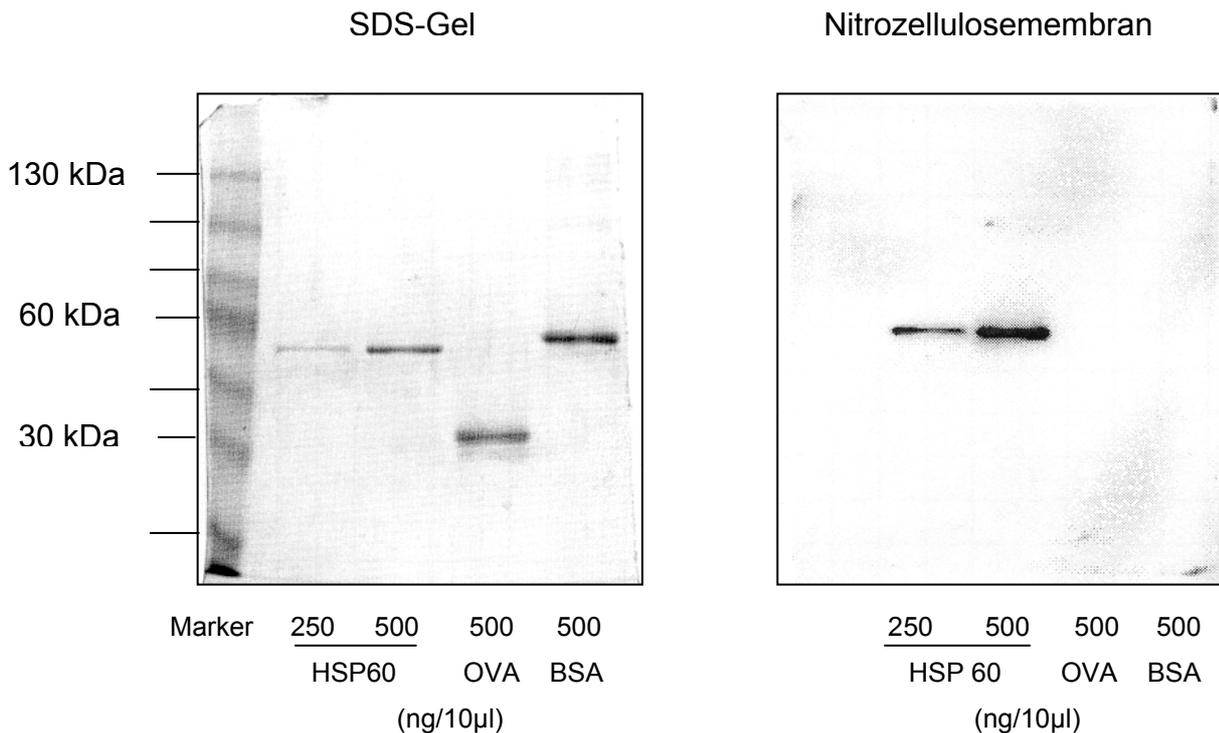


Abb. 3.1.: Humanes HSP 60 im Vergleich zu BSA und OVA in der SDS-Page-Gelelektrophorese und der Westernblot-Analyse. Das huHSP 60 wurde in den Konzentrationen 250 und 500 ng/10 μ l, BSA und OVA jeweils in 500 ng/10 μ l eingesetzt.

Mit Hilfe der Westernblot-Analyse sollte das huHSP60 weiter charakterisiert werden. Erneut wurde das huHSP60 im Vergleich zu den Proteinen OVA und BSA betrachtet. Es zeigte sich, dass huHSP60 als einziges Protein von dem spezifischen anti-HSP 60 Antikörper auf der Nitrozellulosemembran detektiert wurde. Dabei stellten sich beide HSP60-Banden deutlich auf der Nitrozellulosemembran dar. Erwartungsgemäß zeigte sich dabei die Bande mit der höheren HSP60 Konzentration (500 ng/10 μ l) deutlich prominenter als die Bande mit der halben Konzentration (250 ng/10 μ l). Weder BSA noch OVA konnten mittels dieses Antikörpers im Western Blot nachgewiesen werden. Durch diesen Versuch konnte das eingesetzte huHSP60 durch den spezifischen anti-HSP 60 markiert, und somit zweifelsfrei als huHSP60 identifiziert werden.

1.2. Nachweis der stimulatorischen Wirkung von humanem HSP60 auf Zellen der J774 Mausmakrophagenlinie

Um die Wirkung von huHSP60 auf die Aktivität von Mausmakrophagen zu untersuchen, wurden diese mit steigenden Konzentrationen von huHSP60 (1;3;10 µg/ml) inkubiert. Als Negativkontrolle wurde RPMI 1640 Medium ohne Zusatz von Stimulantien mitgeführt. Zur Bestimmung der Zellaktivität diente die Messung der TNF- α - und Stickstoffmonoxidfreisetzung der Makrophagen. Dabei wurde nach sechsständiger Inkubation bei 37° C der TNF- α -Gehalt des Zellüberstandes mittels ELISA bestimmt. Der NO-Gehalt hingegen wurde erst nach 24 Stunden Inkubation mit Hilfe der Griess-Reaktion quantifiziert.

Abbildung 3.2. zeigt eine dosisabhängige Steigerung der TNF- α Produktion in Abhängigkeit von der eingesetzten huHSP60 Konzentration. Während die Inkubation der Zellen mit Medium alleine zu keiner wesentlichen TNF- α -Produktion führte, konnte bereits bei einer huHSP60 Konzentration von 1µg/ml ein TNF- α Gehalt von ca. $3,4\pm 0,4$ ng/ml im Zellüberstand nachgewiesen werden. Eine Steigerung der huHSP60 Konzentration auf 10µg/ml bewirkte eine Erhöhung der TNF- α Konzentration im Überstand auf ca. $26,0\pm 3,4$ µg/ml.

Die Konzentrationsabhängigkeit der stimulatorischen huHSP60-Wirkung spiegelte sich auch in der NO-Freisetzung der J774-Makrophagen wieder. Die als Negativkontrolle mitgeführte Medium-Behandlung ließ eine spontane NO₂⁻-Akkumulation von 1,6µM erkennen. Die Inkubation mit 1µg/ml huHSP60 führte nicht zu einer signifikanten Steigerung der NO₂⁻-Konzentration. Erst bei höheren huHSP60-Konzentrationen konnte ein deutlicher Anstieg beobachtet werden. So bewirkten 3µg/ml huHSP60 eine Erhöhung der absoluten NO₂⁻-Konzentration auf $14,5\pm 8,9$ µM, 10µg/ml HSP60 sogar eine Steigerung auf $41,1\pm 3,9$ µM. Diese Ergebnisse sind in Abbildung 3.2. graphisch dargestellt.

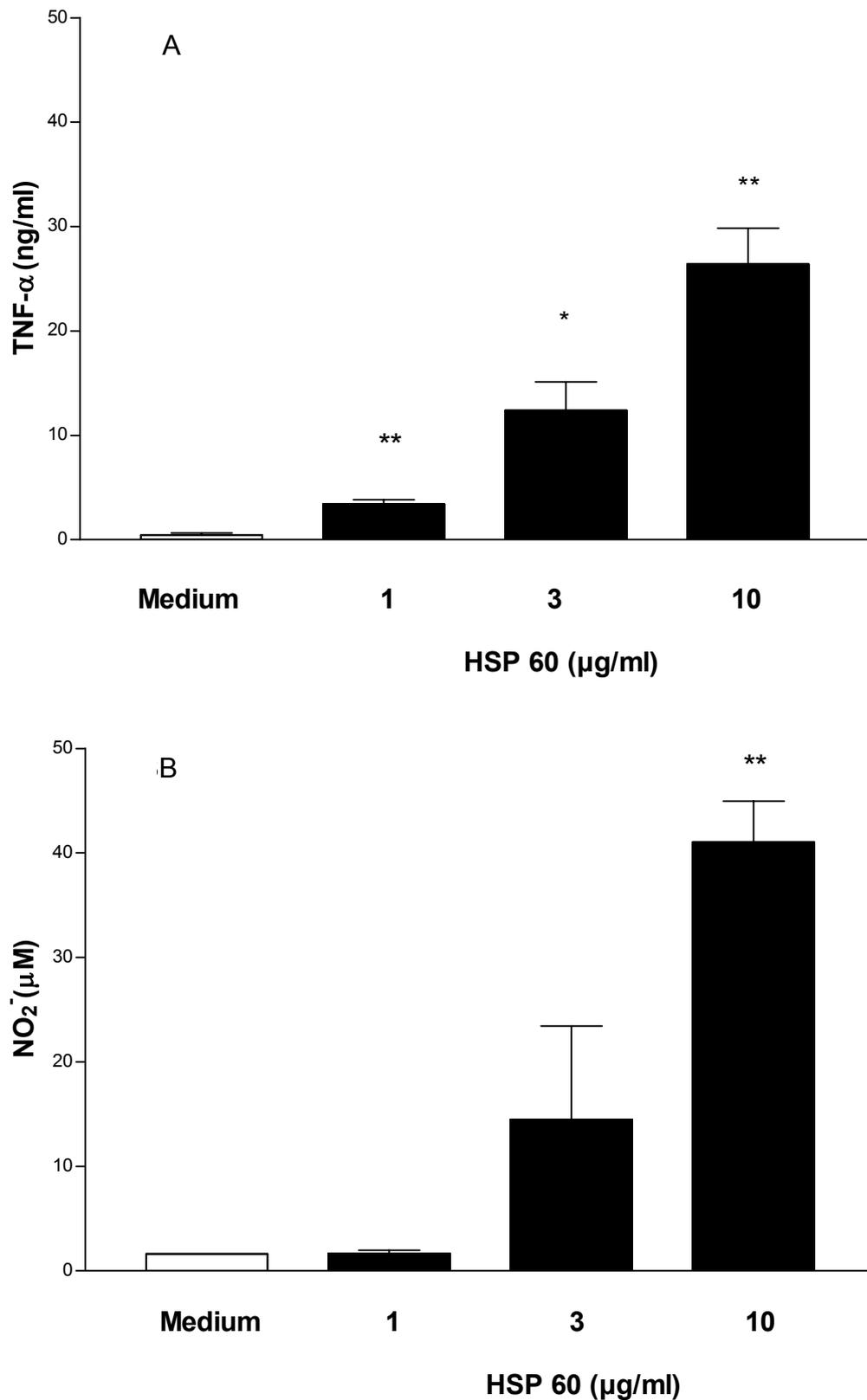
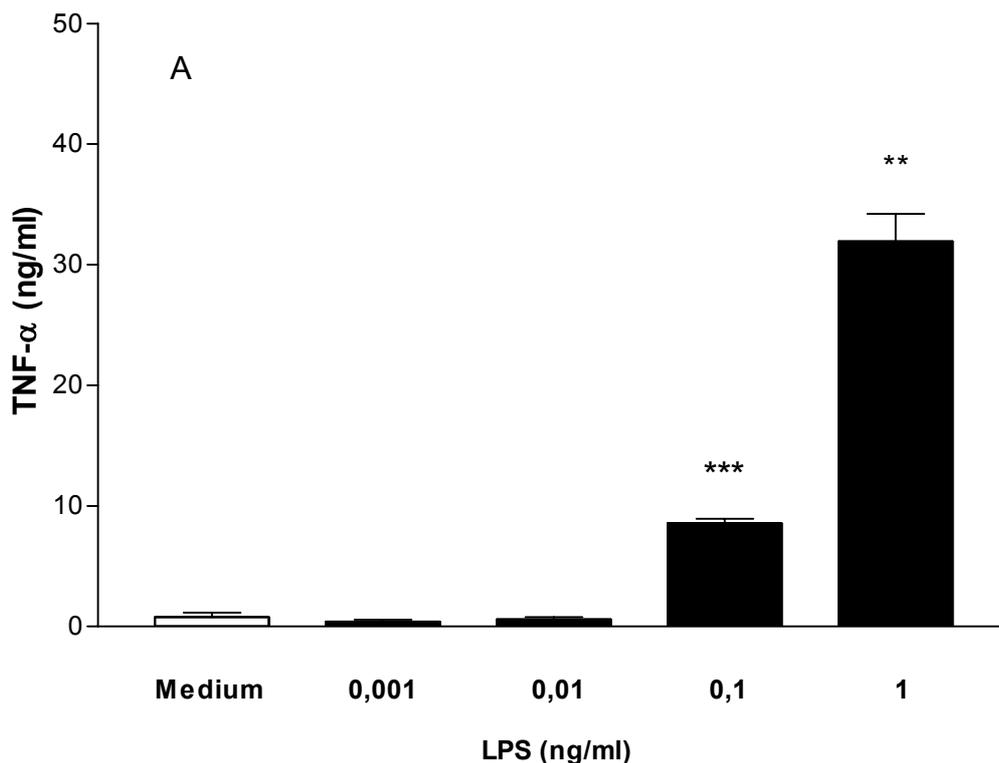


Abb. 3.2.: Effekt von huHSP 60 auf die TNF- α - (A) und NO-Freisetzung (B) von J774 Makrophagen im Vergleich zu Medium nach 6 h (TNF- α) bzw. 24 h (NO) Inkubationszeit. Die TNF- α -Konzentrationen wurden mittels ELISA und die NO₂⁻-Konzentrationen mittels Griess-Reaktion bestimmt. Die Zellen wurden mit huHSP 60 in den Konzentrationen 1, 3, und 10 µg/ml inkubiert. Dargestellt sind die Mittelwerte +S.D. von drei Bestimmungen. *:p < 0,05; **:p<0,01 im Vergleich zur Mediumkontrolle.

Diese Versuchsergebnisse zeigen einen signifikanten, konzentrationsabhängigen Anstieg der TNF- α - und NO-Freisetzung durch die Stimulation mit huHSP60 im Vergleich zur Mediumkontrolle. Neben dem huHSP60 wurden weitere Substanzen bezüglich ihrer Wirkung auf die Zellen der J774 Makrophagenlinie untersucht.

1.3. Bakterielles Lipopolysaccharid induziert die TNF- α - und NO-Produktion

Zur Untersuchung der Wirkung von LPS auf die Makrophagenaktivität wurden die Makrophagen mit LPS in den Konzentrationen 0,001; 0,01; 0,1 und 1 ng/ml inkubiert und anschließend der TNF- α - und NO₂⁻-Gehalt des Zellüberstandes bestimmt. Abbildung 3.3. zeigt die Ergebnisse dieser Untersuchung graphisch dargestellt. Während LPS in den Konzentrationen 1 ng/ml und 0,1 ng/ml zu einer signifikanten Steigerung der TNF- α -Produktion führte, zeigten die Konzentrationen 0,01 ng/ml und 0,001 ng/ml keinen signifikanten Unterschied zur Mediumkontrolle (Abb. 3.3. A)



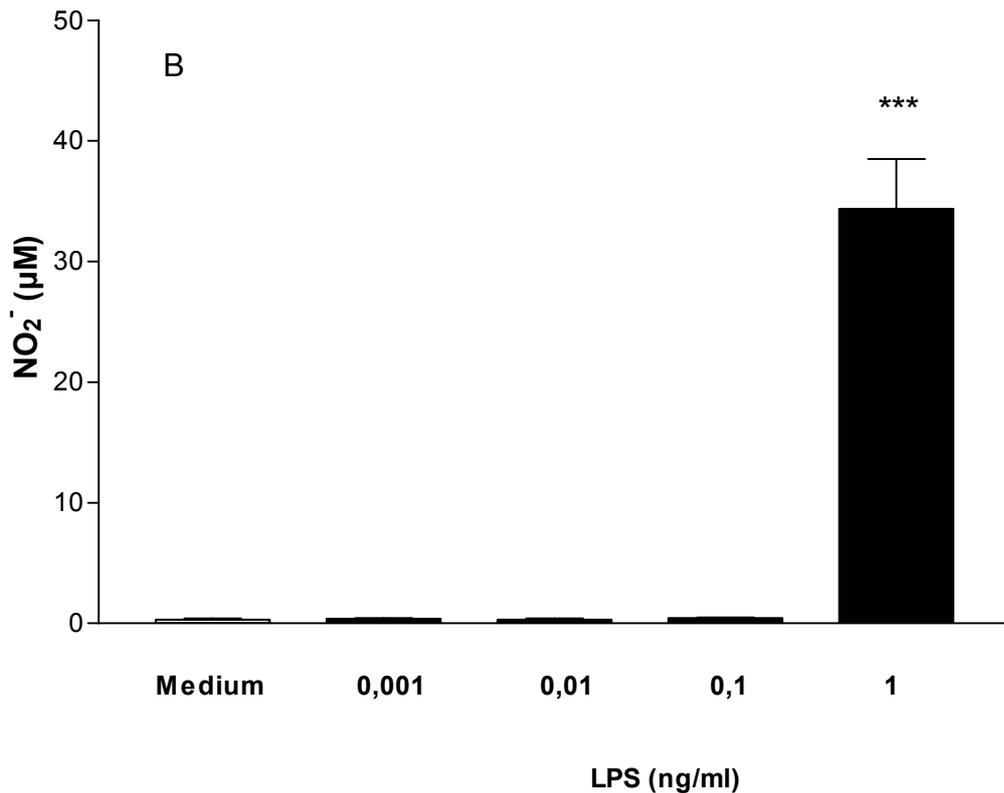


Abb. 3.3: Effekt von LPS auf die TNF- α - (A) und NO-Freisetzung (B) von Mausmakrophagen. J774 Mausmakrophagen wurden 6h (A) bzw. 24h (B) lang mit LPS in unterschiedlichen Konzentrationen (0.001, 0.01, 0.1 und 1ng/ml) inkubiert. Der TNF- α -Gehalt des Zellüberstandes wurde mittels ELISA, der NO₂⁻-Gehalt mittels der Griess-Reaktion bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte + S.D. von drei Bestimmungen. **:p < 0,01; ***: p < 0,001 im Vergleich zur Mediumkontrolle

Abbildung 3.3. B ist zu entnehmen, dass eine deutliche NO-Produktion der Mausmakrophagen erst ab einer LPS-Konzentration von 1ng/ml bestand. Bei dieser LPS-Stimulation wurde eine NO₂⁻-Konzentration von 34,4±4,1µM im Überstand gemessen. Die getesteten LPS-Konzentrationen unter 1ng/ml zeigten im Vergleich zur Mediumkontrolle keine gesteigerte NO-Produktion.

Diese Ergebnisse verdeutlichen, dass bakterielles LPS ebenfalls zu einer konzentrationsabhängigen Stimulation der Makrophagen führt.

1.4. Oligodesoxynucleotid (ODN) 1668

Das Oligodesoxynucleotid 1668 gehört zur Gruppe der CpG Oligodesoxynucleotide, die bereits in der Literatur als Makrophagen-stimulierende Substanzen beschrieben

wurden (Häcker et al., 1998). Tatsächlich bewirkte das ODN 1668 wie huHSP60 und LPS eine konzentrationsabhängige Stimulation der J774-Mausmakrophagen.

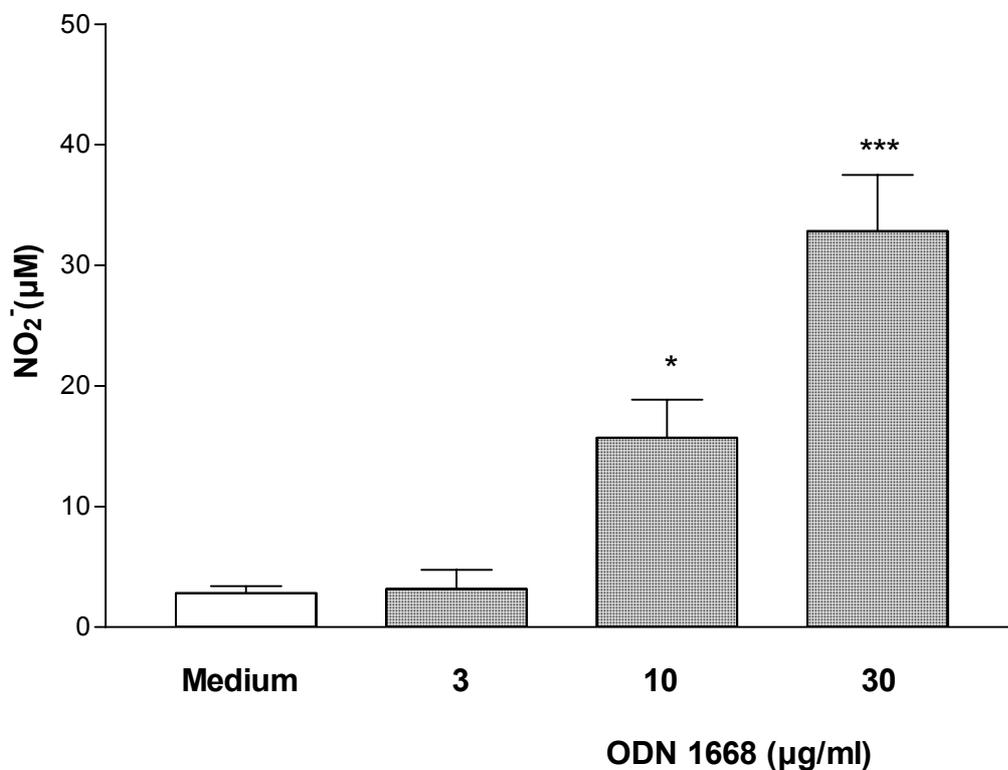
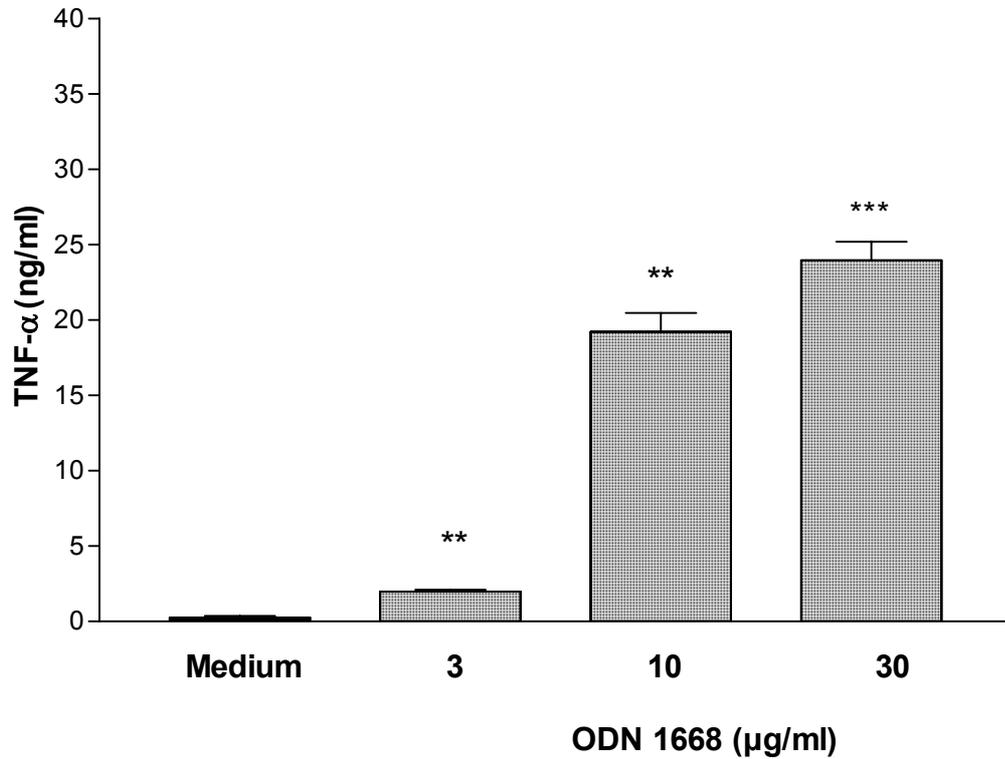


Abb. 3.4.: Wirkung von 1668 in den Konzentrationen 3, 10 und 30 μ g/ml auf die TNF- α - und NO-Produktion von J774 Mausmakrophagen. TNF- α wurde nach 6h Inkubation, NO₂⁻ nach 24 h Inkubation mit 1668 in den Zellüberständen bestimmt. Dargestellt sind hier die Mittelwerte + S.D. der absoluten TNF- α - und NO₂⁻-Werte von drei Bestimmungen. *:p < 0,05; ***:p < 0,001 im Vergleich zur Mediumkontrolle

Abbildung 3.4. stellt die absoluten TNF- α - und NO₂⁻-Werte dar, die nach der Stimulation mit ODN 1668 im Zellüberstand gemessen wurden. Der Versuchsablauf entsprach dabei dem der bisherigen Stimulationsversuche. Die produzierte TNF- α -Menge stieg von 1,9±0,1ng/ml bei 3 μ g/ml 1668 auf bis zu 23,9±1,2ng/ml bei 30 μ g/ml 1668. Auch die NO-Produktion erfuhr durch die Stimulation mit 1668 eine deutliche Steigerung. Zeigten 3 μ g/ml 1668 noch keinen wesentlichen Unterschied zur Mediumkontrolle, stieg die NO₂⁻-Konzentration bei 30 μ g/ml 1668 auf 32,8±4,6 μ M an.

Diese Ergebnisse veranschaulichen, dass humane Makrophagen durch Substanzen unterschiedlichster Stoffklassen zur Produktion und Sekretion von Zytokinen und Radikalen angeregt werden können.

Denkbar ist, dass die Wirkung von huHSP60 und 1668 auf eine Verunreinigung dieser Stoffe mit bakteriellem Endotoxin zurückzuführen ist. Um diesen möglichen Effekt genauer zu untersuchen, wurden die hier im folgendem beschriebenen Versuche mit Polymyxin B durchgeführt.

1.5. Einfluss von Polymyxin B auf die Zellstimulation mit huHSP 60, LPS und ODN 1668

Polymyxin B ist ein kationisches Polypeptid, welches an den Lipid-A-Rest des LPS bindet und dadurch die zellstimulatorische Wirkung des LPS verhindert.

Dank dieser Eigenschaft von Polymyxin B konnte es in diesem Versuch benutzt werden, um mögliche Kontaminationen der Stimulantien mit LPS aufzudecken. Zu diesem Zweck wurde Polymyxin B vor Zugabe zu den Zellen mit den Stimulantien LPS, huHSP60 und 1668 für 1h bei 4°C inkubiert. Dies ermöglichte dem Polymyxin B vorhandenes Endotoxin zu binden und dessen stimulatorische Wirkung zu blockieren. Polymyxin B wurde in diesem Versuch in den Konzentrationen 0,1; 1; 10; und 30 μ g/ml eingesetzt. Bei keiner dieser Konzentrationen zeigte Polymyxin B selbst eine stimulatorische Wirkung auf die Makrophagen (Daten nicht gezeigt). Die Stimulantien wurden in den folgenden Konzentrationen eingesetzt: LPS: 1, 10 und 1000 ng/ml; HSP60: 10 μ g/ml ; ODN 1668: 10 und 30 μ g/ml.

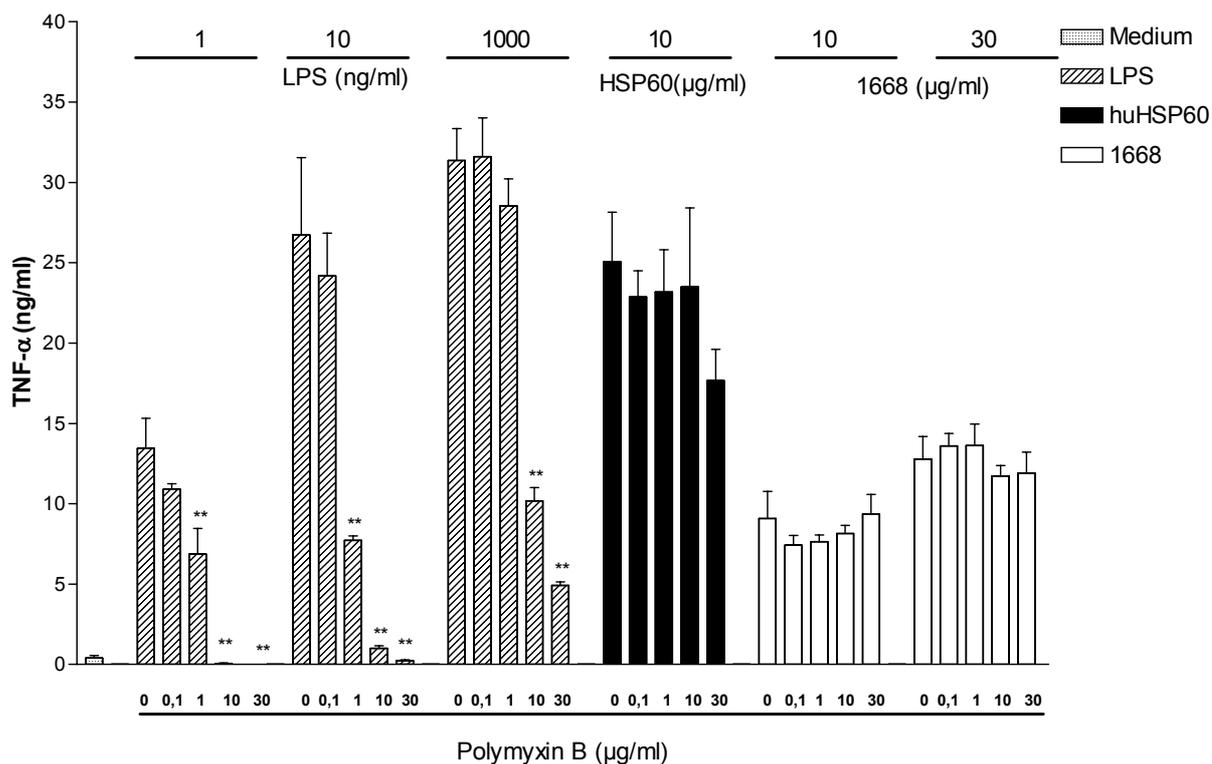


Abb.3.5.: Wirkung von Polymyxin B auf die Stimulation von Zellen der J774-Zelllinie mit LPS, huHSP60 und 1668. Polymyxin B wurde für 1h bei 4°C mit LPS, huHSP60 und ODN 1668 vorinkubiert und anschließend das Gemisch zu den Zellen gegeben. Der TNF- α -Gehalt des Überstandes wurde nach 6stündiger Inkubation bei 37°C mittels ELISA bestimmt. Hier dargestellt sind die Mittelwerte +S.D. aus drei Bestimmungen. **:p < 0,01 im Vergleich zum jeweiligen Ansatz ohne PmB.

Die Auswertung der TNF- α -Messung verdeutlichte den Effekt von Polymyxin B auf die LPS-Reaktivität (Abb.3.5.). Polymyxin B hemmte die LPS induzierte TNF- α -Produktion konzentrationsabhängig. Bei der Zellstimulation mit 1 und 10ng/ml LPS konnte ab einer Polymyxin-B-Konzentration von 10 μ g/ml eine fast vollständige, signifikante Hemmung der LPS-Reaktivität nachgewiesen werden. Selbst bei der hier eingesetzten maximalen LPS-Konzentration von 1000 ng/ml bewirkten 30 μ g/ml Polymyxin B noch eine Reduktion der TNF- α -Produktion um ca. 80%.

Die Wirkung des huHSP60 auf die J774 Mausemakrophagen konnte durch Polymyxin B nicht signifikant vermindert werden. Eine Kontamination des huHSP60 mit bakteriellem LPS ist in diesem Versuch somit nicht zu erkennen.

Die Wirkung von 1668 blieb durch Polymyxin B völlig unbeeinflusst. Dieses Ergebnis spricht gegen eine Verunreinigung des Oligodesoxynucleotides mit LPS.

Nachdem in den bisherigen Versuchen unter anderem gezeigt wurde, dass huHSP60 zu einer Aktivierung von Makrophagen führt, und dieser Effekt nicht auf eine Verunreinigung mit LPS zurückzuführen ist, sollte anschließend anhand von Inhibitionsexperimenten versucht werden, die Interaktion zwischen huHSP60 und den Makrophagen zu spezifizieren. Eine Vielzahl unterschiedlicher Substanzen wurde hinsichtlich ihrer Wirkung auf die Makrophagenreaktivität untersucht. Dabei wurden die Zellen zuerst mit den potentiellen Inhibitoren vorinkubiert, bevor die Stimulantien LPS, huHSP60 und ODN 1668 den Zellen zugesetzt wurden. Die Idee bei dieser Art von Versuch war es potentielle Interaktionsstellen des huHSP60 auf den Makrophagen mit den „Inhibitoren“ zu blockieren und so Informationen über die Interaktion zwischen huHSP60 und den Makrophagen zu erhalten. Die Ergebnisse sind im folgenden beschrieben.

2. Inhibitionsexperimente

2.1. Unspezifische Inhibition der Makrophagenaktivierung durch Mizoribin

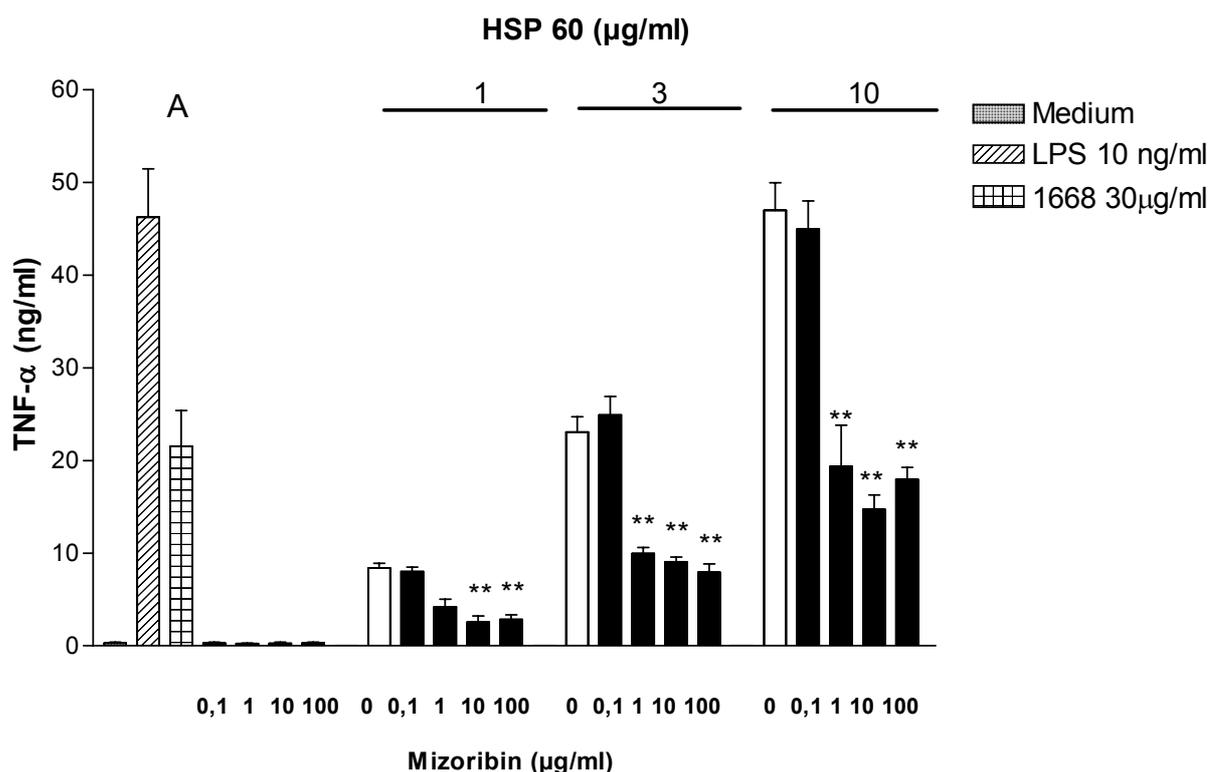
Mizoribin ist ein immunsuppressiver Wirkstoff, der die Zellproliferation durch Hemmung der *de novo* Purinsynthese unterdrückt. Dabei stellt Mizoribin einen kompetitiven Antagonisten der Inosin-Monophosphat-Dehydrogenase dar.

In der Literatur wurde kürzlich beschrieben, dass Mizoribin mit hoher Affinität an HSP60 bindet (Itoh et al. ,1999). In dem im folgenden beschriebenen Versuch wurde untersucht, ob Mizoribin die stimulatorische Wirkung von huHSP60, LPS oder ODN 1668 beeinflusst.

Um die Wirkung von Mizoribin auf die Makrophagenreaktivität zu untersuchen wurden die Zellen 15 Minuten bei Raumtemperatur mit Mizoribin in den Konzentrationen 0,1; 1; 10 und 100µg/ml vorinkubiert. Anschließend erfolgte die Stimulation der Zellen mit huHSP60 (1; 3; und 10µg/ml), LPS (1 ng/ml) und ODN 1668 (30 µg/ml). Diese zeitliche Abfolge wurde gewählt, um Mizoribin die Möglichkeit zu geben mit den Mausmakrophagen zu interagieren und eventuell potentielle Bindungsstellen für huHSP60 zu besetzen. Nach 6h Inkubation bei 37° C wurde die TNF-α-, nach 24h die NO-Konzentration im Zellüberstand bestimmt und anschließend der Einfluss von Mizoribin auf die Zellvitalität im MTT-Assay untersucht.

Abbildung 3.6. stellt die Zellreaktivität auf huHSP60 in Abhängigkeit unterschiedlicher Mizoribinkonzentrationen dar.

Mizoribin führte ab einer Konzentration von 1 $\mu\text{g/ml}$ zu einer, im Vergleich zur Negativkontrolle (huHSP60 ohne Mizoribin), zum Teil deutlichen und signifikanten Verminderung der TNF- α -Freisetzung durch die Mausmakrophagen. Dieser Effekt erschien umso eindrucksvoller, je höher die Konzentration von huHSP60 war. Die durch 10 $\mu\text{g/ml}$ huHSP60 induzierte TNF- α -Produktion wurde durch 100 $\mu\text{g/ml}$ Mizoribin deutlich gehemmt. Wurden ohne Mizoribin noch $47,0 \pm 2,9$ ng/ml TNF- α im Zellüberstand gemessen, nahm dieser Wert durch 100 $\mu\text{g/ml}$ Mizoribin auf $18,0 \pm 1,3$ ng/ml ab. Dies entspricht einer Reduktion um ca. 62%. Obwohl hier ein deutlicher Trend zu erkennen war, ließ sich die stimulatorische Wirkung des huHSP60 auch durch sehr hohe Mizoribinkonzentrationen nicht vollständig hemmen.



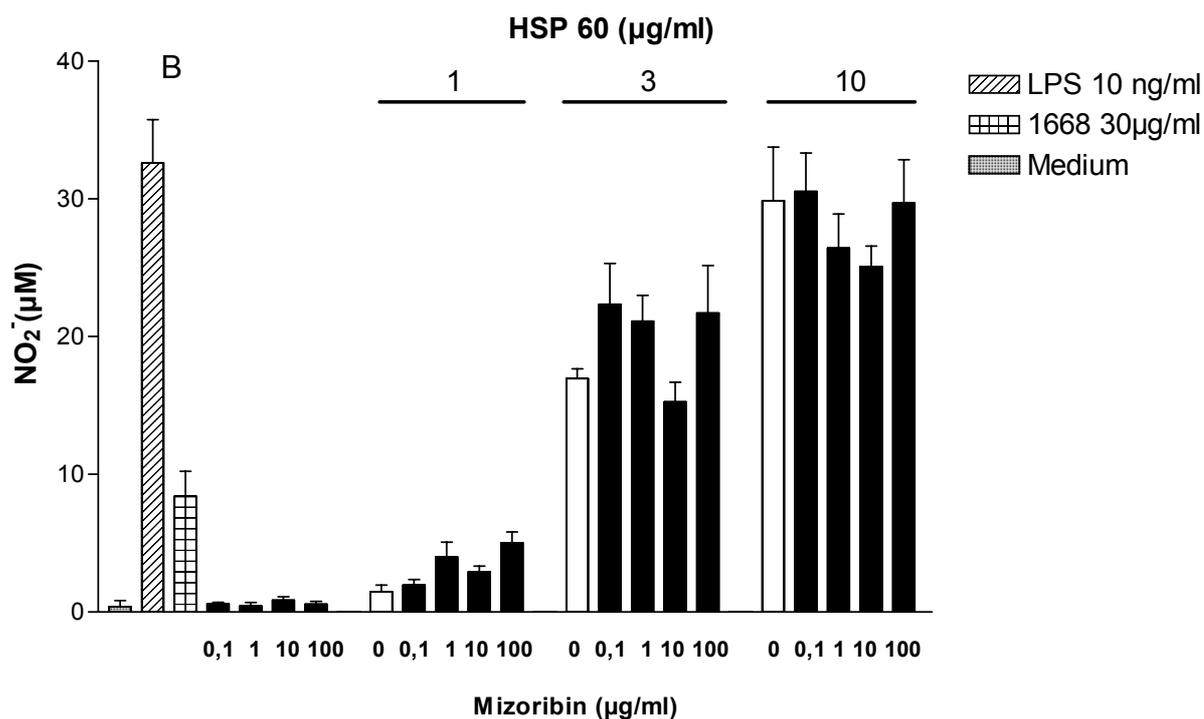


Abb.3.6.: Effekt von Mizoribin auf die Stimulation von J774 Mausmakrophagen mit huHSP60. Dargestellt sind die TNF- α - (A) und NO₂⁻-Werte (B). Der TNF- α -Gehalt wurde nach 6h Inkubation, der NO-Gehalt nach 24 h Inkubation mit huHSP 60 (1,3 und 10µg/ml) in den Zellüberständen bestimmt. Dargestellt sind hier die Mittelwerte + S.D. der absoluten TNF- α -Werte in ng/ml und die der NO₂⁻-Werte in µM von drei Bestimmungen. **:p < 0,01 im Vergleich zur Kontrolle ohne Mizoribin.

Der inhibitorische Effekt des Mizoribin war lediglich in den TNF- α -, nicht aber den NO₂⁻-Werten zu erkennen. Hier zeigte Mizoribin keinen signifikanten Einfluss (siehe Abb.3.6. B)

Abbildung 3.7. zeigt die TNF- α -Produktion der mit 1ng/ml LPS stimulierten J774 Mausmakrophagen in Abhängigkeit unterschiedlicher Mizoribinkonzentrationen. Während bei einer Mizoribinkonzentration von 0,1µg/ml kein bemerkenswerter Unterschied zur Negativkontrolle (LPS ohne Mizoribin) in der absoluten TNF- α Konzentration bestand ($31,3 \pm 2,0$ ng/ml zu $31,6 \pm 3,1$ ng/ml), führten höhere Mizoribinkonzentrationen zu einer signifikanten Reduktion der TNF- α -Produktion. Bei einer Mizoribinkonzentration von 100µg/ml produzierten die Makrophagen nur noch $15,2 \pm 3,7$ ng/ml TNF- α , was einer Verminderung der TNF- α -Menge um ca. 50 % im Vergleich zur Negativkontrolle entspricht.

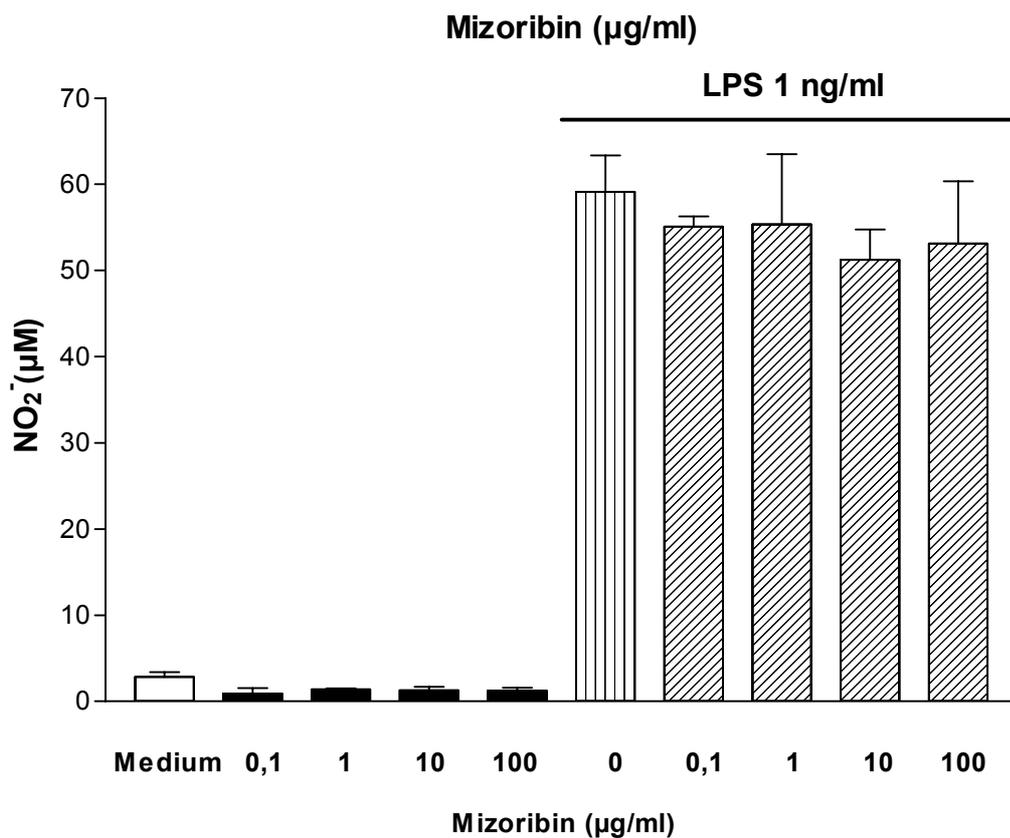
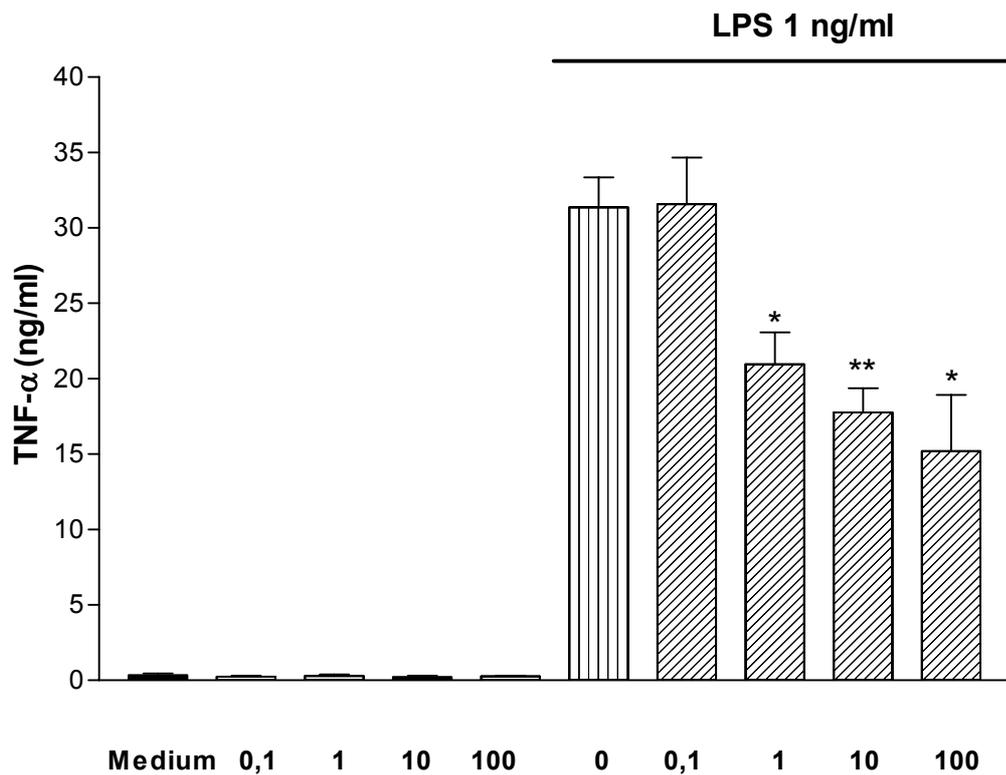
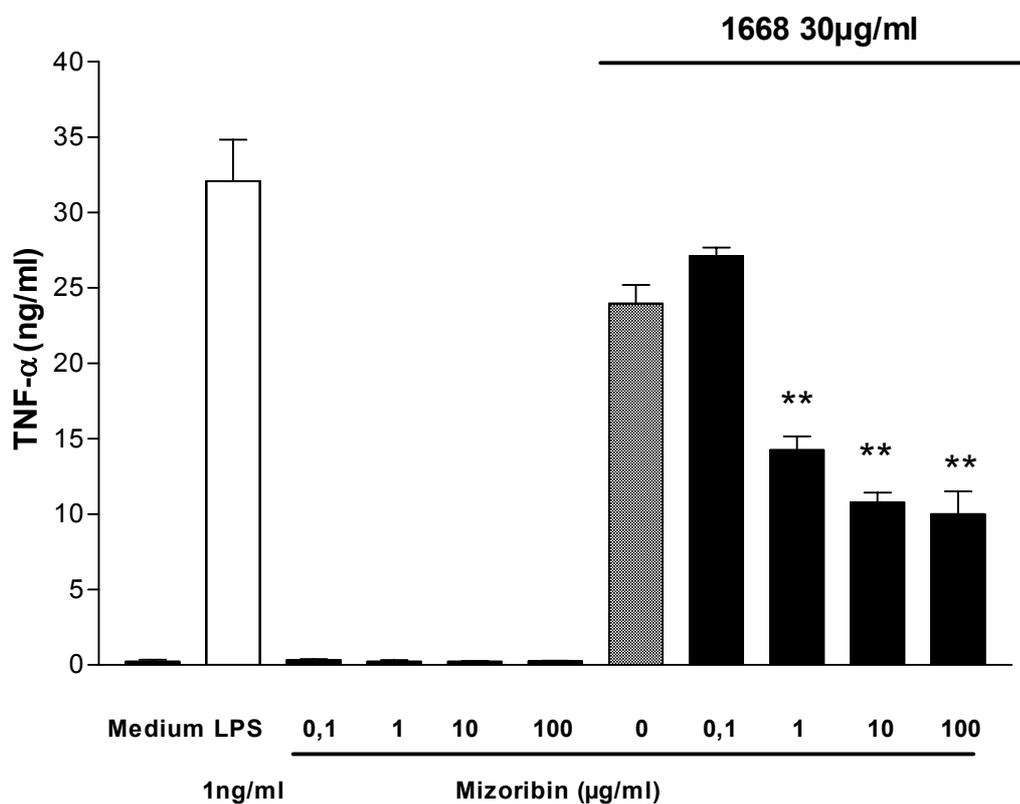


Abb.3.7.: Effekt von Mizoribin auf die Stimulation von J774 Mausemakrophagen mit LPS. Dargestellt sind die TNF- α - (A) und NO₂⁻- (B) Werte. Der TNF- α -Gehalt wurde nach 6h Inkubation, der NO₂⁻-Gehalt nach 24 h Inkubation mit LPS (1 ng/ml) in den Zellüberständen mittels ELISA (A) und der Griess-Reaktion (B) bestimmt. Dargestellt sind hier die Mittelwerte + S.D. der absoluten TNF- α -Werte in ng/ml und die der NO₂⁻-Werte in µM von drei Bestimmungen. *: p < 0,05; **: p < 0,01 im Vergleich zur Kontrolle.

Erneut war der inhibitorische Effekt des Mizoribin auf die TNF- α -Produktion beschränkt.

Dieses Ergebnis zeigte sich auch bei der Zellstimulation durch ODN 1668. Abbildung 3.8. verdeutlicht, dass Mizoribin die TNF- α -Produktion konzentrationsabhängig hemmte, die NO₂⁻-Produktion davon jedoch unbeeinflusst blieb.

Dabei wurde die TNF- α -Produktion erst ab einer Mizoribinkonzentration von 1 μ g/ml signifikant vermindert. Bei einer Konzentration von 100 μ g/ml zeigte sich eine Reduktion der TNF- α -Konzentration um ca. 59% von 23,9 \pm 1,2 ng/ml (ohne Mizoribin) auf 10,0 \pm 1,4ng/ml. Zur Kontrolle wurden die Zellen jeweils mit Medium und LPS, ohne Zusatz von Mizoribin inkubiert.



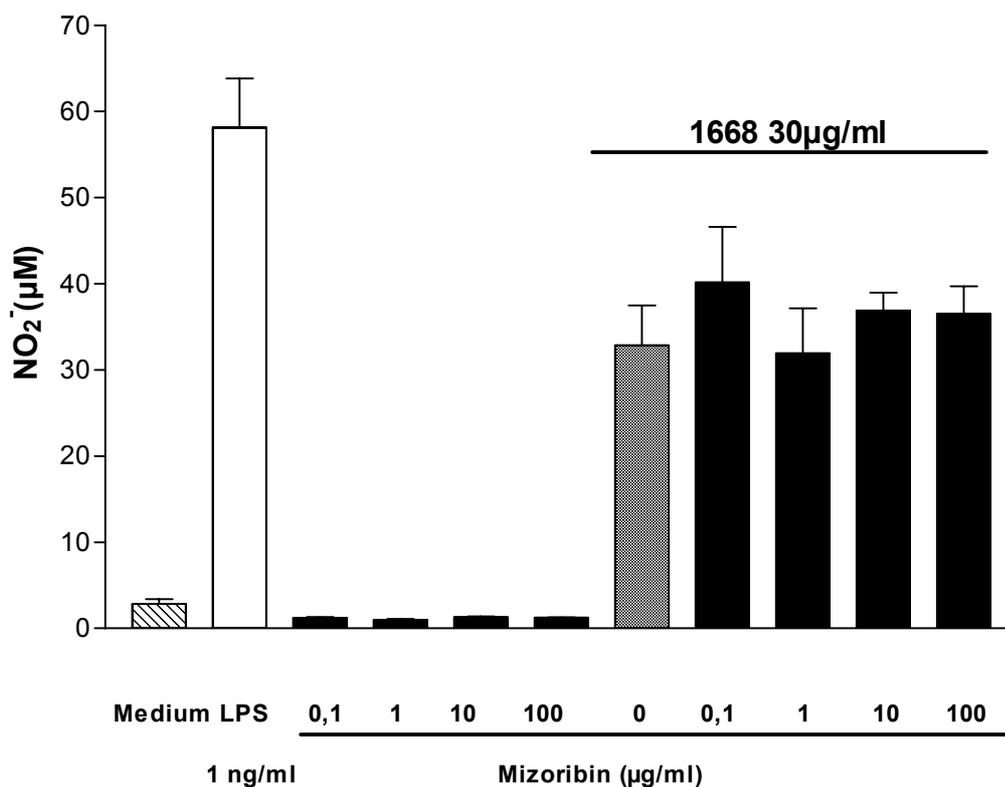


Abb. 3.8.: Effekt von Mizoribin auf die Zellstimulation mit ODN 1668. J774 Mausemakrophagen wurden mit steigenden Konzentrationen Mizoribin inkubiert und anschließend mit 30µg/ml ODN 1668 stimuliert. Dargestellt sind die TNF- α - (A) und NO₂⁻-Werte(B). Der TNF- α -Gehalt wurde nach 6h Inkubation, der NO₂⁻-Gehalt nach 24 h Inkubation in den Zellüberständen bestimmt. Hier dargestellt sind die Mittelwerte + S.D. der absoluten TNF- α -Werte in ng/ml und die der NO₂⁻-Werte in µM von drei Bestimmungen. TNF- α wurde mittels ELISA, NO₂⁻ mittels der Griess-Reaktion bestimmt. **:p < 0,01 im Vergleich zu ODN 1668 ohne Mizoribine

Der im Anschluss an die TNF- α - und NO₂⁻-Bestimmung durchgeführte MTT-Test ließ keine toxische Wirkung der eingesetzten Mizoribinkonzentrationen auf die Mausemakrophagen erkennen (Abb.3.9.)

Zusammenfassend zeigt sich, dass Mizoribin die Stimulation der Makrophagen durch huHSP60, LPS und ODN 1668 konzentrationsabhängig hemmt, dieses Ergebnis jedoch nur für die TNF- α -Produktion nachweisbar ist.

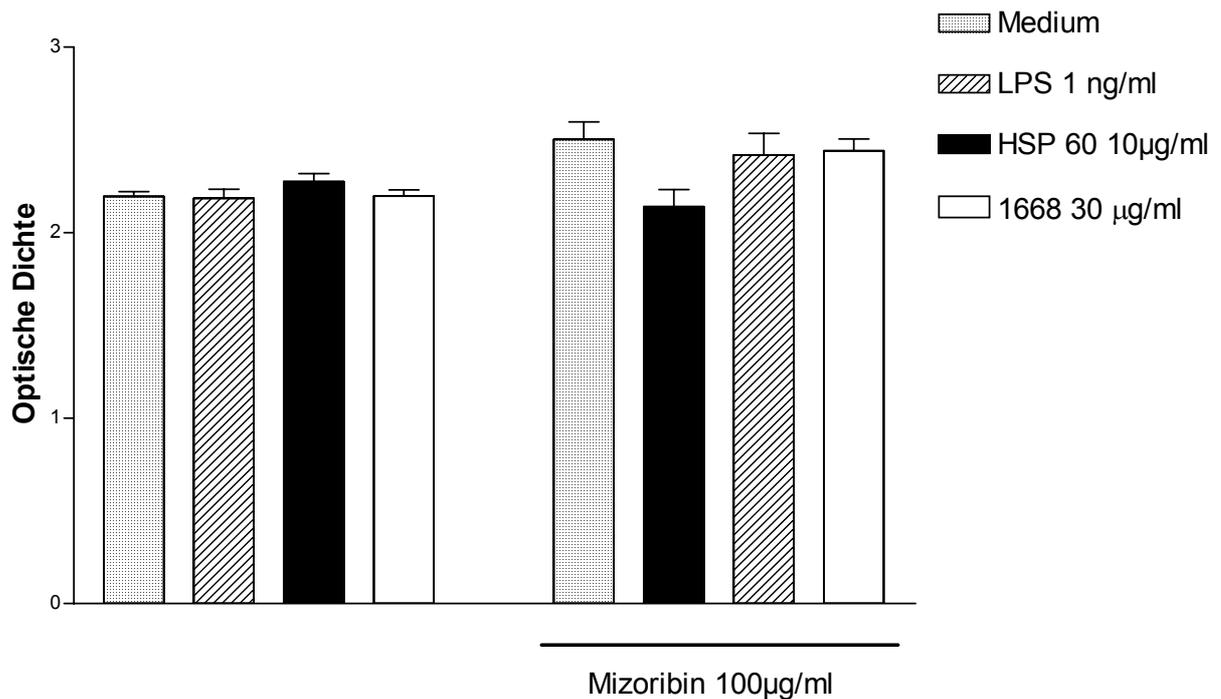


Abb. 3.9: Wirkung von Mizoribine auf die Vitalität der Mausmakrophagen. Die Graphik stellt die Optische Dichte der Zellysate stimulierter Zellen (LPS 1ng/ml; huHSP 60 10µg/ml und ODN 1668 30µg/ml) mit und ohne Zusatz von Mizoribine (100µg/ml) dar. Die Optische Dichte des Zellysates korreliert bei dem hier durchgeführten MTT-Test mit der metabolischen Aktivität der Zellen und ist somit ein Maß für deren Vitalität. Dabei steigt die Optische Dichte mit zunehmender metabolischer Aktivität der Zellen an.

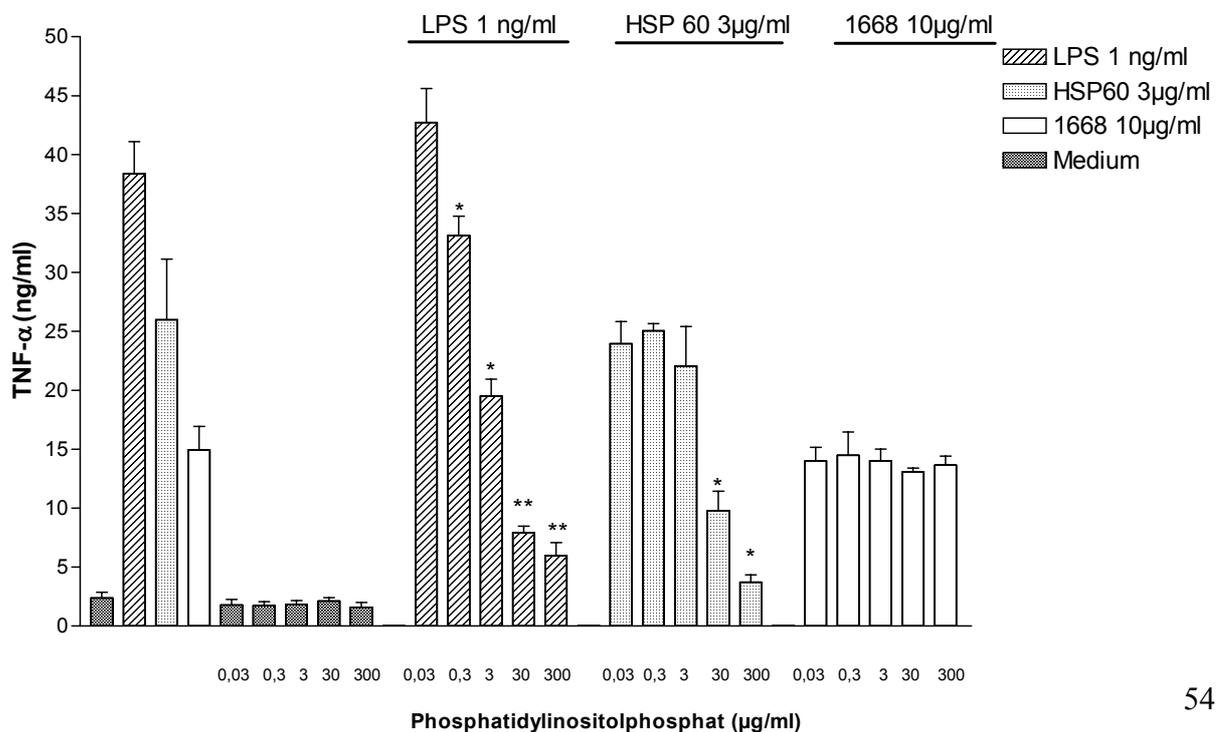
2.2. Phosphatidylinositol: Ein spezifischer Hemmstoff der Makrophagenstimulation?

Phosphatidylinositol (Pip) ist ein elementarer Baustein von Zellmembranen. Es entsteht durch die Verschmelzung von CDP-Diacylglycerin und Inositol und stellt die Vorstufe wichtiger second messenger der Zelle dar. Laut Literatur ist Pip in der Lage die Aktivierung von Monozyten durch LPS zu unterbinden (Wang et al., 1998) Um den Einfluss des Pip auf die Stimulation der Mausmakrophagen zu untersuchen, wurden die Zellen für 15 Minuten mit Pip (0,03; 0,3; 3; 30; 300 µg/ml) vorinkubiert, bevor sie mit huHSP60 (3µg/ml), LPS (1ng/ml) und ODN 1668 (10µg/ml) stimuliert wurden. Daran anschließend folgte die Bestimmung von TNF-α und NO₂⁻ im Zellüberstand und der MTT-Test. Die Messung der TNF-α-Werte ließ folgende Ergebnisse erkennen:

Pip hemmte die durch huHSP60 und LPS hervorgerufene TNF- α -Produktion der Mausmakrophagen signifikant und konzentrationsabhängig. Keinen Effekt hatte Pip hingegen auf die Stimulation mit ODN 1668 (Abb. 3.10.)

Eine signifikante Verminderung der TNF- α -Konzentration erfolgte im Falle der Stimulation mit huHSP60 ab einer Konzentration von 30 μ g/ml Pip. Dabei verringerte sich die TNF- α -Konzentration im Vergleich zur Negativkontrolle, (huHsp60 ohne Pip) um 62,3% auf $9,8 \pm 1,6$ μ g/ml. 300 μ g/ml Pip bewirkten sogar eine Reduktion um 86% auf $3,7 \pm 0,6$ ng/ml.

Die LPS-Stimulation konnte bereits mit 3 μ g/ml Pip um ca. 50% gemindert werden. Eine Hemmung der LPS-Reaktivität um ca. 85% war bei einer Phosphatidylinositolkonzentration von 300 μ g/ml zu beobachten. Die TNF- α -Konzentration sank dabei von $38,4 \pm 2,7$ ng/ml (ohne Pip) auf $5,9 \pm 1,0$ ng/ml (300 μ g/ml Pip) ab. Die NO₂⁻-Werte bestätigten die Ergebnisse der TNF- α -Messung, zeigte sich doch auch hier eine eindeutig konzentrationsabhängige Inhibition der LPS-Reaktivität durch Pip. Auch bei der Aktivierung durch huHSP60 ließ sich dieser Trend erkennen, jedoch war auf Grund der geringen NO₂⁻-Produktion keine sichere Aussage möglich. Um einen stimulatorischen Effekt von Pip auf die Makrophagen auszuschließen wurden die Zellen ohne Zusatz von LPS, huHSP60 oder ODN 1668 mit Pip inkubiert. Weder die TNF- α -, noch die NO₂⁻-Werte zeigten dabei signifikante Unterschiede zur Mediumkontrolle. Pip wies im MTT-Assay keinen negativen Einfluss auf die Zellvitalität auf (Abb. 3.11.).



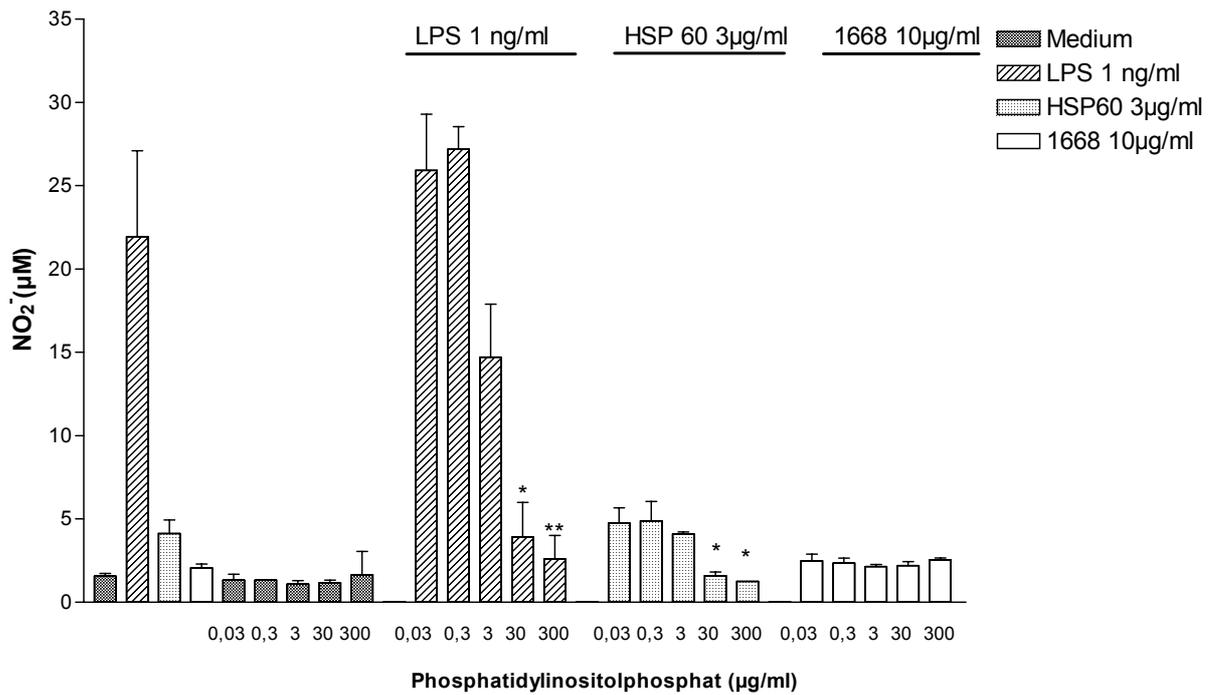


Abb.3.10.: Effekt von Phosphatidylinositol auf die Stimulation von J774-Mausmakrophagen mit LPS, huHSP60 und ODN 1668. Die Zellen wurden mit unterschiedlichen Konzentrationen Phosphatidylinositol für 15 min vorinkubiert. Im Anschluß daran folgte die Zugabe von LPS (1ng/ml), huHSP60 (3µg/ml) und ODN 1668 (10µg/ml). Der TNF-α-Gehalt (A) des Überstandes wurde nach 6h Inkubation mittels ELISA bestimmt. Die NO₂⁻-Messung (B) folgte nach insgesamt 24stündiger Inkubation mittels der Griess-Reaktion. In dieser Graphik sind die Mittelwerte+ S.D. der absoluten TNF-α und NO₂⁻-Werte dargestellt. *:p < 0,05; **:p < 0,01 verglichen zu den Kontrollen ohne Pip.

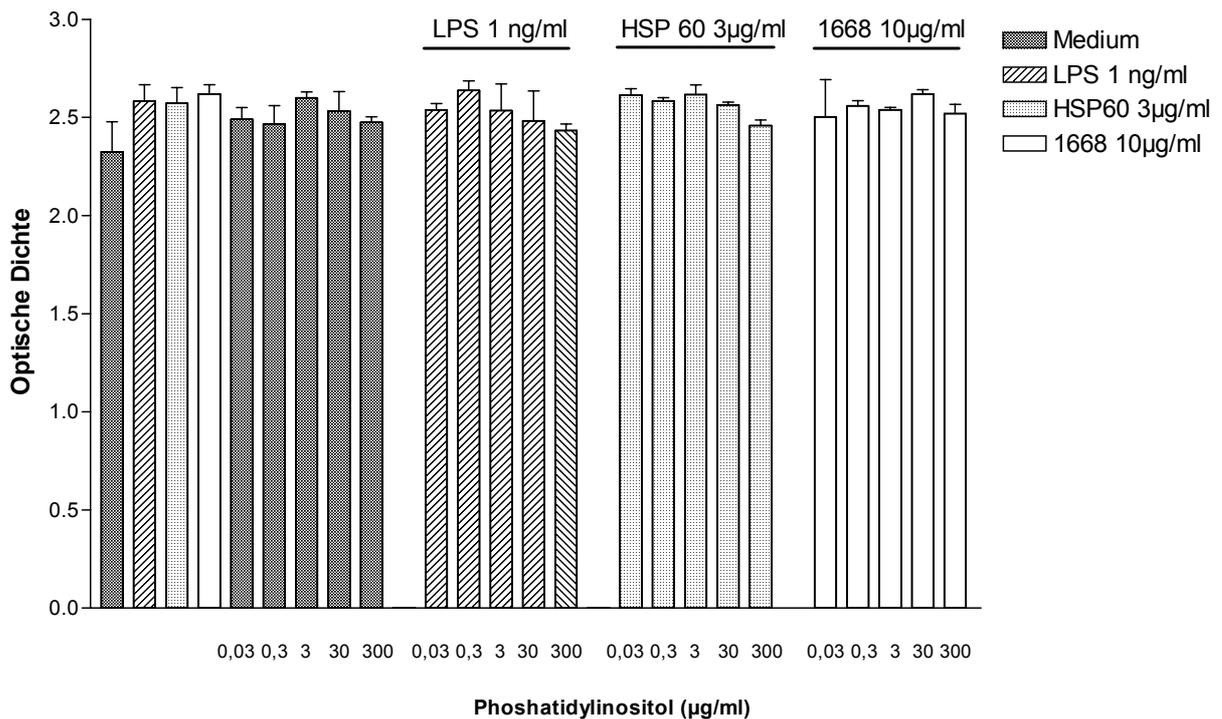


Abb.3.11.: Wirkung von Pip auf die metabolische Aktivität der Mausmakrophagen. Gemessen wurde die Optische Dichte der Zellsuspension pro well. Diese stellt ein Maß für die metabolische Aktivität der Zellen dar. Je höher die Optische Dichte, desto aktiver waren die Zellen. Die Zellen wurden vor der Messung für 4 Stunden mit dem MTT-Reagenz (1mg/ml) inkubiert und anschließend mit 10 %igen SDS lysiert. Dargestellt sind hier die Mittelwerte+ S.D. aus drei Bestimmungen.

2.3. Magainin I, II und Magainin II Amid

Die Magainine gehören zu der Substanzklasse der sogenannten Defensine. Dabei handelt es sich um kurze antibakteriell wirksame Polypeptide, die vor allem in Epithelzellen der Haut und Schleimhäute sowie in Makrophagen vorkommen. Ihre Funktion besteht in der unspezifischen Abwehr von mikrobiellen Infektionen. Interessant war die Frage, ob diese Substanzen wegen ihrer Fähigkeit stark apolare wie auch stark polare Bindungen einzugehen die Aktivierung der Makrophagen durch huHSP60 hemmen können.

Die Makrophagen wurden vor der Zugabe von huHSP60 (6µg/ml), LPS (1ng/ml) und ODN 1668 (10µg/ml) für 15 Minuten mit den verschiedenen Magaininen bei Raumtemperatur inkubiert.

Die Auswertung der TNF- α - und NO₂⁻-Messung verdeutlichte, dass keines der eingesetzten Magainine selbst zu einer signifikanten Stimulation der Makrophagen führte.

Während keines der Magainine die Stimulation der J774-Zellen durch ODN 1668 vermindern konnte, zeigten sich jedoch deutliche Effekt des Magainin auf die Stimulation mit huHSP60 und LPS (Abb.3.12.). Vor allem die Wirkung des Magainin II Amid ist hierbei hervorzuheben. Dieses konnte die Zellstimulation durch huHSP60 und LPS konzentrationsabhängig fast vollständig hemmen. Bereits 1µg/ml Magainin II Amid verringerten die durch huHSP60 stimulierte TNF- α -Produktion um ca. 30%, 10µg/ml reduzierten diese sogar um ca. 80% von 17,0±1,6 auf 3,3±0,6 ng/ml.

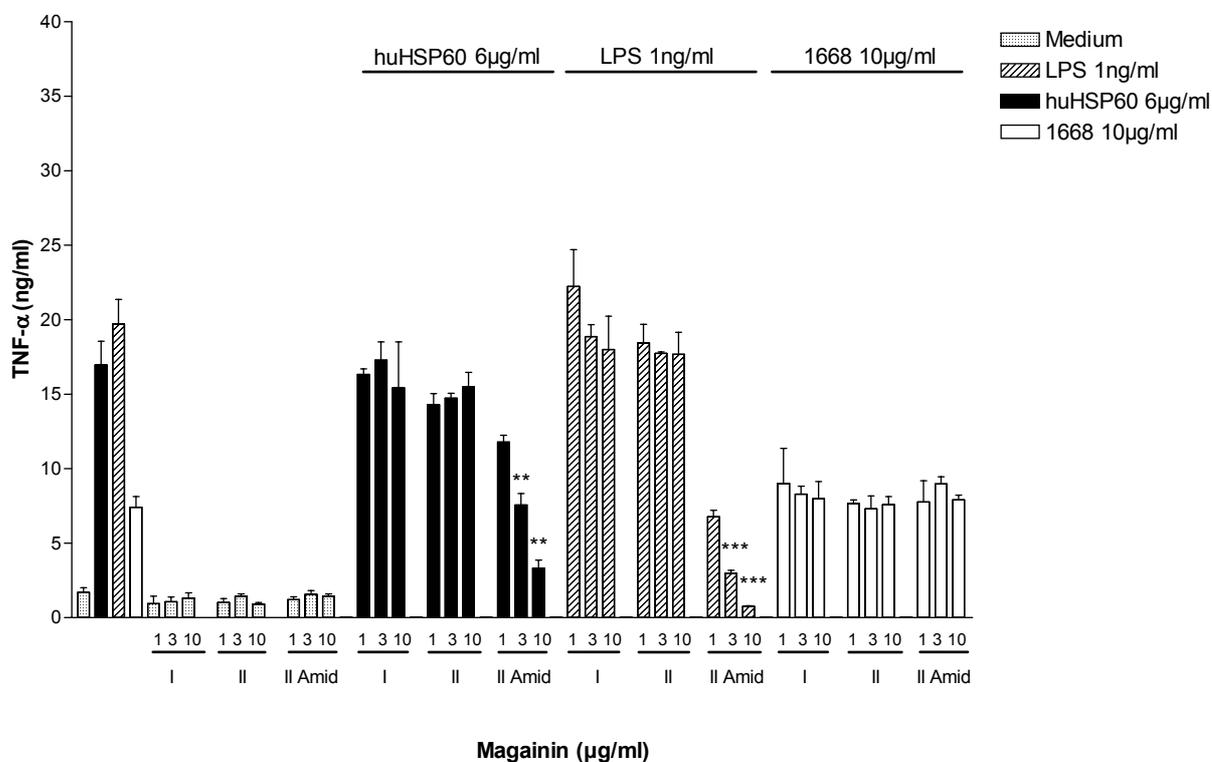
Auch die Zellstimulation durch LPS konnte durch Magainin II Amid signifikant vermindert werden. Im Vergleich zur Negativkontrolle (LPS ohne Magainin) bewirkten 1µg/ml Magainin II Amid eine Reduktion der TNF- α -Konzentration um 66%. 10µg/ml bewirkten sogar eine fast vollständige (>95%) Hemmung der TNF- α -Produktion. Der TNF- α -Gehalt des Überstandes sank dabei von 19,70±1,7 bei der Negativkontrolle

auf $0,75 \pm 0,05$ ng/ml unter Einwirkung von $10 \mu\text{g/ml}$ Magainin II Amid. Keinen Effekt hatte das Magainin II Amid auf die Zellstimulation mit ODN 1668.

Magainin I und II vermochten nicht die $\text{TNF-}\alpha$ -Produktion der mit LPS, huHSP60 und ODN 1668 stimulierten Zellen zu hemmen.

Die Betrachtung der NO_2^- -Messung spiegelt im wesentlichen die für $\text{TNF-}\alpha$ beschriebenen Ergebnisse wieder. Auch hier war eine signifikante und konzentrationsabhängige Inhibition der Zellstimulation durch huHSP60 und LPS zu erkennen. Keinen Einfluss zeigte auch hier das Magainin II Amid auf die mit ODN 1668 stimulierten Zellen. Magainin II zeigte im Gegensatz zu den $\text{TNF-}\alpha$ Daten hier eine geringe, jedoch signifikante Verminderung der durch huHSP60 induzierten NO_2^- -Produktion. Im Vergleich zur Negativkontrolle verringerte sich die unter Einwirkung von $10 \mu\text{g/ml}$ Magainin II gemessene NO_2^- -Konzentration um ca. 20% von $13,0 \pm 1,1$ auf $10,3 \pm 0,9 \mu\text{M}$. Magainin I zeigte keinen Effekt.

Keines der verwendeten Magainine zeigte in den Versuchen einen im MTT-Assay erkennbaren zelltoxischen Effekt (Abb. 3.13.)



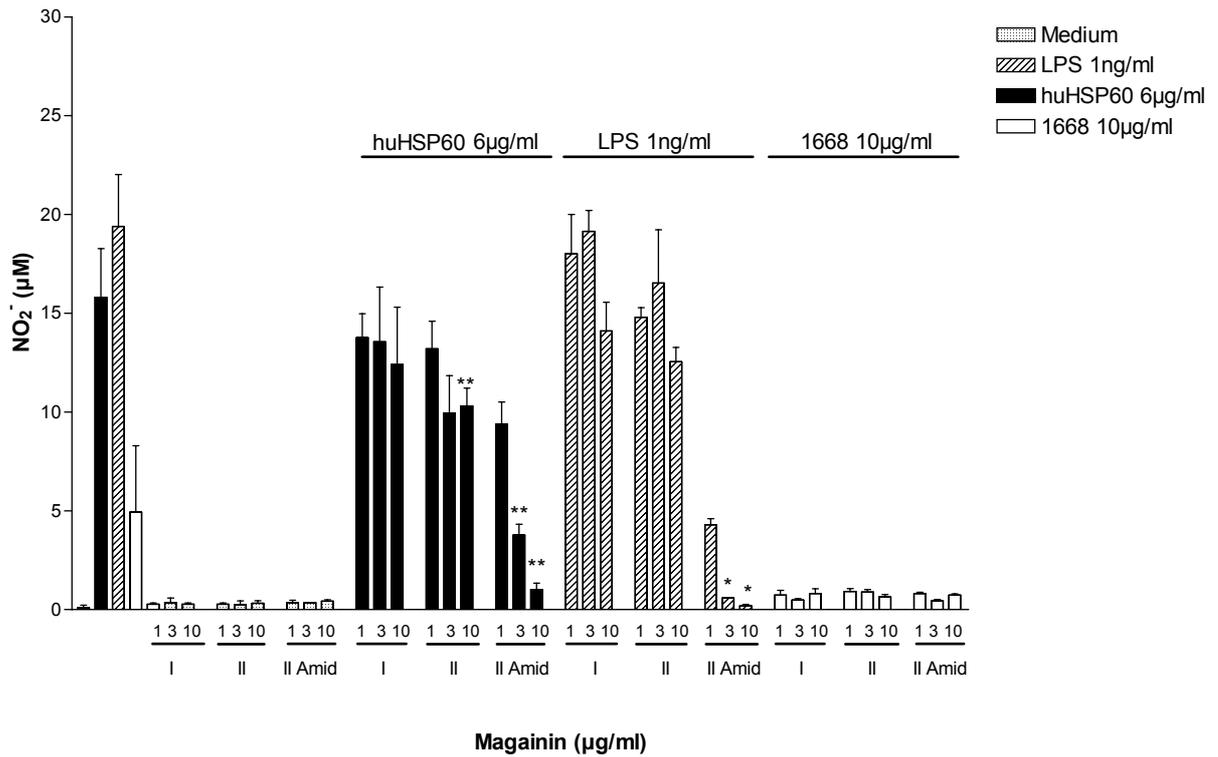


Abb. 3.12.: Wirkung von Magainin I, II und II Amide auf die Stimulation von Mausmakrophagen der J774-Zelllinie. Die Zellen wurden mit Magainin I, II und II Amide (1;3 und 10 $\mu\text{g/ml}$) für 15min bei RT vorinkubiert bevor sie mit huHSP 60 (6 $\mu\text{g/ml}$), LPS (1 ng/ml) und ODN 1668 (10 $\mu\text{g/ml}$) stimuliert wurden. Nach 6 Stunden Inkubation bei 37°C erfolgte die Bestimmung des TNF- α -Gehaltes (A) im Zellüberstandmittels des ELISA. Nach weiteren 18 Stunden wurde der Nitrit-Gehalt (B) des Überstandes mittels der Griess-Reaktion bestimmt. Hier dargestellt sind die Mittelwerte+S.D aus drei Bestimmungen. *:p < 0,05; **:p < 0,01; ***:p < 0,001 im Vergleich zu den Kontrollen ohne Magainin.

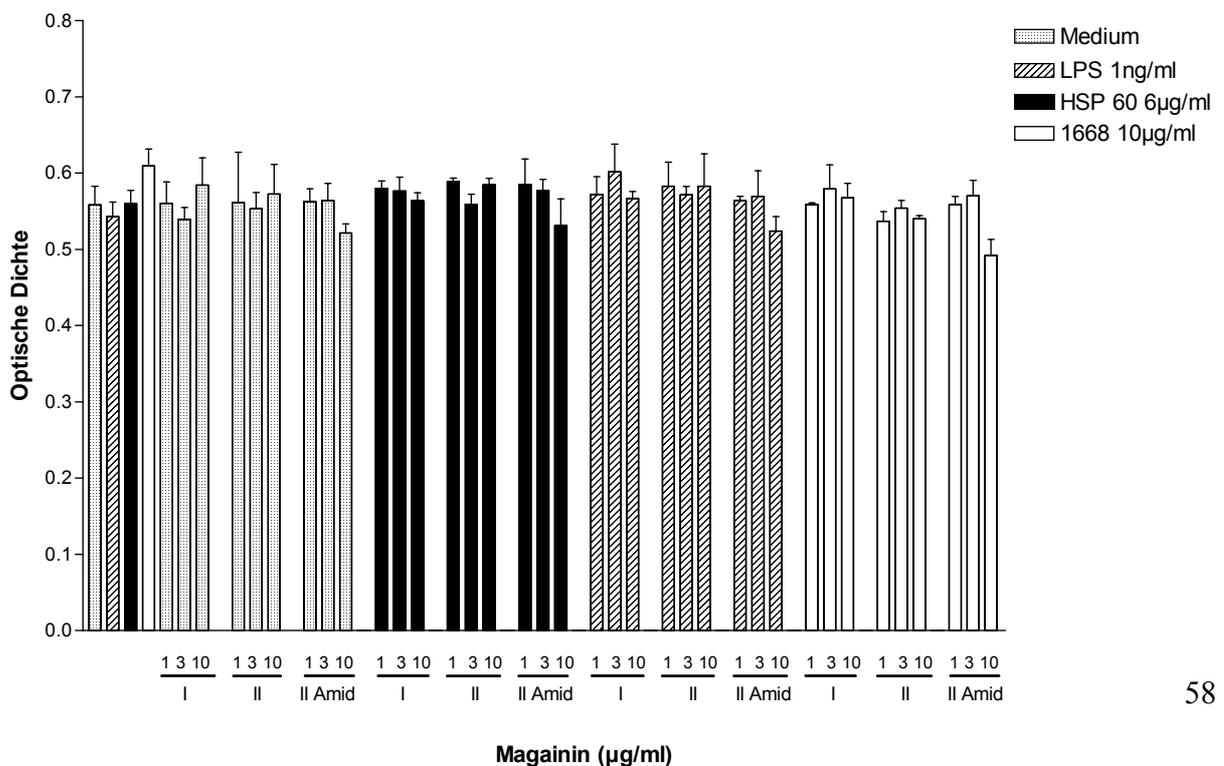


Abb.3.13.: Einfluss von Magainin auf die metabolische Aktivität der Mausmakrophagen. Nach 4stündiger Inkubation der Zellen mit dem MTT-Reagenz (1mg/ml) und anschließender Zellyse mit 10%igen SDS wurde die Optische Dichte der Zellsuspension pro well gemessen. Diese korreliert mit der metabolische Aktivität der Zellen und stellt somit ein Maß für deren Vitalität dar. Je höher die Optische Dichte, desto aktiver waren die Zellen. Dargestellt sind hier die Mittelwerte+ S.D. aus drei Bestimmungen.

2.4. LAL-Assay: Magainin interagiert mit LPS und verhindert dessen biologische Aktivität

Anhand des LAL-Assays sollte überprüft werden, ob Magainin I, II, II Amid und Pip in der Lage sind an LPS zu binden und so dessen biologische Wirkung zu unterbinden. Die unterschiedlichen Magainine und Pip wurden mit LPS gemischt und für die Dauer von 2 Stunden bei 37°C im Wasserbad inkubiert. Magainin I, II und II Amid wurden in den Endkonzentrationen 10; 3 und 1µg/ml, Pip in den Konzentrationen 30 und 3 µg/ml in den LAL-Assay eingesetzt. Die LPS-Endkonzentration betrug 100pg/ml. Als Kontrolle diente LPS (100pg/ml) ohne den Zusatz von Magainin oder Pip. Die Ergebnisse des LAL-Assays sind in Abbildung 3.14. dargestellt.

Die Grafik verdeutlicht, dass alle drei Magainine die durch LPS hervorgerufene Optische Dichte des LAL-Gemisches konzentrationsabhängig verminderten. Diese Verminderung der Optischen Dichte entspricht einer Verringerung der biologisch aktiven Endotoxinkonzentration in den untersuchten Proben. In der Konzentration 10µg/ml konnte bei allen drei Magaininen eine Absenkung der Optischen Dichte auf das Niveau der Negativkontrollen (LAL-Wasser und Endotoxinfreies Wasser) beobachtet werden. Pip konnte die durch 100pg/ml LPS hervorgerufene Optische Dichte, und damit die Konzentration des biologisch aktiven LPS der Probe, nicht reduzieren.

Zusammenfassend ist festzustellen, dass alle drei Magainine konzentrationsabhängig mit LPS interagieren und so dessen biologische Wirkung im LAL-Assay blockieren. Phosphatidylinositol hingegen besitzt nicht die Fähigkeit die biologische Wirkung des LPS zu inhibieren.

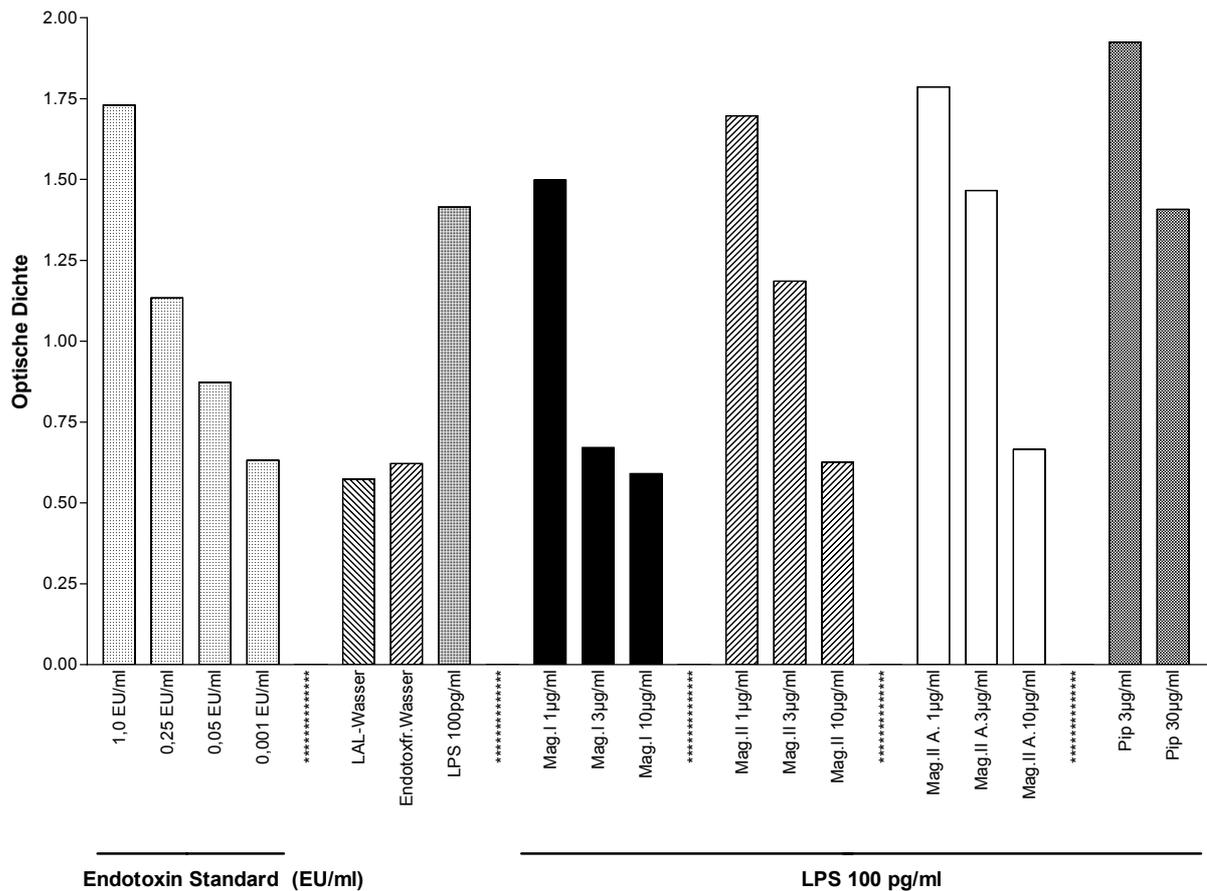


Abb.3.14.: Ergebnis des LAL-Assays. LPS (100pg/ml) wurde mit Magainin I,II ,II Amide (1;3;10µg/ml) und Phosphatidylinositol (3;30µg/ml) gemischt und für 2 Stunden bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Proben in den LAL-Assay eingesetzt und die optische Dichte bestimmt. Hier dargestellt ist der Mittelwert von zwei Bestimmungen.

2.5. Humanes Neutrophiles Peptid

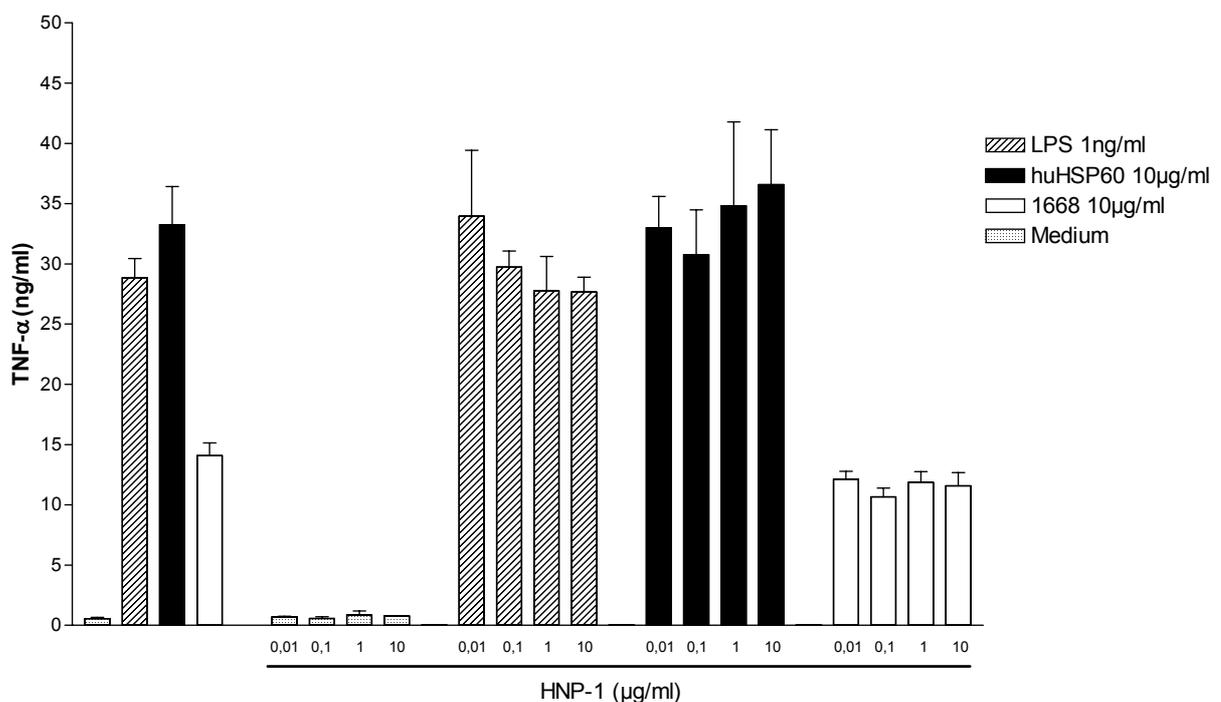
Nachdem Magainin II Amid einen so deutlichen Effekt auf die Makrophagenstimulation zeigte, sollte ein weiteres Defensin, das Humane Neutrophile Peptid (HNP-1), bezüglich seiner Eigenschaften auf die Makrophagenstimulation untersucht werden.

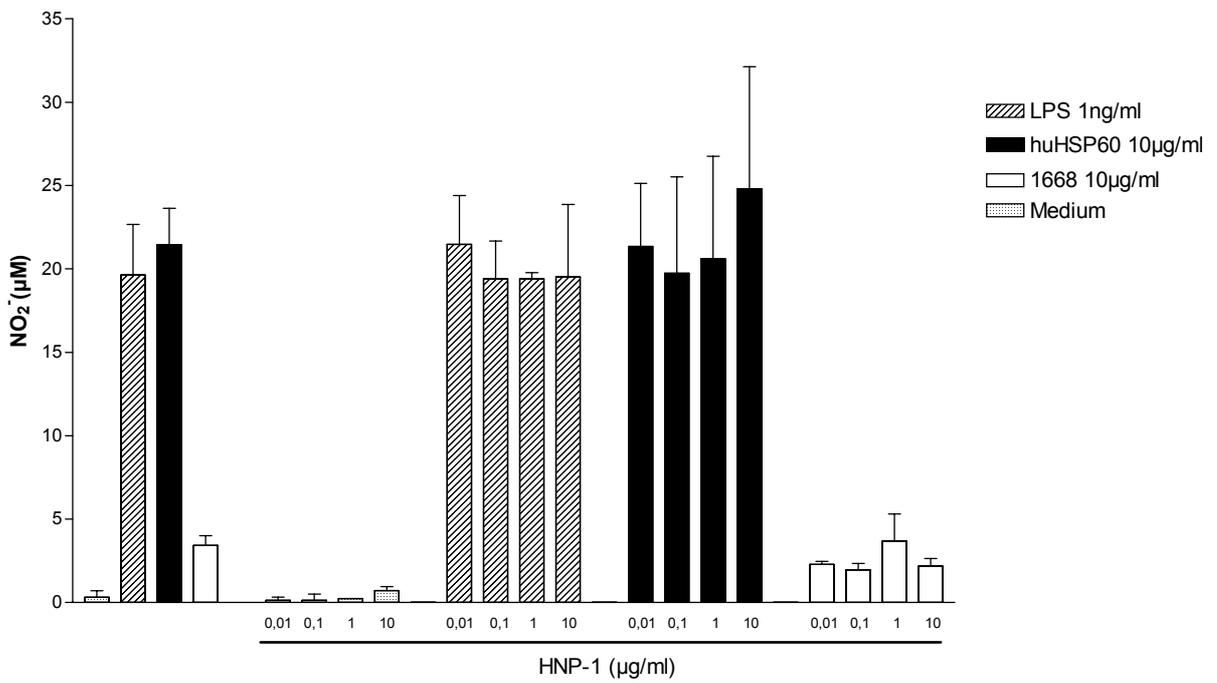
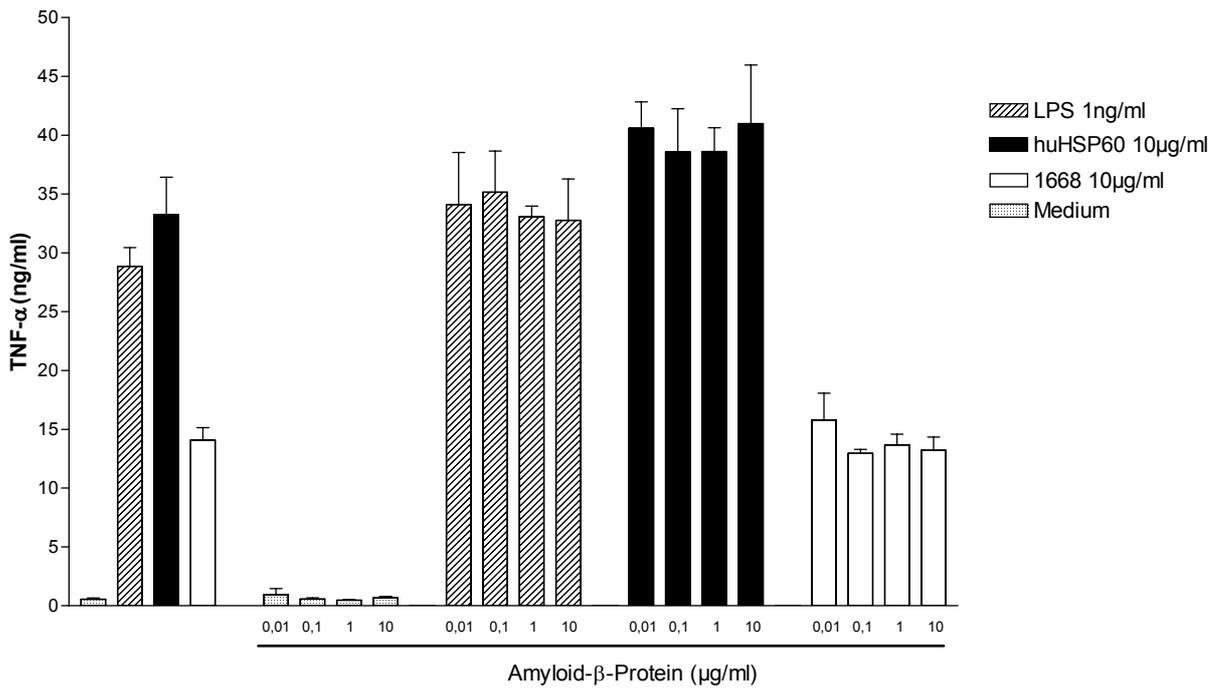
HNP-1 wurde in den Konzentrationen 0,01; 0,1; 1 und 10µg/ml zu den Zellen gegeben. Nach 15 Minuten Inkubation mit HNP-1 wurden den Zellen LPS, huHSP60 und 1668 zugesetzt. Bei keiner der eingesetzten HNP-1 Konzentrationen konnte eine, im Vergleich zur Kontrolle, signifikante Hemmung der TNF- α - oder NO $_2^-$ -Produktion festgestellt werden. In Abbildung 3.15. sind die Ergebnisse der TNF- α - und NO $_2^-$ -Messung graphisch dargestellt.

2.6. Amyloid- β -Protein

Dieses Protein stellt einen zentralen Bestandteil der beim Morbus Alzheimer auftretenden Alzheimer-Fibrillen dar. Für die Entstehung dieses Proteins werden genetische Faktoren verantwortlich gemacht. So bewirkt eine Mutation auf Chromosom 21 die Verstümmelung des physiologischerweise in Zellmembranen vorhandenen Amyloid-precursor-proteins (APP). Aus dieser Verstümmelung des APP resultiert das Amyloid- β -Protein (ABP). In der Literatur wurde ein synergistischer Effekt des ABP und IFN- γ bei der Stimulation von Mikrogliazellen beschrieben (L.Meda et al. 1995). Ob dieses Protein wegen seiner hydrophoben Wechselwirkung mit Chaperonen Einfluss auf die Makrophagenstimulation durch huHSP60 hat, sollte in diesem Versuch nachgeprüft werden. Die Mausmakrophagen wurden zu diesem Zweck mit ABP in den Konzentrationen 0,01; 0,1; 1 und 10 $\mu\text{g/ml}$ für 15 Minuten inkubiert, bevor die Stimulationen huHSP60 (10 $\mu\text{g/ml}$), LPS (1 ng/ml) und ODN 1668 (10 $\mu\text{g/ml}$) den Zellen zugesetzt wurden.

Die Auswertung der TNF- α - und NO $_2^-$ -Messung verdeutlichte, dass Amyloid- β -Protein keinen wesentlichen Effekt auf die Makrophagenaktivierung mit huHSP60, LPS oder ODN1668 hatte. Die Ergebnisse der TNF- α - und NO $_2^-$ -Messung für HNP-1 und Amyloid- β -Protein sind in Abbildung 3.15. graphisch dargestellt.





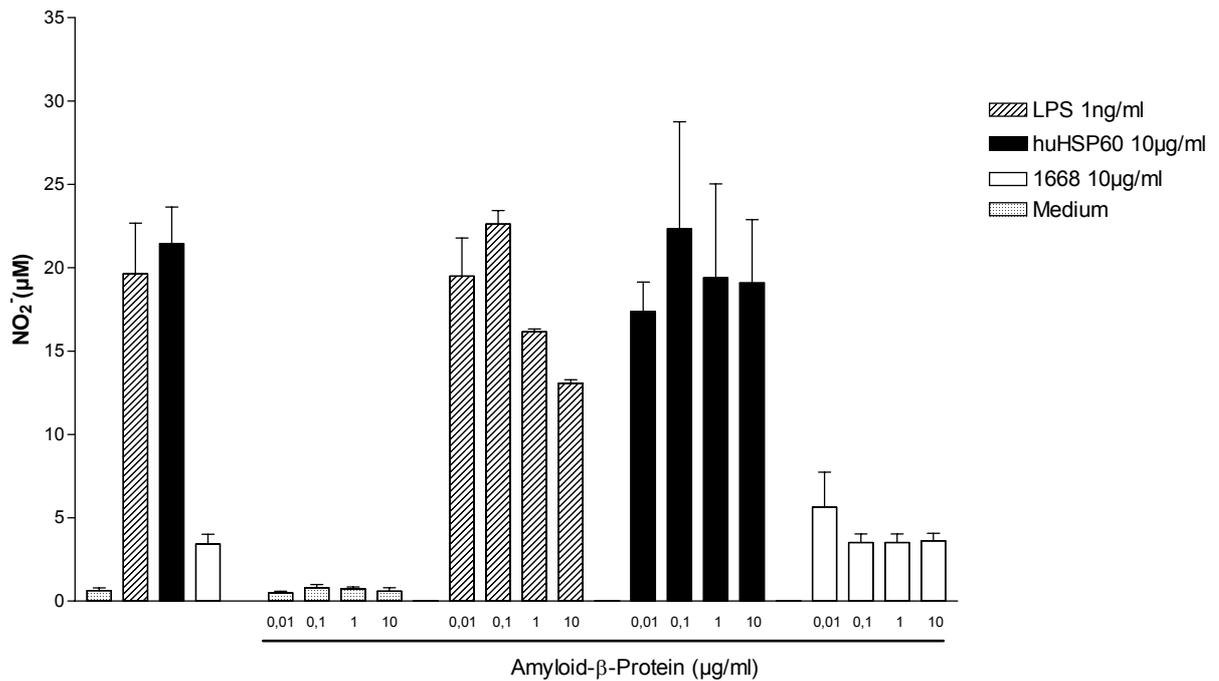


Abb.3.15.: Wirkung von Amyloid-β-Protein und HNP-1 auf die TNF-α- und NO₂⁻-Produktion von Mausemakrophagen der J774-Zelllinie. Die Zellen wurden für 15 Minuten mit Amyloid-β-Protein und HNP-1 inkubiert und anschließend mit huHSP60(10µg/ml), LPS(1ng/ml) und ODN 1668(10µg/ml) stimuliert. Nach 6 Stunden Inkubation bei 37°C erfolgte die TNF-α-, nach 24 Stunden die NO₂⁻-Bestimmung im Zellüberstand. Die Mittelwerte und Standardabweichungen aus drei Bestimmungen sind hier dargestellt.

Weder HNP-1 noch Amyloid-β-Protein hatten in den eingesetzten Konzentrationen einen stimulatorischen Effekt auf die J774-Mausemakrophagen, noch zeigten sie im MTT-Assay einen negativen Einfluss auf die Vitalität der Makrophagen (Abb. 3.15. und 3.16.)

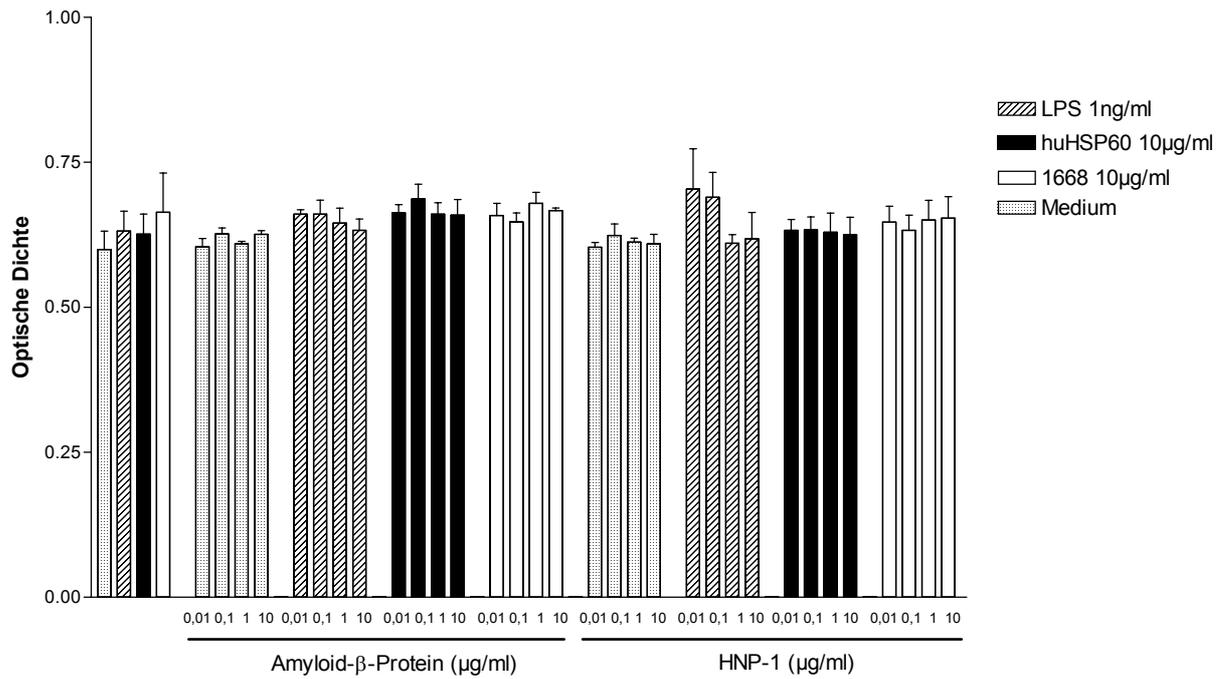


Abb.3.16: Zellvitalität in Abhängigkeit von Amyloid-β-Protein und HNP-1. Anhand des MTT-Tests wurde die Vitalität der J774-Mausmakrophagen nach deren Inkubation mit Amyloid-β-Protein und HNP-1 sowie LPS, huHSP60 und 1668 bestimmt. Gemessen wurde die optische Dichte der Proben bei 570 nm nach vorheriger Lyse der Zellen mit SDS.

2.7. Synthetische Peptide

Die nächsten beiden Kandidaten, deren Eigenschaften auf die Makrophagenstimulation überprüft werden sollte sind zwei synthetische Peptide mit folgenden Aminosäuresequenzen:

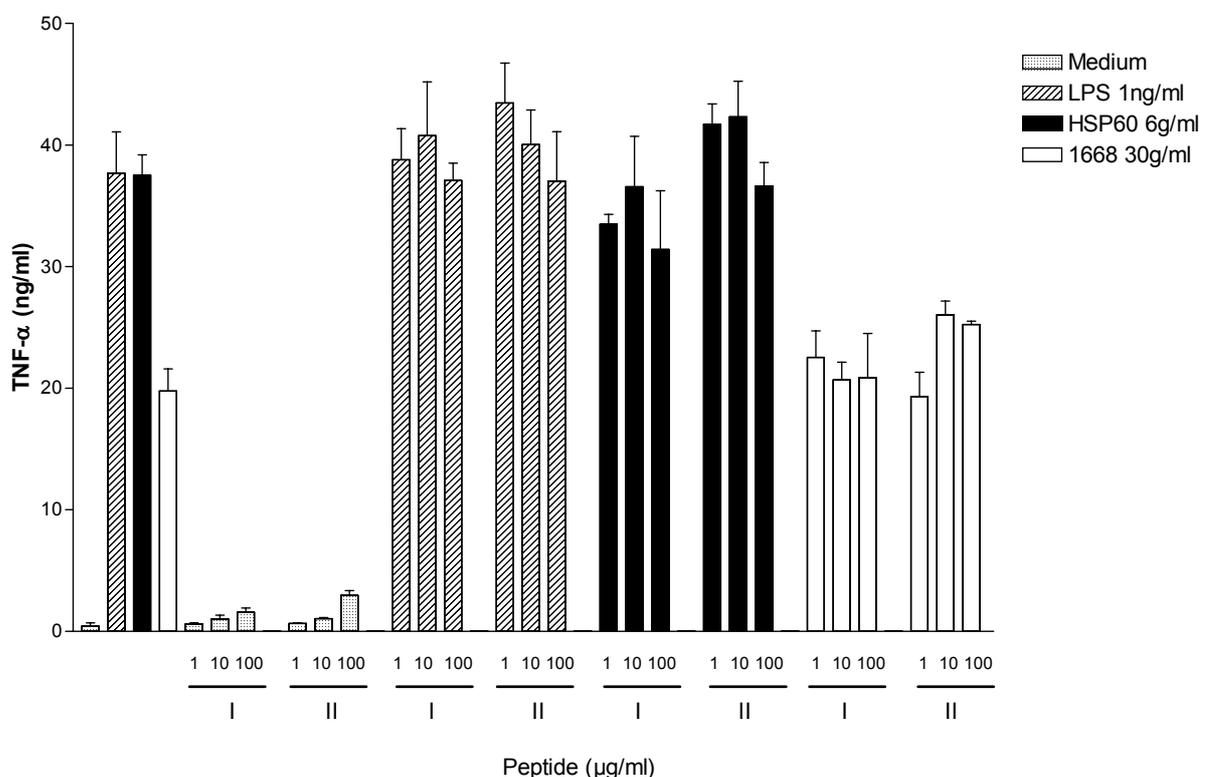
Peptid I (SBP): N-SWMTTPWGFLHP

Peptid II(vsv-C): N-KLIGVLSSLFRPK

Diese Peptide waren für die Untersuchung interessant, da in der Literatur für beide die Bindung an Hitzeschockproteine beschrieben wurde (Landry et al.,1992; Feltham et al.,2000)

Der Versuchsablauf entsprach den bisher dargestellten Inhibitionsexperimenten.

Abbildung 3.17. verdeutlicht, dass weder Peptid I noch Peptid II einen wesentlichen Einfluss auf die TNF- α -Produktion der mit huHSP 60, LPS oder ODN 1668 stimulierten Zellen aufwies. Auch die alleinige Inkubation der Zellen mit den Peptiden führte nicht zu einer Aktivierung der TNF- α - oder NO₂⁻-Produktion. Bei der Überprüfung von SBP und vsv-C im MTT-Assay zeigte keines der Peptide nennenswerte Effekt auf die Optische Dichte und damit auf die Zellvitalität (Daten nicht abgebildet).



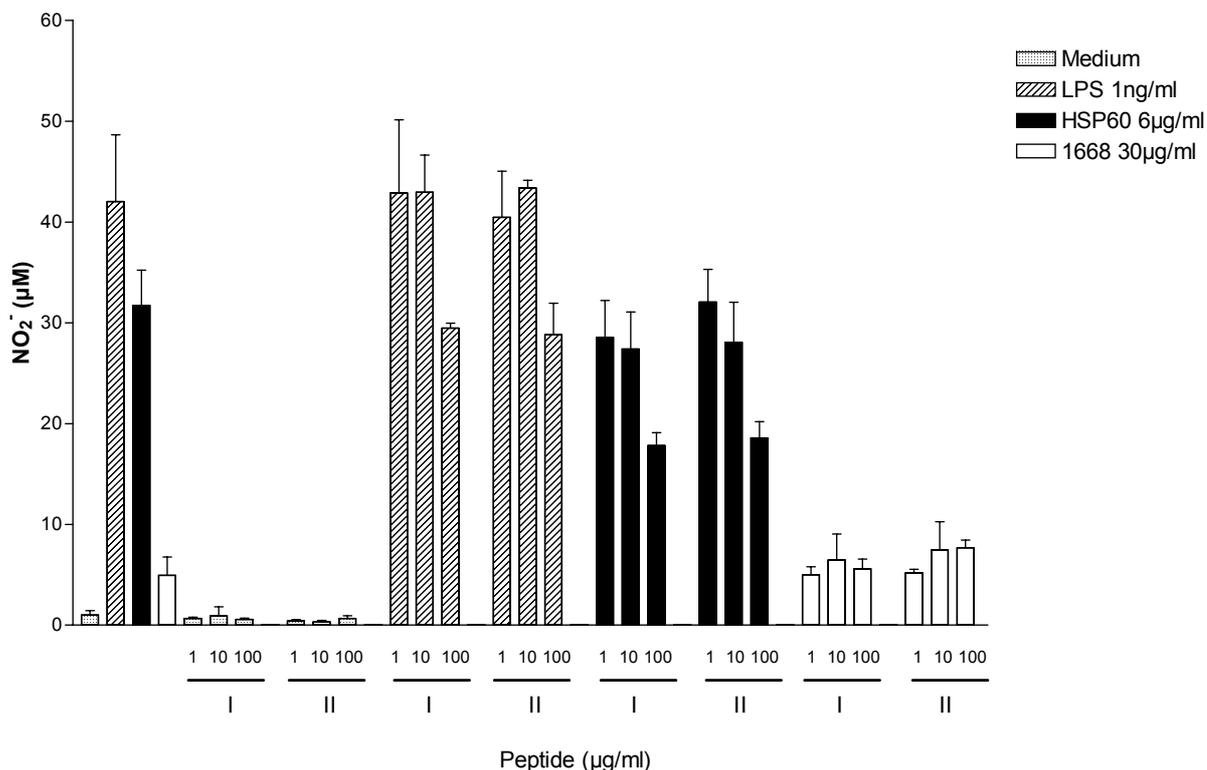


Abb. 3.17.: Auswirkung von Peptid I und II auf die TNF- α - und NO₂⁻-Produktion stimulierter Mausmakrophagen. Abgebildet sind hier die Mittelwerte + Standardabweichung aus drei Bestimmungen. Die Zellen wurden 15 min mit Peptid I und II (1; 10 und 100µg/ml) inkubiert bevor huHSP 60(6µg/ml), LPS (1ng/ml) und ODN 1668 (30µg/ml) den Zellen zugefügt wurden. Nach 6 Stunden Inkubation bei 37° C erfolgte die Ermittlung des TNF- α -Gehaltes des Zellüberstandes mittels des ELISA. Nach weiteren 18 Stunden Inkubation wurde der NO₂⁻-Gehalt des Zellüberstandes bestimmt.

2.8. Myelin Basisches Protein (MBP)

Das MBP ist ein Bestandteil der Myelinscheide, welche Nervenfasern umgibt und eine schnelle Weiterleitung der Aktionspotentiale ermöglicht. Die Zerstörung der Myelinscheide führt zu einer Störung der Reizleitung und damit verbunden zu progressiven Funktionsausfällen. Das daraus resultierende Krankheitsbild ist als Multiple Sklerose bekannt. Als Ursache der Zerstörung der Myelinscheiden wird ein Autoimmunprozess angenommen, der zu einer T-zellvermittelten Zerstörung des MBP, und damit der Myelinscheiden, führt. Dabei kommt es initial zur Präsentation des MBP an T-Zellen durch Makrophagen. Interessanterweise konnten Birnbaum und seine Mitarbeiter nachweisen, dass einige Myelinproteine Sequenzhomologien mit Hitzeschockproteinen aufweisen (Birnbaum et al., 1995&1996). Diese

Beobachtung machte das MBP zu einem interessanten Kandidaten für diese Inhibitionsstudien.

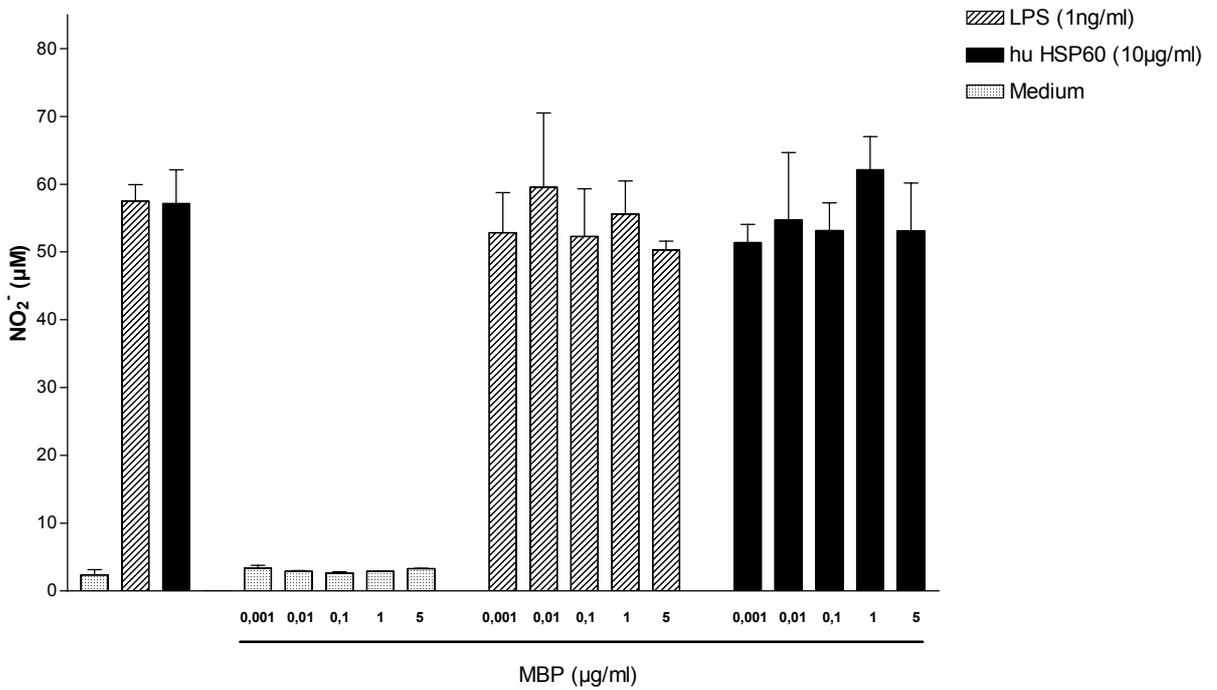
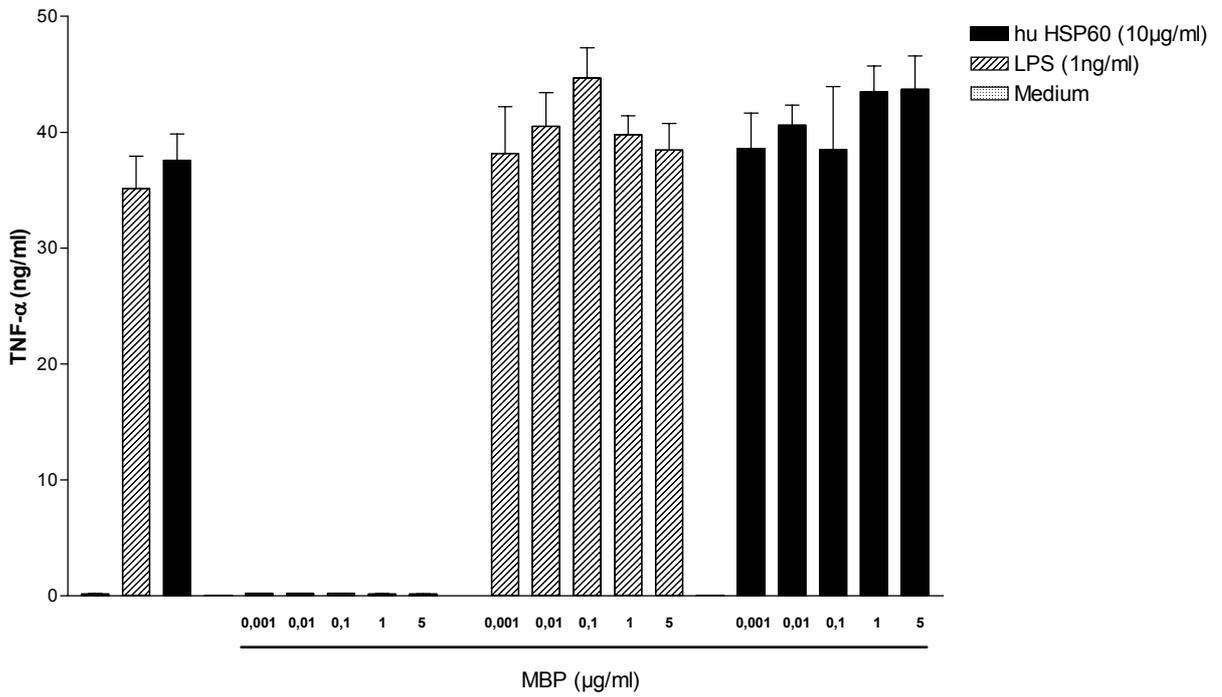
Um die Wirkung des MBP auf die Stimulation der Makrophagen mit huHSP 60, LPS und ODN 1668 zu untersuchen, wurden diese mit MBP in den Konzentrationen 5; 0,1; 0,01 und 0,001 $\mu\text{g/ml}$ inkubiert. Die im Anschluss an die Zellstimulation gemessenen TNF- α - und NO₂⁻-Werte ließen keinen signifikanten Einfluss des MBP auf die Zellstimulation erkennen (Abb.3.18.).

2.9. C-Peptid

Insulin wird als Prohormon Proinsulin in den β -Zellen der Langerhans-Inseln synthetisiert. Die A- und die B-Kette des prozessierten Insulins sind im Proinsulinmolekül durch das 31 Aminosäuren lange C-Peptid miteinander verbunden. Nach der Spaltung von Proinsulin in Insulin und C-Peptid verbleibt letzteres in den sekretorischen Granula der Inselzellen und wird nach einem Glukosestimulus mit Insulin kosezerniert. Herausragende biologische Funktionen von C-Peptid außer seiner Rolle bei der Insulinbiosynthese, bei der es für die korrekte Ausbildung der Disulfidbrücken und die sterische Anordnung der A- und B-Kette wichtig ist, sind in mehr als 30 Jahren seit der Entdeckung des C-Peptids nicht gefunden worden. Ido und Mitarbeiter (Ido et al., 1997) konnten jedoch in tierexperimentellen Studien zeigen, dass C-Peptid diabetesspezifische Spätfolgen normalisieren kann. Zusätzlich zeigten Rigler et al. 1999, dass das C-Peptid spezifisch an die Oberfläche verschiedener humaner Zellen bindet. Sie vermuteten daraufhin einen spezifischen Rezeptor, welcher die Bindung des C-Peptids vermittelt.

Zur Prüfung der Wirkung von C-Peptid auf die Makrophagenstimulation wurde wie in den bereits beschriebenen Inhibitionsexperimenten vorgegangen.

Aus Abbildung 3.18. geht hervor, dass das C-Peptid in den eingesetzten Konzentrationen weder die stimulatorische Wirkung von huHSP 60 noch die von LPS wesentlich beeinflussen konnte.



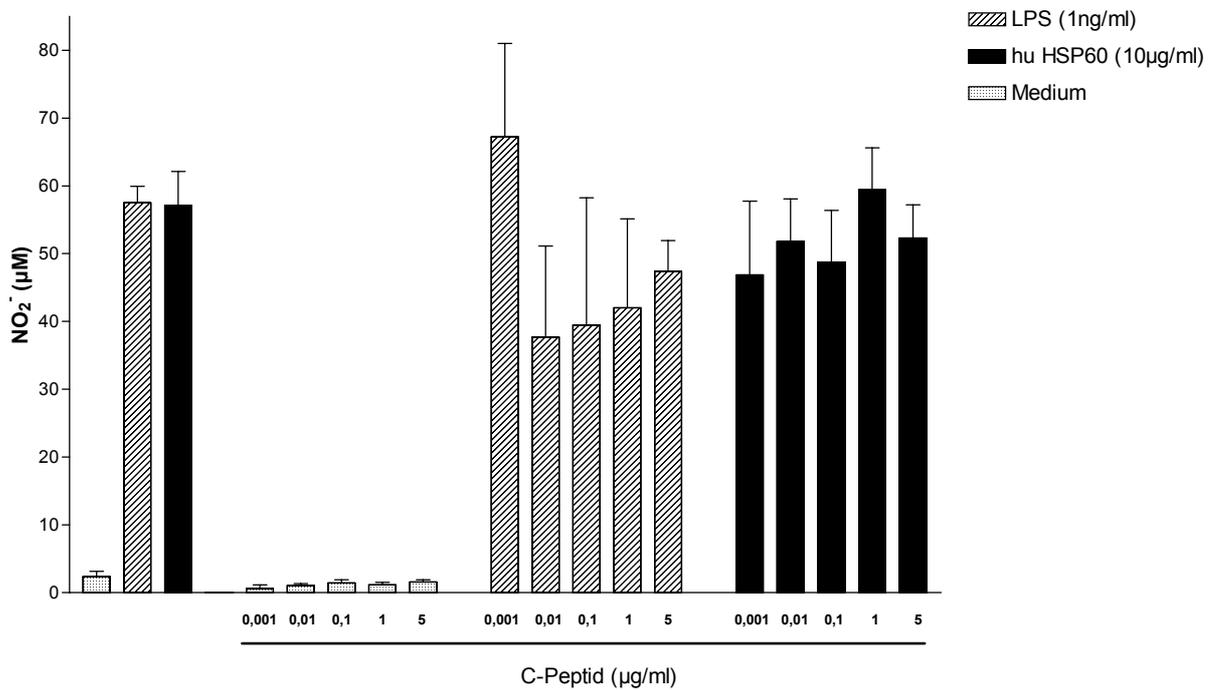
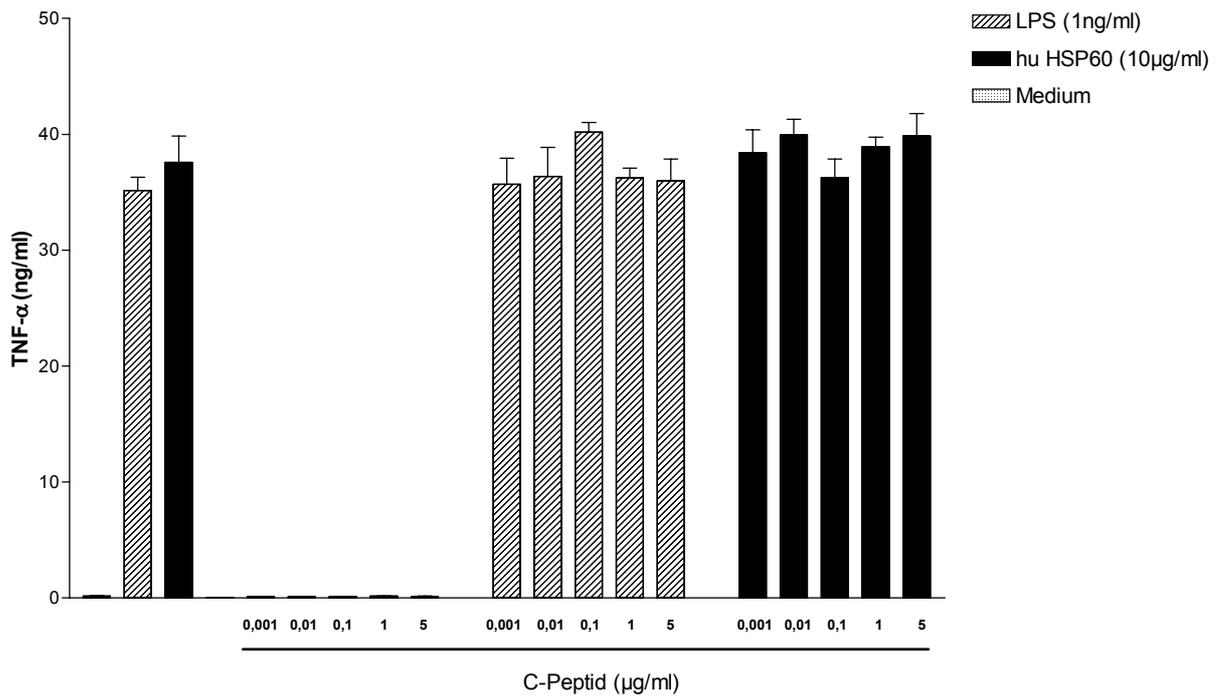


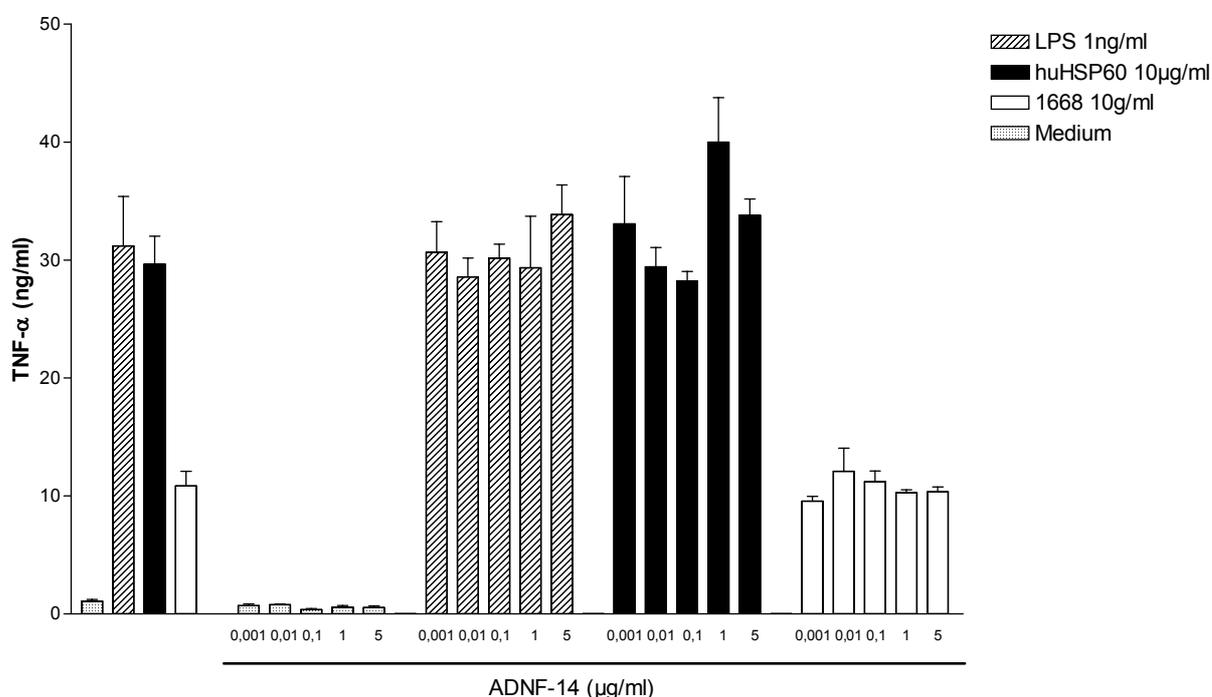
Abb 3.18.: Effekt von Myelin Basic Protein und C-Peptid auf die Stimulation von Zellen der J774 Linie. Dargestellt sind die absoluten TNF- α -Werte in ng/ml sowie die NO₂⁻-Werte in μ M + der Standardabweichung von drei Bestimmungen. MBP wurde in den Konzentrationen 0,001; 0,01; 0,1; 1 und 5 μ g/ml, C-Peptid in den Konzentrationen 0,001; 0,01; 0,1; 1 und 3 μ g/ml eingesetzt.

Keines dieser Proteine war in den getesteten Konzentrationen zelltoxisch (Daten nicht gezeigt), oder stimulierend auf die Makrophagen (Abb. 3.18.).

2.10. ADNF-14

Der ADNF-14 ist ein aus 14 Aminosäuren bestehendes neuroprotektives Peptid, welches z.B. den durch HIV, Amyloid- β -Protein und Tetrodotoxin verursachten neuronalen Zelltod verhindern kann. Er stellt den wirksamen Bestandteil des ADNF dar, der von aktivierten Gliazellen sezerniert wird. Interessanterweise weist der ADNF-14 eine sehr hohe Sequenzhomologie zu HSP-60 Peptiden auf, was ihn zu einem attraktivem Inhibitions-kandidaten dieser Arbeit machte.

Die in Abbildung 3.19. graphisch dargestellten Ergebnisse veranschaulichen, dass der ADNF-14 keinen hemmenden Einfluss auf die Stimulation der Mausmakrophagen mit huHSP 60, LPS oder 1668 ODN aufwies. Weder die TNF- α -, noch die NO₂⁻-Produktion konnten durch den ADNF-14 signifikant vermindert werden. Der ADNF-14 wurde in den Konzentrationen 0,001; 0,01; 0,1; 1 und 5 μ g/ml eingesetzt.



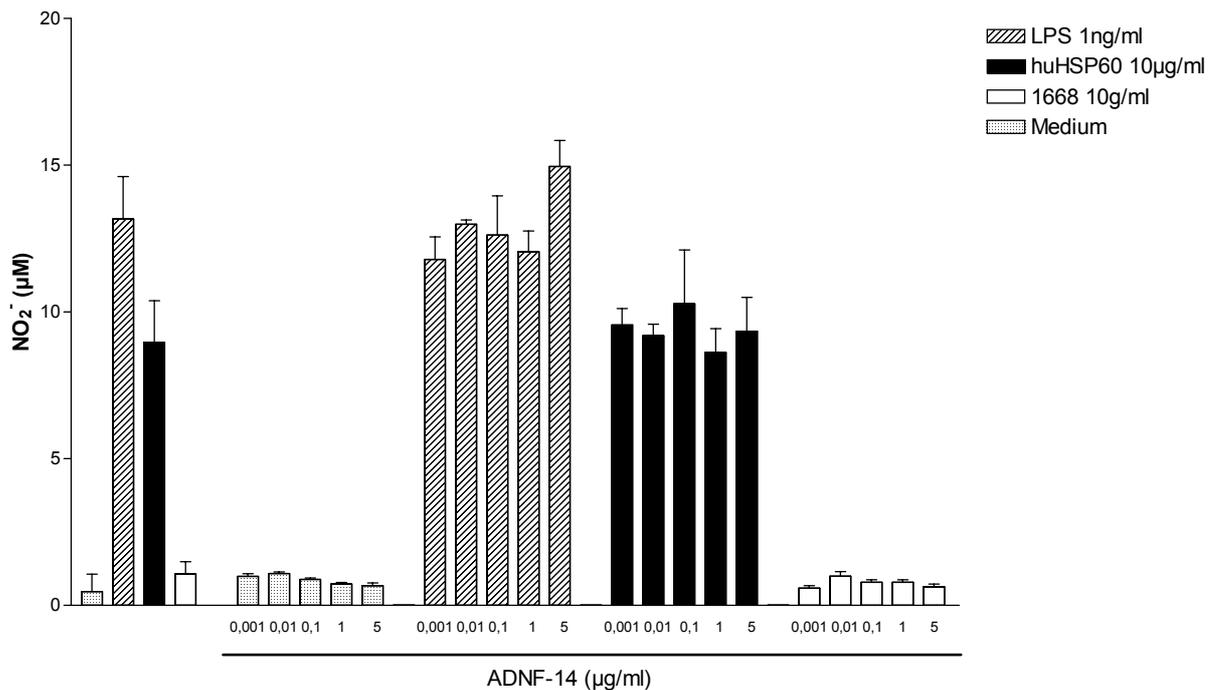


Abb. 3.19.: Wirkung des ADNF-14 auf die TNF- α - und NO₂⁻-Produktion stimulierter Mausmakrophagen der J774 Zelllinie. Die Zellen wurden vor Zugabe der Stimulantien, huHSP 60 (10µg/ml), LPS (1ng/ml) und ODN 1668 (10µg/ml), für ca. 15 min mit ADNF-14 inkubiert. Nach 6stündiger Stimulation erfolgte die Bestimmung des TNF- α -Gehaltes des Zellüberstandes. Die NO₂⁻-Konzentration wurde nach 24 Stunden Inkubation bei 37° C bestimmt. Hier dargestellt sind die Mittelwerte + S.D von 3 Bestimmungen.

3. Makrophagen-aktivierendes Lipopeptid als zusätzliches Kontrollsystem

Makrophagen werden typischerweise von Bestandteilen der bakteriellen Zellwand wie zum Beispiel LPS aktiviert. Da auch zellwandlose Bakterien wie Mycoplasmen zu einer Aktivierung von Makrophagen führen können, müssen auch andere Faktoren dieses stimulatorische Potential besitzen. Erst kürzlich wurde ein von Mycoplasmen gebildetes, stimulatorisches Lipopeptid entdeckt, das bereits in picomolaren Konzentrationen zu einer deutlichen Stimulation von Makrophagen führt (Takeuchi et al., 2000). In den im folgenden beschriebenen Versuchen sollte zum einen die stimulatorische Wirkung des Makrophagen-aktivierenden Lipopeptids (MALP-2) auf die Makrophagen zum anderen die Wirkung verschiedener Inhibitoren auf diese durch MALP-2 vermittelte Stimulation untersucht werden.

3.1. Zellstimulation durch MALP

MALP-2 ist ein synthetisches mycoplastisches Lipopeptid mit zwei langen Fettsäureesterresten. Zur optimale Lösung des MALP-2 wurde es in Octylglucopyranosid gelöst. Um einen Effekt des Octylglucopyranosids auf die Stimulation der Zellen auszuschließen, wurden die Zellen mit unterschiedlichen Konzentrationen Octylglucopyranosid in An- und Abwesenheit von LPS und huHSP 60 inkubiert. Im Anschluss daran wurden die nach 6, bzw. 24 Stunden abgenommenen Zellüberstände auf den Gehalt an TNF- α und NO $_2^-$ untersucht.

Die Ergebnisse zeigen, dass Octylglucopyranosid weder die Zellen selbst stimulierte noch deren Stimulation durch LPS und huHSP 60 beeinflusste (Abb.3.24.).

In höheren Konzentrationen wirkte das Octylglucopyranosid jedoch zelltoxisch. So konnte anhand des MTT-Assays eine deutlich verminderte Zellvitalität bei einer Konzentration von 2,5 mM Octylglucopyranoside festgestellt werden (Abb.3.20.). Zeigten sich zwischen den mit 0,025 bzw. 0,25 mM Octylglucopyranosid behandelten Zellen und der Kontrolle (ohne Octylglucopyranosid) keine wesentlichen Unterschiede in der Optischen Dichte, bewirkte die Inkubation der Zellen mit 2,5 mM Octylglucopyranosid eine signifikante Verminderung der Optischen Dichte im Vergleich zur Kontrolle um etwa 0,4 nm. Dies lässt auf eine massive Verminderung der Zahl der vitalen Zellen durch Octylglucopyranosid schließen.

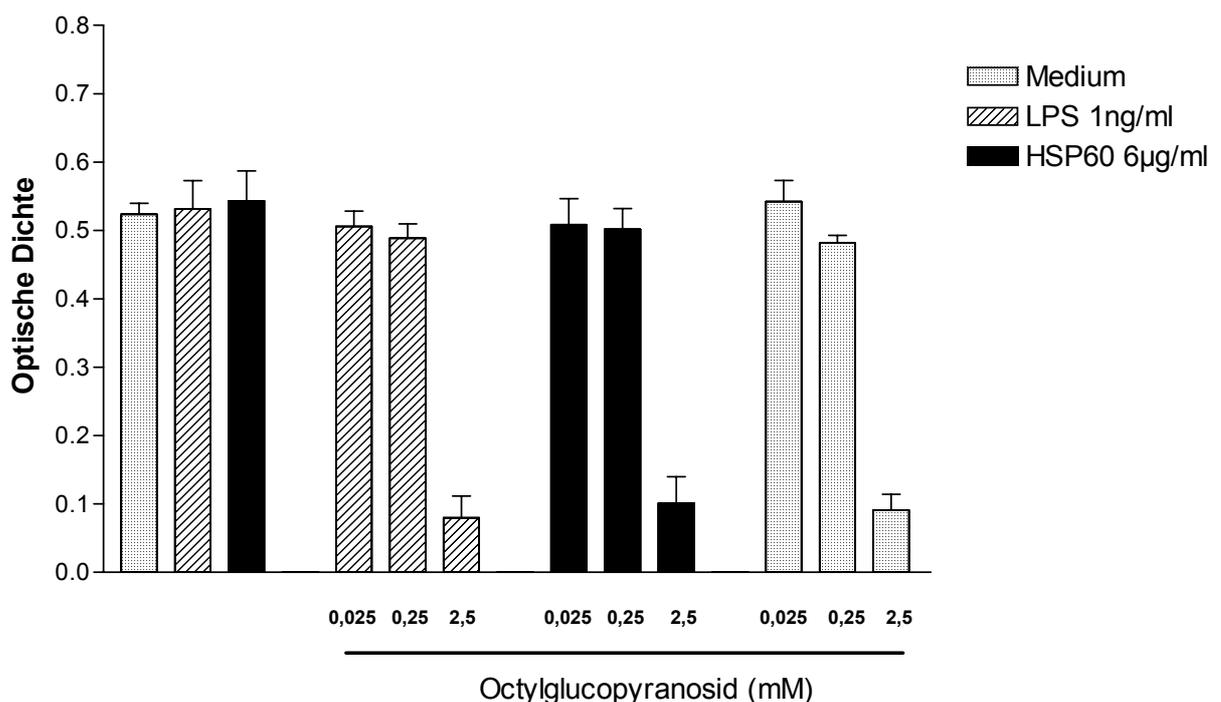
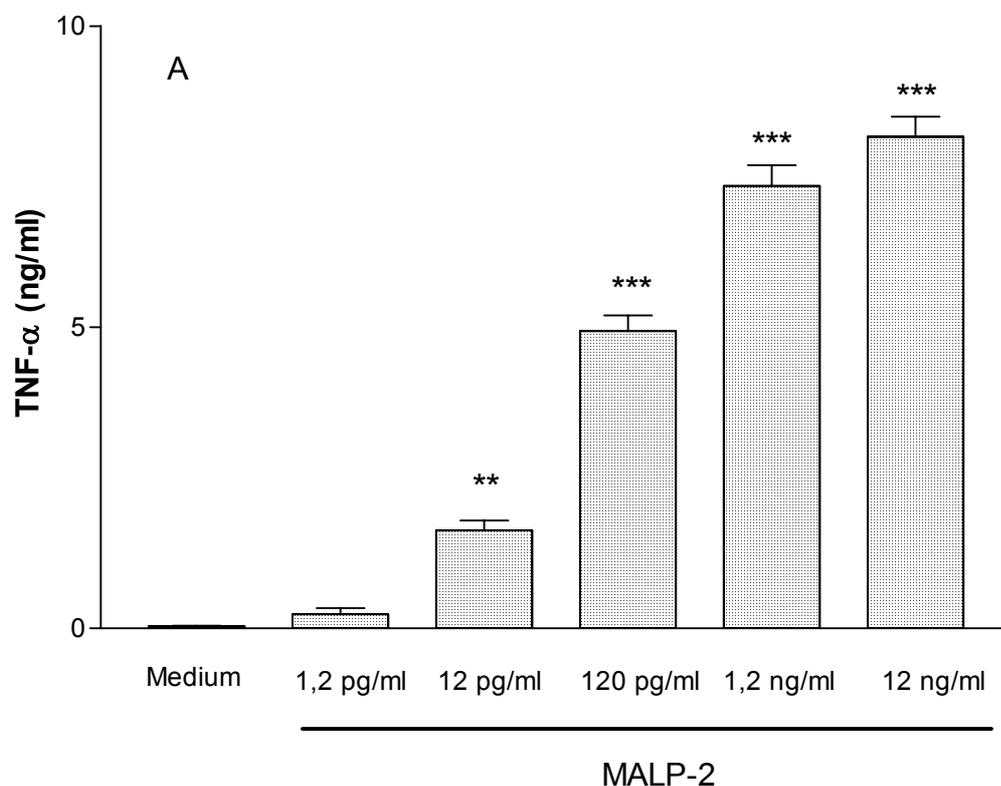


Abb. 3.20.: Wirkung von Octylglucopyranosid auf die metabolische Aktivität der Mausemakrophagen. Die gemessene Optische Dichte des Zelllysates korreliert im Rahmen des MTT-Tests mit der energieabhängigen enzymatischen Aktivität der Zellen und stellt somit ein Maß für deren Vitalität dar. Dabei steigt die Optische Dichte mit zunehmender Enzymaktivität und Vitalität der Zellen an. Aus drei Bestimmungen wurde hier der Mittelwert sowie die Standardabweichung der optischen Dichte aufgetragen.

Aufgrund dieser Erkenntnisse wurden die im folgenden geschilderten Experimente mit einer Endkonzentration von maximal $20\mu\text{M}$ Octylglucopyranosid durchgeführt. Im Anschluss an diesen Versuch wurde untersucht, welchen Einfluss die Inkubation der Zellen mit unterschiedlichen MALP-2-Konzentrationen auf die Produktion von $\text{TNF-}\alpha$ und NO_2^- hat. Die Ergebnisse sind in den folgenden beiden Graphiken dargestellt (Abb.3.21. A und B)

Bei Betrachtung der Ergebnisse zeigte sich, dass MALP-2 eine von seiner Konzentration abhängige Stimulation der Makrophagen bewirkte. Erstaunlich ist, dass MALP-2 bereits in picomolaren Konzentrationen die Makrophagen zu einer gesteigerten $\text{TNF-}\alpha$ und NO_2^- -Produktion anregte. Im Gegensatz zu Octylglucopyranosid zeigte MALP-2 in den eingesetzten Konzentrationen keine zelltoxischen Eigenschaften im MTT-Assay (Abb. 3.22.)



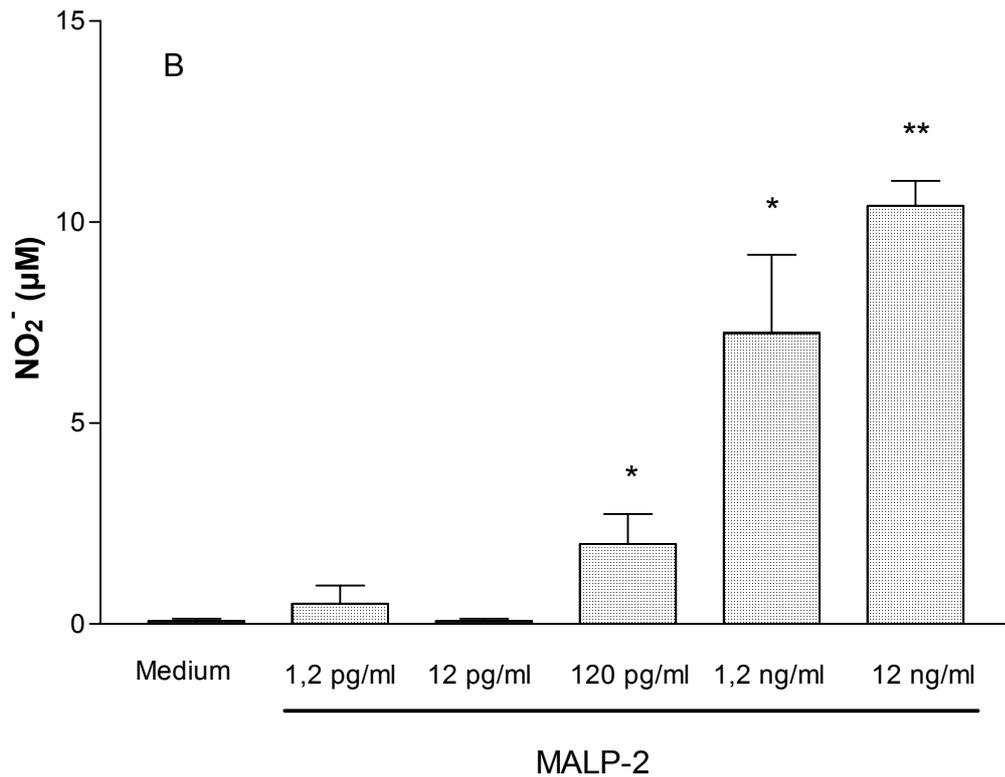


Abb.3.21.: Stimulatorischer Effekt von MALP auf die Zellen der J774 Mausemakrophagenlinie. Die Zellen wurden mit steigenden Konzentrationen MALP-2 inkubiert. Nach 6 Stunden Inkubation erfolgte die Bestimmung der $\text{TNF-}\alpha$ -(A), nach 24 Stunden die der NO_2^- -Werte(B) im Zellüberstand. Dargestellt sind die absoluten $\text{TNF-}\alpha$ und NO_2^- -Werte + S.D. von drei Bestimmungen. *:p < 0,05; **:p < 0,01 im Vergleich zur Mediumkontrolle

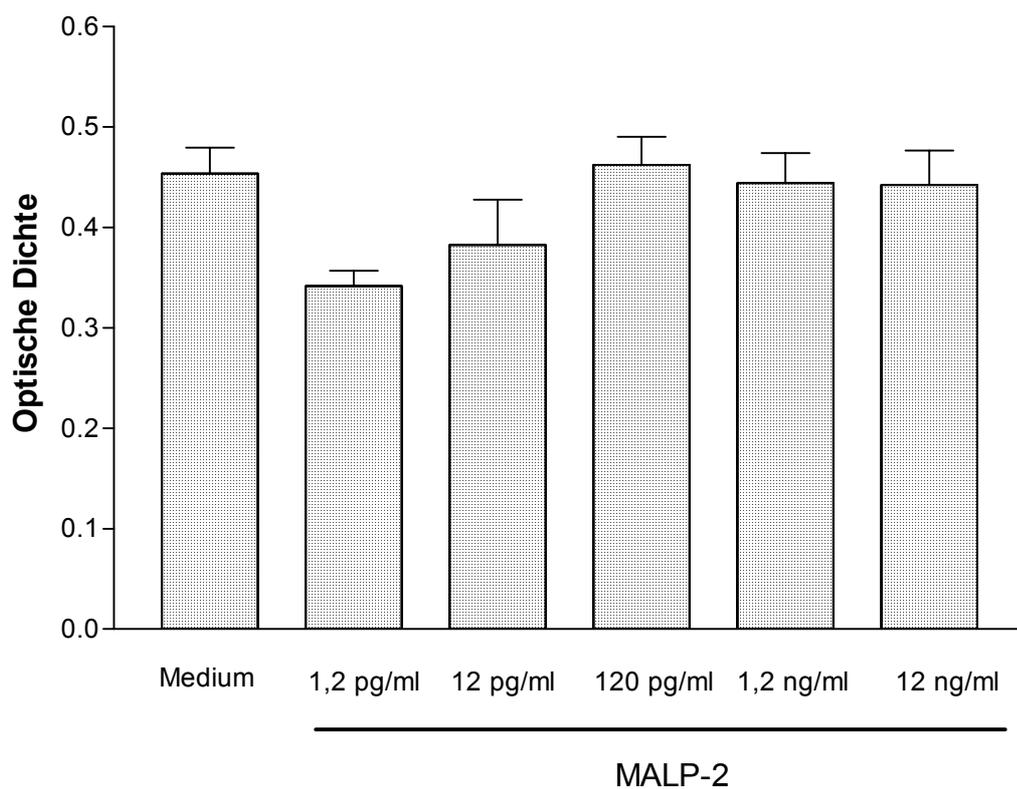


Abb. 3.22.: Effekt des MALP-2 auf die metabolische Aktivität der Mausemakrophagen. Nach 4stündiger Inkubation der Zellen mit dem MTT-Reagenz (1mg/ml) und anschließender Zellyse mit 10%igen SDS wurde die Optische Dichte der Zellsuspension gemessen. Diese korreliert mit der metabolische Aktivität der Zellen und stellt somit ein Maß für deren Vitalität dar. Je höher die Optische Dichte, desto aktiver waren die Zellen. Dargestellt sind hier die Mittelwerte+ S.D. aus drei Bestimmungen.

3.2. Inhibitionsversuche MALP-2

In den folgenden Versuchen wurde untersucht, ob die Wirkung des MALP-2 durch einen der bekannten Inhibitoren gehemmt werden kann. Von besonderem Interesse war dabei die Frage, ob Pip oder Magainin II Amid, welche die Wirkung von huHSP60 und LPS spezifisch mindern konnten, auch die Aktivierung der Makrophagen durch MALP-2 hemmen können. Bei diesen Versuchen wurden die Zellen vor Zugabe der Stimulatoren MALP-2 und LPS mit den Inhibitoren inkubiert. LPS, mit und ohne Inhibitor, wurde als Kontrolle bei allen dieser Versuche mitgeführt. Dargestellt sind in Abbildung 3.23. die Mittelwerte und Standardabweichungen der absoluten TNF- α -Werte. Bei genauerer Betrachtung wird ersichtlich, dass weder 30, noch 300 μ g/ml Pip die Stimulation der Zellen durch MALP-2 hemmen konnten. Die Wirkung des Lipopolysaccharids wurde hingegen fast vollständig durch 300 μ g/ml Pip gehemmt. Auch Mizoribine, Magainin I, II und II Amide zeigten keinen signifikant hemmenden Einfluss auf die Zellstimulation durch MALP-2. Die durch LPS angeregte TNF- α - und NO $_2^-$ -Sekretion konnte allerdings durch 100 μ g/ml Mizoribine und 10 μ g/ml Magainin II signifikant gehemmt werden.

Polymyxin B schloss sich den bereits getesteten Inhibitoren hinsichtlich ihrer fehlenden inhibitorischen Wirkung auf die Zellstimulation mit MALP-2 an.

Wie auch schon bei früheren Versuchen beobachtet, hemmten PmB als auch Magainin II Amid die Aktivierung der Zellen mit LPS konzentrationsabhängig. In diesem Versuch konnte die LPS-Wirkung durch 30 μ g/ml Polymyxin B bzw. 10 μ g/ml Magainin II Amid fast vollständig unterdrückt werden.

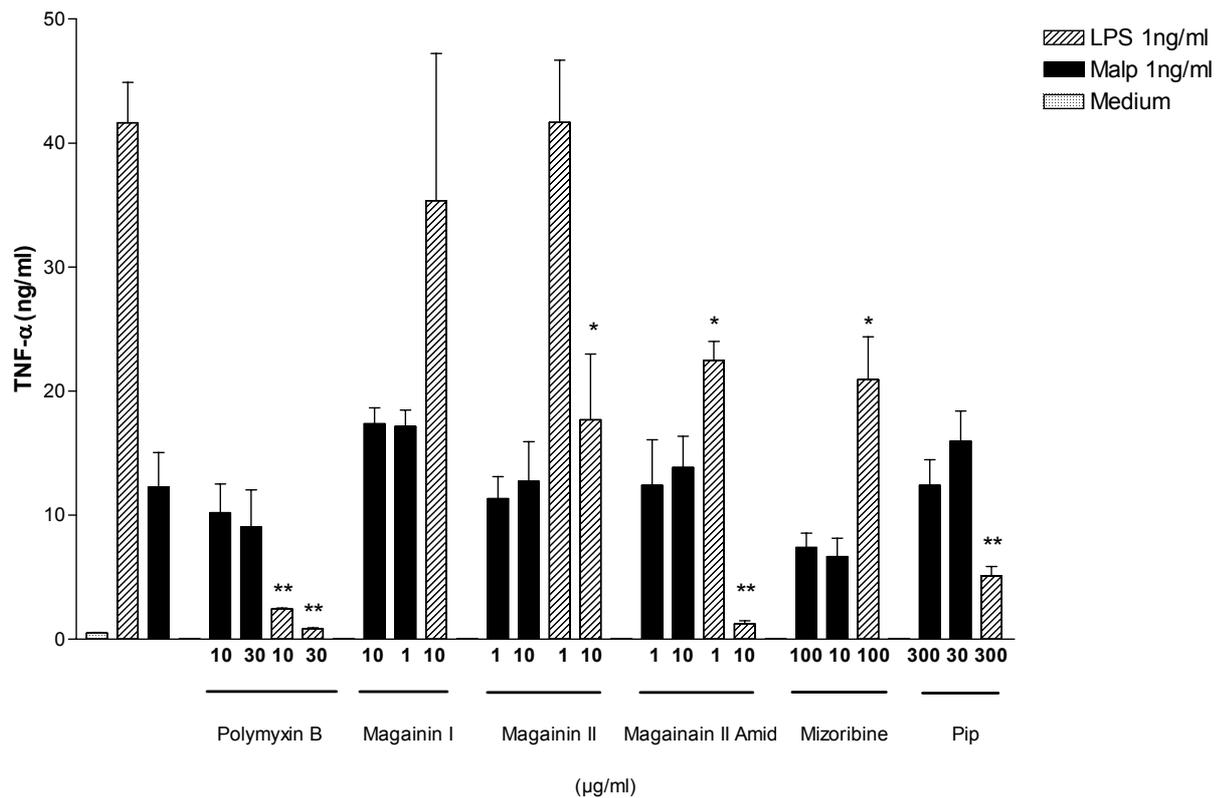


Abb. 3.23.: Wirkung von Mizoribine, Phosphatidylinositol, Magainin I ,II und II Amide auf die Stimulation von Zellen der Mausmakrophagenlinie J774 mit MALP und LPS. Die Zellen wurden mit unterschiedlichen Konzentrationen der Inhibitoren für 15min vorinkubiert, bevor die Stimulantien Malp (1ng/ml) und LPS (1ng/ml) den Zellen zugesetzt wurden. Nach 6 Stunden erfolgte die TNF- α -Bestimmung in den Zellüberständen mittels ELISA. Dargestellt sind hier die absoluten TNF- α -Werte + S.D. von drei Bestimmungen. *:p < 0,05; **:p < 0,01 im Vergleich zu LPS allein.

Nicht dargestellt sind hier die Daten der NO₂⁻-Messung.

Wie die Abbildung 3.24. verdeutlicht zeigten auch Amyloid- β -Protein, Myelin Basic Protein, C-Peptid und Octylglucopyranosid keinen Einfluss auf die Zellstimulation weder durch MALP noch durch LPS.

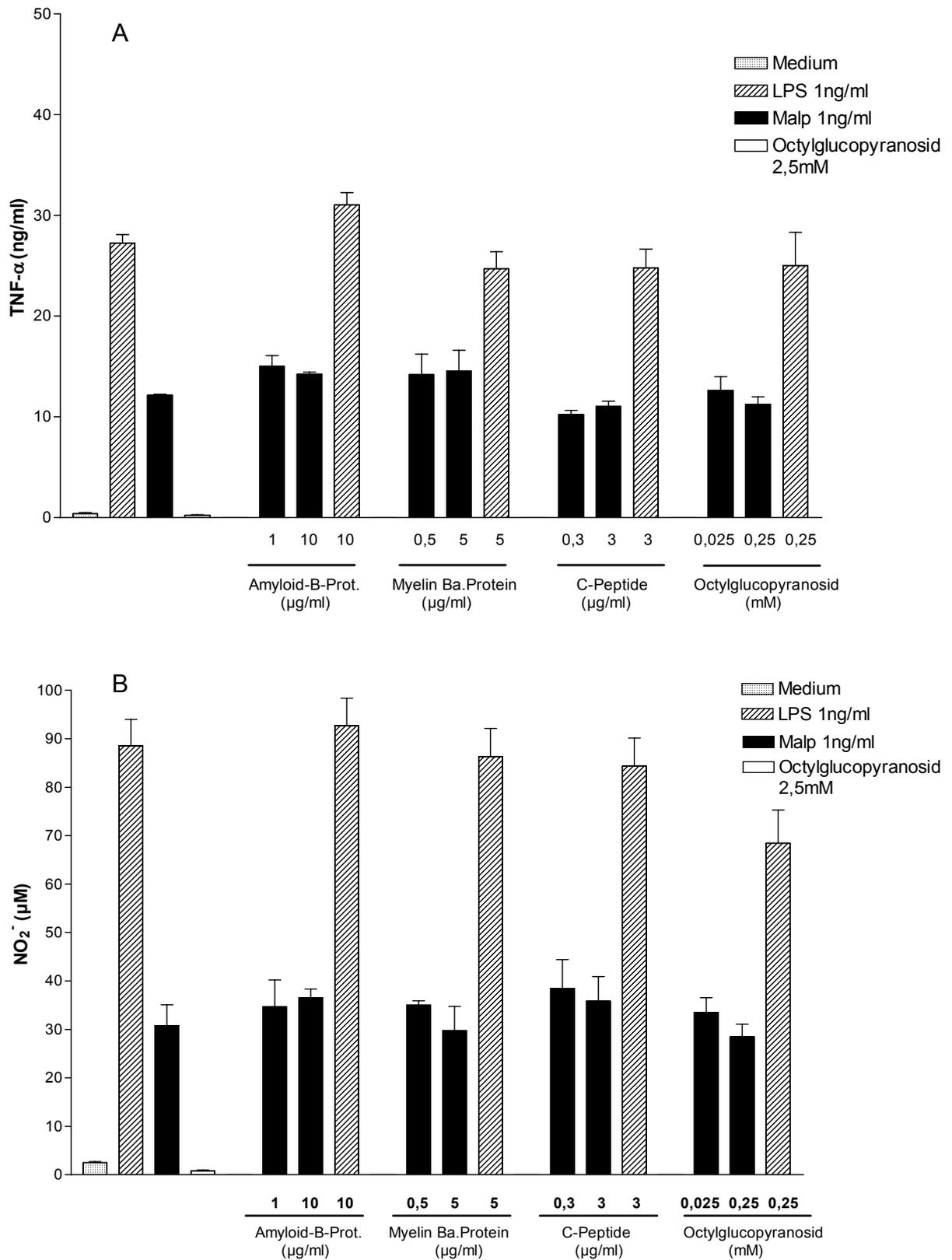


Abb.3.24.: Wirkung von Amyloid-B-Protein, Myelin Basic Protein, C-Peptid und Octylglucopyranosid auf die Stimulation von Zellen der J774-Linie mit MALP-2 und LPS. Abgebildet sind hier die TNF-α-(A) und NO₂⁻ -Werte (B) sowie deren Standardabweichung aus drei Bestimmungen. Die Zellen wurden mit den Inhibitoren für 15min vorinkubiert, bevor die Stimulantien LPS (1ng/ml) und MALP (1ng/ml) den Zellen zugesetzt wurden.

Diskussion

1. Humanes HSP 60 stimuliert murine Makrophagen

Mikrobielles HSP 60 ist ein immundominantes Antigen, das vom Immunsystem präferentiell erkannt und im Rahmen einer Immunreaktion attackiert wird (Kaufmann et al., 1990; Kaur et al., 1993; Birk et al., 1996; Melchers et al., 1997). Hitzeschockproteine (HSPs) sind hochkonservierte Proteine, die universell bei allen Organismen zu finden sind (Jindal et al., 1989; Gupta et al., 1995). Ist die Fokussierung des Immunsystems auf das mikrobielle HSP unzureichend, wird auch körpereigenes HSP attackiert. Tatsächlich sind viele Hinweise eines Angriffs des Immunsystems auf autologes HSP 60 gefunden worden. In mehreren Studien konnten spezifische T-Zellreaktionen gegen huHSP 60 nachgewiesen werden (Elias et al., 1991; de Graeff-Meeder et al. 1993 und 1995; van Roon et al., 1997). Neben dieser zellulären Komponente, wurden als Zeichen der humoralen Immunantwort auch Antikörper gegen huHSP 60 gefunden (de Graeff-Meeder et al., 1993; Schett et al., 1997; Metzler et al., 1997). Auffällig ist die hohe Peptidsequenzhomologie zwischen huHSP 60 und anderen Autoantigenen (Jones et al., 1993). Da HSP 60 in vielen Zellen des menschlichen Organismus vorhanden ist, kann eine Autoimmunantwort gegen das HSP 60 zu einer Reihe von Erkrankungen führen. Diskutiert wird die Beteiligung des HSP 60 unter anderem bei der Entstehung des Typ 1 Diabetes, der Rheumatoiden Arthritis, der Multiplen Sklerose, der Arteriosklerose und anderen chronischen Entzündungserkrankungen.

Chen et al. entdeckten 1999, dass huHSP 60 auch von Zellen des natürlichen, nicht-adaptiven Immunsystems als Antigen erkannt wird. So bewirkte die Inkubation von murinen und humanen Makrophagen mit huHSP 60 die rapide Freisetzung von proinflammatorischen Stoffen wie TNF- α und NO. Diese Reaktion konnte auch für humanen Gefäßendothel- und glatten Muskelzellen (Kol et al., 1999) beobachtet werden. Wie bereits in der Einleitung geschildert, stellen die Makrophagen und ihre Sekretionsprodukte einen wesentlichen Faktor bei der Entstehung und Progression der Entzündung der Langerhans'schen Inseln dar. HSP 60 stimuliert Makrophagen und trägt dadurch wesentlich zur Inflammation bei.

In der vorliegenden Arbeit wurde versucht, die Interaktion zwischen huHSP 60 und murinen Makrophagen der J774-Zelllinie zu spezifizieren. Dabei wurde geprüft, ob die

Aktivierung der Makrophagen mit definierten Stimulantien durch Zugabe verschiedener Inhibitionsandidaten beeinflusst werden kann.

Zunächst sollte jedoch die Funktionalität des Versuchssystems durch einige grundlegende Experimente bestätigt werden. Die Ergebnisse der SDS-Page-Gelelektrophorese und des Western Blot belegen, dass das in dieser Arbeit verwendete humane rekombinante HSP 60 tatsächlich HSP 60 ist und zudem nicht mit anderen Proteinen verunreinigt ist.

Um die stimulatorische Wirkung des huHSP 60 auf die Mausmakrophagen zu überprüfen wurden diese mit huHSP 60 inkubiert und als Aktivitätsparameter der Zellen TNF- α und NO₂⁻ im Überstand bestimmt. Die Zellüberstände wurden nach 6 (TNF- α) bzw. 24 (NO) Stunden abgenommen und ihr TNF- α - und NO₂⁻-Gehalt bestimmt. In vorherigen Studien konnte gezeigt werden, dass die durch HSP 60 induzierte TNF- α und NO-Produktion zu diesen Zeitpunkten maximal ist (Ohashi et al. 1999). TNF- α ist ein proinflammatorischer Mediator akuter Immunreaktionen, dem eine wichtige Rolle bei der Entstehung des Typ 1 Diabetes zukommt (Held et al., 1990; Mueller et al., 1995). Durch die Neutralisation von TNF- α konnte z.B. die Entwicklung eines spontanen Diabetes in NOD-Mäusen verhindert werden (Hunger et al., 1997). Auch NO ist bei der Entstehung des Typ 1 Diabetes von großer Bedeutung, konnten Kröncke et al. 1991 und 93 doch die zytotoxische Wirkung des NO auf die pankreatischen Inselzellen nachweisen. Aufgrund ihrer pathogenetischen Bedeutung und verlässlichen Nachweisbarkeit wurden TNF- α und NO bzw. NO₂⁻ in dieser Arbeit als Aktivitätsparameter der Mausmakrophagen benutzt.

Die Ergebnisse dieser Arbeit bestätigen die konzentrationsabhängige Stimulation der Mausmakrophagen durch huHSP 60. Dabei sind die durch HSP 60 induzierten TNF- α und NO₂⁻-Konzentrationen denen früherer Arbeiten vergleichbar. Die zur Stimulation der Mausmakrophagen eingesetzte huHSP 60 Konzentration liegt bei den Versuchen dieser Arbeit im Bereich zwischen 6 und 10 μ g/ml. Eine weitere Erhöhung der huHSP 60-Konzentration erschien nicht sinnvoll, da 10 μ g/ml bereits eine maximale Stimulation der Makrophagen bewirken.

Als Kontrollen wurden in dieser Arbeit LPS und ODN 1668 eingesetzt. LPS bot sich als sinnvoller Vergleichspartner zu huHSP 60 an, da es ebenfalls eine stimulierende Wirkung auf Makrophagen hat (Greisman et al., 1966; Freudenberg et al., 1988) und diese in ihrer Kinetik und ihrem Ausmaß vergleichbar zu huHSP 60 ist. LPS wurde

zur optimalen Stimulation der Zellen in den Konzentrationen 1 und 10ng/ml eingesetzt.

ODN 1668 führt auf völlig andere Art und Weise als LPS zur Aktivierung von Makrophagen, was seinen Einsatz als zusätzliche Kontrolle neben LPS rechtfertigt.

ODN 1668 ist ein synthetisches Oligodesoxynucleotid, das eine unmethylierte CpG-Sequenz beinhaltet. Diese CpG-Sequenz wurde von Krieg et al. 1995 als eine biologisch aktive Nucleotidsequenz beschrieben. Tatsächlich ist dieses CpG ODN in der Lage die Zellen des angeborenen Immunsystems, wie zum Beispiel Makrophagen und dendritische Zellen stark zu stimulieren (Stacy et al., 1996, Lipford et al., 1997; Sparwasser et al., 1997). Dieses Ergebnis ist auch in dieser Arbeit bestätigt worden, zeigt das ODN 1668 doch eine konzentrationsabhängige Stimulation der J774 Mausmakrophagen zur TNF- α und NO-Freisetzung. Der molekulare Mechanismus, der zur Aktivierung von Makrophagen durch CpG-ODN führt, wurde im Laufe der letzten Jahren genauer untersucht. Erste Hinweise für die Interaktion zwischen Oligodesoxynucleotiden und Makrophagen konnten Loke et al. bereits 1988 gewinnen, als sie demonstrierten, dass ODNs aktiv über einen endozytotischen Prozess in die Zelle aufgenommen werden. Häcker et al. zeigten zehn Jahre später, dass CpG-DNA unspezifisch an Zelloberflächenproteine gebunden und anschließend in endosomalen Vesikeln in die Zelle eingeschleust wird, und dass die in die Zelle aufgenommene CpG-ODN zu einer spezifischen Aktivierung des Stress-Kinase-Pathway führt. In neueren Studien konnte gezeigt werden, dass die Aktivierung der Immunzellen durch CpG DNA über einen Toll-like receptor, TLR9, vermittelt wird (Hemmi et al., 2000).

2. Inhibitionsexperimente

HuHSP 60 stimuliert Makrophagen zur Produktion von proinflammatorischen Zytokinen und Sauerstoffradikalen. Bislang ist der Mechanismus dieser Interaktion nicht bekannt. Anhand von Inhibitionsversuchen sollte versucht werden, einen Antagonisten zu HSP 60 zu finden, um so die Interaktion zwischen huHSP 60 und murinen Makrophagen der J774-Zelllinie zu spezifizieren.

2.1. Mizoribin bewirkt eine unspezifische Hemmung der Makrophagenstimulation

Mizoribin ist ein neuartiges Imidazol-Nucleosid, das aufgrund seiner immunsuppressiven Wirkung v.a. in Japan in der Klinik zur Verhinderung von Abstoßungsreaktionen nach Organtransplantationen und zur Therapie von Autoimmunerkrankungen wie z.B. dem Lupus erythematodes oder der Rheumatoiden Arthritis eingesetzt wird. Der molekulare Wirkmechanismus des Mizoribin besteht in der Unterbindung der Synthese von Guanin-Nucleotiden durch die kompetitive Hemmung der Inosin-5'-Monophosphat-Dehydrogenase (IMPDH) (Halloran, 1996; Suthanthiran et al., 1996; Burkhardt & Kalden, 1997). Mizoribin bindet dabei an die Substratseite der IMPDH (Goldstein & Colby, 1999).

Die intrazelluläre Erschöpfung der Guanin-Nucleotide bewirkt neben der Hemmung der DNA-Replikation (Catapano et al. 1995) eine Verminderung wichtiger energetischer Verbindungen (GTP) in der Zelle und dadurch eine Störung der normalen Zellfunktion (Kamada et al., 1997).

Interessanterweise konnten Itoh et al. 1999 zeigen, dass Mizoribin mit hoher Affinität an HSP 60 bindet. Diese Beobachtung machte Mizoribin zu einem interessanten Inhibitions Kandidaten in dieser Arbeit. Es stellte sich nun die Frage, ob Mizoribin durch Zugabe zu den Zellen in der Lage ist, die Aktivierung der Makrophagen durch huHSP60 spezifisch zu hemmen. Die Ergebnisse dieser Arbeit verdeutlichen, dass Mizoribin die durch huHSP 60 induzierte Freisetzung von TNF- α und NO signifikant vermindern kann, dieser Effekt jedoch nicht allein für die Stimulation mit huHSP 60, sondern auch mit LPS und 1668 zu beobachten ist. Dieses Ergebnis belegt einen unspezifischen Hemmeffekt von Mizoribin auf die Stimulation der Makrophagen.

Wie die Ergebnisse des MTT-Assays veranschaulichen, ist dieser Effekt nicht mit einer Verminderung der Zellvitalität zu begründen. Der genaue molekulare Hintergrund dieses unspezifischen Hemmeffektes ist nicht bekannt. Denkbar ist jedoch, dass die durch Mizoribin verursachte Verminderung des GTP-Gehaltes der Zelle diese reduzierte Zellreaktivität verursacht. Auch andere Mechanismen sind denkbar, so zeigten Takahasi et al kürzlich, dass Mizoribin 14-3-3 Proteine bindet, welche ihrerseits mit einer Vielzahl von Proteine interagieren, die an der zelluläre Signaltransduktion beteiligt sind (Takahasi et al., 2000). Die Beeinflussung der zellulären Signaltransduktion ist demnach ein möglicher Wirkmechanismus des

Mizoribin, der die unspezifische Hemmung erklären könnte. Vermutlich ist dieser Mechanismus auch dafür verantwortlich, dass der Hemmeffekt des Mizoribine nur für die Freisetzung von TNF- α , nicht aber für die des NO nachweisbar ist.

2.2. Test verschiedener Peptide auf mögliche Hemmung der Aktivierung von Makrophagen durch huHSP 60

2.2.1 Myelin Basisches Protein und Amyloid- β -Protein

Das Myelin Basische Protein (MBP) ist ein wesentlicher Bestandteil der Myelinscheiden, die im Rahmen einer chronischen Entzündung bei der MS zerstört werden. Das Myelin, bzw. bestimmte Bestandteile von diesem werden dabei vom Immunsystem als Antigen erkannt und angegriffen. Ein Hauptmechanismus bei diesem Vorgang ist die Phagozytose des Myelin durch Makrophagen (Smith et al., 1998). Untersuchungen in der Vergangenheit zeigten, dass bestimmte Myelinproteine, wie zum Beispiel das Myelin P2 in der Lage sind humane Makrophagen zur Produktion proinflammatorischer Zytokine wie TNF- α , IL-1 β und IL-8 zu stimulieren (Baron et al., 1993). Interessanterweise konnten Birnbaum et al., 1996 zeigen, dass einige Myelin-Proteine Sequenzhomologien zu bestimmten Hitzeschockproteinen aufweisen. Zum Beispiel zeigten sie dies für das mykobakterielle HSP 65 und das Myelinprotein CNP. Diese Beobachtung würde die zellulären und humoralen Immunreaktionen gegen das eigene Myelin als Kreuzreaktion erklären (Birnbaum et al., 1997). Das heißt, dass die ursprünglich gegen endogenes bzw. exogenes HSP gerichtete Immunabwehr aufgrund der Ähnlichkeit bestimmter Myelinproteine mit HSPs irrtümlich auch gegen das eigene Myelin gerichtet ist.

Die stimulatorischen Eigenschaften und Sequenzhomologien zu HSP einiger Myelinproteine, machten das MBP als wesentlicher Bestandteil der Myelinscheiden zu einem interessanten Inhibitions kandidaten dieser Arbeit. Wie Abbildung 3.18. verdeutlicht, zeigte das MBP jedoch keine inhibitorische Wirkung auf die Zellstimulation mit huHSP60 oder mit LPS, was zu der Annahme führt, dass huHSP 60 und das MBP auf unterschiedlichen Wegen mit den murinen Makrophagen interagieren.

Der Morbus Alzheimer ist die häufigste Ursache der Demenz. Die für diese Erkrankung typischen senilen Plaques im ZNS beinhalten vor allem Amyloid- β -Protein (ABP), reaktive Mikrogliazellen und Astrozyten. Meda et al. konnten 1995 zeigen, dass ABP in der Lage ist Mikrogliazellen zur Produktion von TNF- α und NO zu stimulieren. Shalit et al. beobachteten diesen Effekt auch bei murinen Makrophagen der J774-Zelllinie (Shalit et al., 1997). Auch die Produktion von Interleukin-8 bei humanen Monozyten konnte auf die Stimulation mit ABP zurückgeführt werden (Meda et al., 1995 b). Neueste Studien zeigen zudem eine gesteigerte Superoxidanionen-Produktion in Mikrogliazellen von Hamstern und humanen Makrophagen, die für 24 h ABP ausgesetzt waren (Colton et al., 2000). Colton et al. vermuten dabei eine rezeptorvermittelte Interaktion zwischen ABP und den Mikrogliazellen bzw. Makrophagen. Diese Vermutung wird von Van Muiswinkel et al. gestützt, die eine Bindung des ABP an Makrophagen als entscheidende Voraussetzung für die Aktivierung der Makrophagen sehen (Van Muiswinkel et al., 1999). Führt ABP zu einer Hemmung der Makrophagenaktivierung durch huHSP 60, könnte der Vergleich der Peptidsequenzen Aufschluss über eine mögliche Bindungsstelle des huHSP 60 an Makrophagen geben. Das ABP hatte jedoch keinen hemmenden Einfluss auf die Zellaktivierung mit huHSP60.

2.2.2. C-Peptid

Das C-Peptid, ein Spaltprodukt der Verarbeitung von Proinsulin zu Insulin, galt lange Zeit als biologisch inaktives Peptid. Erst in den letzten Jahren konnten nützliche Eigenschaften des C-Peptid auf das diabetische Krankheitsgeschehen nachgewiesen werden. Zum Beispiel zeigten Ido et al., dass humanes C-Peptid in der Lage ist vaskuläre und neuronale Dysfunktionen in diabetischen Ratten zu verhindern (Ido et al., 1997). Ido et al. vermuteten, dass dieser Effekt des C-Peptid eher durch nonchirale Membraninteraktionen, als durch stereospezifische Rezeptorbindungsstellen vermittelt wird.

Interessanterweise beobachteten Rigler et al. im Gegensatz zu Ido's Vermutung, dass das C-Peptid spezifisch an membrangebundene Rezeptoren einer Vielzahl unterschiedlicher humaner Zellen (Nierentubuluszellen, Fibroblasten, Endothelzellen) bindet (Rigler et al., 1999). Das C-terminale Pentapeptid war dabei in der Lage das

membrangebundene C-Peptid aus seiner Bindung zu verdrängen, was die Bedeutung dieses Segments als Bindungsligand des C-Peptid herausstellte.

Wie die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, ist das C-Peptid jedoch nicht in der Lage die durch huHSP 60 induzierte TNF- α und NO-Produktion in Mausmakrophagen zu beeinflussen, was gegen ähnliche Bindungsstellen bzw. Interaktionsweisen von huHSP 60 und C-Peptid auf murinen Makrophagen spricht.

2.2.3. SBP (Peptid I)

GroEL ist das bakterielle Homolog zu huHSP 60. Es gleicht diesem in Struktur und Funktion. 1994 identifizierten Chen und Mitarbeiter mit Hilfe der Kryoelektronenmikroskopie die apikale Domäne des GroEL als dessen Substratbindungsstelle. Das heißt, dass an dieser Stelle die zu faltenden Proteine an das GroEL binden. 1999 wurde von Chen et al. ein Protein gefunden, welches mit sehr hoher Affinität (K im unteren Micromolarbereich) an diese Bindungsstelle des GroEL bindet. Dieses Peptid heißt SBP und besitzt die folgende Aminosäuresequenz: SWMTTPWGFLHP.

Wie die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, führte die Inkubation der J774-Mausmakrophagen mit dem SBP zu keiner bemerkenswerten Beeinflussung der huHSP 60-Reaktivität. Dieser Befund legt die Vermutung nahe, dass die Substratbindungsstelle des huHSP 60 nicht wesentlich an der Interaktion zwischen huHSP 60 und den Mausmakrophagen beteiligt ist. Diese Vermutung ist jedoch nur unter der Voraussetzung denkbar, dass das SBP auch eine hohe Affinität zu der Substratbindungsstelle des humanen HSP 60 aufweist, was aufgrund der großen Ähnlichkeit zwischen GroEL und huHSP 60 zu erwarten ist.

2.2.4. VSV-C

Das Peptid vsv-C sollte als nächster Kandidat überprüft werden. Für dieses Peptid mit der Aminosäuresequenz: KLIGVLSSLFRPK, ist bekannt, dass es ebenfalls an GroEL bindet.

Auch dieses Peptid konnte die Stimulation der Mausmakrophagen mit huHSP60 nicht beeinflussen. Dieses Ergebniss lässt vermuten, dass die von vsv-C besetzte

Bindungsstelle an GroEL bzw. huHSP 60 nicht wesentlich an der Aktivierung der Mausmakrophagen durch huHSP60 beteiligt ist.

2.2.5. ADNF-14

Der ADNF konnte von Brenneman et al., als ein von Gliazellen freigesetztes neuroprotektives Protein identifiziert werden (Brenneman et al., 1996). Genauere Untersuchungen ergaben, dass ein 14 Aminosäuren umfassendes Peptid des ADNF, der ADNF-14, für die neuroprotektive Wirkung verantwortlich ist. Erstaunlicherweise weist der ADNF-14 eine große Homologie zu einem Peptid des HSP 60 von Ratten auf.

ADNF-14:	VLGGGSALLRSIPA
HSP 60-Peptid:	VLGGGCALLRCIPA

Der Vergleich der Aminosäuresequenzen verdeutlicht den geringen Unterschied dieser beiden Peptide. Lediglich zwei Cysteinreste im ADNF-14 sind durch Serinreste im HSP 60 Peptid vertauscht. Dieser geringe Unterschied in der Aminosäuresequenz hat jedoch funktionelle Folgen. So konnten Brenneman et al. zeigen, dass das HSP 60 Peptid im Vergleich zu ADNF-14 nur minimale neuroprotektiv wirkt.

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass der ADNF-14 den stimulierenden Effekt des huHSP 60 nicht hemmen kann, was zu der Annahme führt, dass das dem ADNF-14 homologe HSP-60-Peptid nicht an der Interaktion zwischen HSP 60 und Makrophagen beteiligt ist.

2.3. Können Defensine die Makrophagenstimulation durch HSP 60 beeinflussen?

Defensine sind kationische antimikrobielle Peptide, die eine wichtige Komponente der angeborenen Immunabwehr von Pflanzen und Tieren darstellen (Hancock et al., 1999). Viele dieser Peptide, wie zum Beispiel das Magainin (Zasloff, 1987) töten Mikroorganismen durch die Perforation der mikrobiellen Zellmembranen.

In dieser Arbeit sollte die Wirkung drei verschiedener Magainine auf die Makrophagenaktivierung durch huHSP 60 überprüft werden. Die Struktur der benutzten Magainine ist im folgenden dargestellt:

1.....5.....10.....15.....20	
G I G K F L H S A G K F G K A F V G E I M K S	Magainin I
G I G K F L H S A K K F G K A F V G E I M N S	Magainin II
G I G K F L H A A K K F A K A F V A E I M N S-NH₂	Magainin II(Amid)

Der Unterschied zwischen Magainin I und II besteht in dem Austausch zweier Aminosäuren in Position 10 und 20. Magainin II Amid besitzt im Vergleich zu Magainin II eine zusätzliche Aminogruppe.

Obwohl Magainin I keinen und Magainin II im Vergleich zu Magainin II Amid nur einen schwachen Effekt auf die Stimulation der Makrophagen zeigten, war Magainin II Amid in der Lage die durch huHSP 60 und LPS induzierte TNF- α - und NO-Bildung der Mausmakrophagen signifikant zu hemmen. Der stimulatorische Effekt des ODN 1668 blieb von Magainin II Amid hingegen völlig unberührt. Dieses Versuchsergebnis zeigt somit eine für LPS und huHSP 60 signifikante und selektive Hemmung der Makrophagenaktivierung durch Magainin II Amid. Wie ist dieses Ergebnis zu erklären?

Antimikrobielle Peptide, wie das Magainin, vernichten Bakterien durch Permeabilisation und Zerstörung ihrer Zellmembranen. Dies konnte an künstlichen Lipidmembranen nachgewiesen werden (Cruciani et al., 1992; Duclouhier et al., 1989). Dabei binden sie aufgrund ihrer positiven Ladung an die äußere Membran der bakteriellen Zellwand bevor sie ihr eigentliches Ziel die Zellmembran erreichen. Im Falle Gram-negativer Bakterien besteht das äußere Blatt der äußeren Membran der Zellwand zum größten Teil aus LPS, so dass eine initiale Interaktion zwischen Magainin und LPS sehr wahrscheinlich ist. Und tatsächlich demonstrierten Rana et al. 1989 die Bindung von Magainin II Amid an das LPS von *Salmonella typhimurium*. Zwei Jahre später entdeckte Rana, dass Magainin II die Fettsäurekettenanordnung des Lipid A-Anteils des LPS in Unordnung bringt, wobei der Grad der Unordnung umso größer war, je negativer das LPS geladen war. Auch für Magainin I wird in *E.coli* das LPS als initiale Bindungsstelle angesehen (Vorland et al., 1999). In jüngeren Untersuchungen konnte die Bindung des Magainin an das LPS spezifiziert werden. So zeigten Matsuzaki et al. anhand künstlicher Membransysteme, dass Magainin II bei der Bindung an LPS eine amphibische Helix bildet (Matsuzaki et al., 1999).

Anhand des LAL-Assays sollte in dieser Arbeit der Effekt der Magainine auf die biologische Aktivität des LPS genauer untersucht werden. Die Ergebnisse verdeutlichen, dass Magainin I, II und II Amid mit LPS interagieren, vermutlich an dieses binden, und so die biologische Aktivität des LPS konzentrationsabhängig blockieren. Dieses Ergebnis erklärt den im Inhibitionsversuch beobachteten, hemmenden Effekt des Magainin II Amid auf die Aktivierung der J774-Makrophagen mit LPS. Widersprüchlich ist jedoch der Effekt von Magainin I und II in LAL- und Inhibitionsassay. Im LAL-Assay zeigen diese beiden eindrucksvoll die Fähigkeit LPS zu inaktivieren, im Inhibitionsexperiment ist dieser Trend jedoch bei Magainin I nicht und bei Magainin II nur relativ schwach ausgeprägt. Wie ist dieses Ergebnis zu begreifen? Der biologisch aktive Anteil des LPS ist das Lipid A (Rietschel et al., 1994). Das Lipid A ist hochkonserviert und besteht im wesentlichen aus einem Glucosamid-Dissacharid und den daran haftenden vier mittel- bis langkettigen Fettsäuren. Zusätzlich sind ein bis zwei Phosphatgruppen mit dem Diglucosamid verknüpft. Denkbar ist, dass die Stimulation der Makrophagen und die Aktivierung des Proenzym im LAL-Assay durch unterschiedliche Anteile des Lipid-A bewerkstelligt werden, und dass die einzelnen Magainine an verschiedene Stellen des Lipid-A binden und diese dadurch blockieren. So ist zu vermuten, dass Magainin I nur die für die LAL-Interaktion bedeutende Stelle des Lipid A blockiert, Magainin II Amid hingegen zusätzlich die Stelle, die für die Aktivierung der Makrophagen verantwortlich ist. Magainin II würde demnach die für die LAL-Interaktion verantwortliche Stelle komplett und die für die Makrophagenaktivierung zuständige Stelle nur inkomplett blockieren.

Sehr interessant erschien nun die Frage, wie das Magainin II Amid die huHSP 60-Reaktivität fast vollständig unterdrückt. Nachdem wir festgestellt hatten, dass das Magainin II Amid mit LPS interagiert und dessen biologische Aktivität hemmt, war die naheliegendste Erklärung für die Verminderung der huHSP 60 Reaktivität durch Magainin II Amid eine Kontamination des huHSP 60 mit LPS.

Zur Überprüfung dieser Vermutung wurde Polymyxin B als Endotoxinhemmstoff verwendet. Das kationische Polypeptid Polymyxin B bindet an die Lipid-A-Region des LPS und verhindert somit dessen makrophagenaktivierende Wirkung (Morrison et al., 1976). Die Ergebnisse in Abbildung 3.5 verdeutlichen, dass das huHSP 60 nicht in nennenswerten Mengen mit LPS verunreinigt ist. Während 10µg/ml Polymyxin B ausreichten die stimulatorische Wirkung von LPS vollständig (1 und 10 ng/ml LPS)

bzw. fast vollständig (1000 ng/ml LPS) aufzuheben, wurde die makrophagenstimulatorische Wirkung von huHSP 60 dadurch nicht signifikant gemindert. Erstaunlicherweise konnte Chen in seiner Dissertation 1998 10 ng/ml LPS bereits mit einer PmB-Konzentration von nur 0,1 µg/ml vollständig inaktivieren. Dieser Unterschied könnte durch die 2-stündige und damit im Vergleich zu dieser Arbeit doppelt so langen Inkubationszeit des PmB mit LPS, huHSP 60 und 1668 begründet sein. Obwohl Verstovsek et al. (1993) zeigten, dass 10 µg/ml PmB für einige Tumorzelllinien zytotoxisch sind, ließ in dieser Arbeit selbst eine Konzentration von 30 µg/ml PmB keine Verminderung der Zellvitalität im Mtt-Assay erkennen. Des Weiteren konnte im Rahmen unveröffentlichter Versuche die stimulatorische Aktivität des huHSP 60 durch Erhitzen (Chen et al., 1999) und Behandlung mit Proteasen (Akiyama, unpubliziert) aufgehoben werden. Die Wirkung des LPS blieb durch diese Behandlung jedoch völlig unbeeinflusst. Diese Ergebnisse verdeutlichen, dass die stimulatorische Aktivität des in dieser Arbeit eingesetzten huHSP 60 nicht auf eine Kontamination mit bakteriellem Endotoxin zurückzuführen ist.

Die Fähigkeit des Magainin II Amid LPS zu inaktivieren und die zellstimulierende Eigenschaft des huHSP 60 zu hemmen, ohne dass diese durch eine Kontamination mit LPS zu erklären ist, legt die Vermutung nahe, dass huHSP 60 mittels einer LPS-ähnlichen Oberflächenstruktur die Aktivierung der Mausmakrophagen bewirkt. Auch das Magainin II scheint diese Oberflächenstruktur zu erkennen, tut dies jedoch nicht so potent wie das Amid. Dieses Ergebnis lässt eine bedeutende Funktion der Amid-Gruppe bei der Interaktion mit der postulierten LPS-ähnlichen Oberflächenstruktur erkennen. Denkbar ist, dass die vermehrt positive Nettoladung des Magainin II Amid die Bindung an die huHSP 60-Oberfläche begünstigt und dadurch der stärkere Hemmeffekt des Magainin II Amid zu erklären ist. Diese Vermutung wird durch die Beobachtung gestützt, dass mit zunehmender positiver Ladung die antimikrobielle Potenz des Magainin zunimmt (Matsuzaki et al., 1997).

Unter Berücksichtigung dieser Hypothese stellte sich nun die Frage, ob das huHSP 60 unter Verwendung desselben Rezeptorsystems wie LPS zu einer Stimulation der Zellen führt.

Neueste Studien ergaben, dass die LPS vermittelte Makrophagenaktivierung durch das Zusammenspiel von CD14, MD-2 und TLR-4 mediiert wird. Das humane MD-2 Molekül ist dabei mit der extrazellulären Domäne des TLR-4 assoziiert und bewirkt eine Verstärkung des LPS-Signals. CD-14 bindet an LPS und erleichtert so die

Signaltransduktion über den TLR-4-MD-2-Komplex. Das Membranphospholipid Phosphatidylinositol agiert als LPS-Antagonist in der Signaltransduktion über den TLR4-MD-2-Komplex (Akashi et al., 2000). Dabei bindet es an das membrangebundene CD14 und verhindert so die Aktivierung der Makrophagen durch LPS (Wang et al., 1998).

Wenn huHSP 60 die Makrophagen der J774 Zelllinie ebenfalls durch die Interaktion mit CD14 und dem hTLR-4-MD-2-Komplex aktiviert, dann müsste auch dieser Effekt durch Pip hemmbar sein.

Vor diesem Hintergrund wurde Pip zur Untersuchung seines Einflusses auf die Aktivierung der Zellen mit huHSP 60 eingesetzt. Die Ergebnisse dieses Versuches zeigen, dass die stimulatorische Wirkung der Kontrolle, LPS, erwartungsgemäß durch Pip konzentrationsabhängig gehemmt wurde. Überraschenderweise konnte dieses Ergebnis auch für huHSP60 beobachtet werden. Die Stimulation durch 1668 blieb hingegen von Pip unberührt. Um die Möglichkeit auszuschließen, dass Pip an LPS oder LPS-ähnliche Strukturen bindet und so seine inhibitorische Wirkung entfaltet, wurde Pip ebenfalls in den LAL-Assay eingesetzt. Hier zeigte sich, dass Pip nicht in der Lage ist das LPS zu inaktivieren. Somit ist die Wirkung des Pip nicht auf eine Interaktion mit LPS zurückzuführen, sondern eher auf die Interaktion mit den membranständigen Proteinen CD-14 und dem TLR4-MD-2 Komplex.

Dieses wichtige Ergebnis lässt darauf schließen, dass huHSP 60, die Makrophagen durch eine Interaktion mit CD14 und dem TLR4-MD-2 Rezeptorkomplex aktiviert. Diese Vermutung wird durch die von Ohashi et al. erst kürzlich gemachte Beobachtung gestützt, dass Makrophagen von C3H/HeJ Mäusen, die eine Mutante des Toll-like-receptors 4 tragen, nicht durch Hsp 60 zu stimulieren sind (Ohashi et al., 2000). Durch Antikörper gegen CD 14 konnte die stimulierende Wirkung des huHSP 60 auf humane Makrophagen unterdrückt werden (Kol et al., 2000). Diese Ergebnisse verdeutlichen die fundamentale Rolle von CD14 und dem TLR4-MD-2 Komplex bei der Aktivierung von mononukleären Zellen und Makrophagen durch humanes HSP 60.

Ein weiteres Defensin, das HNP-1, wurde in dieser Arbeit als Inhibitions kandidat eingesetzt. Dieses zeigte keinen hemmenden Effekt auf die Makrophagenstimulation mit huHSP 60, LPS oder ODN 1668. Damit steht dieses Ergebnis im Widerspruch zu den Beobachtungen von Scott und seinen Mitarbeitern (Scott et al., 2000). Diese

zeigten, dass HNP-1 die Bindung von LPS an das LBP blockiert und so die LPS induzierte TNF- α -Produktion von murinen Makrophagen der RAW 264.7 Zelllinie verhindert.

HNP-1 ist wie Magainin ein positiv geladenes antimikrobielles Peptid. Die Unfähigkeit des HNP-1 die Zellreaktivität gegenüber huHSP 60 zu hemmen unterstreicht die besondere Stellung des Magainin II Amid bezüglich dieser Eigenschaft.

2.4. MALP-2 als zusätzliches Kontrollsystem

Zur Kontrolle der Spezifität der gefundenen Ergebnisse, sollte ein zusätzliches Kontrollsystem etabliert werden. Das MALP-2 ist ein geeigneter Kontrollkandidat, da es zu einer von CD14 und TLR-4-MD-2 unabhängigen Stimulation von Makrophagen führt. Takeuchi et al. konnten erst kürzlich nachweisen, dass Malp Immunzellen vornehmlich über den Toll-like-receptor-2 aktiviert (Takeuchi et al., 2000). Die Ergebnisse belegen, dass MALP-2 zu einer konzentrationsabhängigen Stimulation der TNF- α und NO-Produktion in den Mausmakrophagen der J774-Zelllinie führt. Die Inkubation der Zellen mit Magainin I, II, II Amid und Pip ließen keinen Effekt auf die Stimulation der Zellen mit MALP-2 im Vergleich zur Positivkontrolle (MALP-2 alleine) erkennen. Magainin II und II Amid sowie Pip hemmten die im Vergleich zu MALP-2 mit LPS stimulierten Mausmakrophagen.

Dieses Ergebnis verdeutlicht, dass der inhibitorische Effekt des Magainin II Amid auf die Stimulation der J774-Zellen mit huHSP60 für dieses spezifisch ist. Somit wird hier die Hypothese gestützt, dass Magainin II Amid eine LPS-ähnliche Oberflächenstruktur auf huHSP 60 erkennt und blockiert und so dessen Interaktion mit den Makrophagen über den CD14-TLR-4-MD-2 Komplex unterbindet.

Literaturverzeichnis

Akashi S. Ogata H. Kirikae F. Kirikae T. Kawasaki K. Nishijima M. Shimazu R. Nagai Y. Fukudome K. Kimoto M. Miyake K. Regulatory roles for CD14 and phosphatidylinositol in the signaling via toll-like receptor 4-MD-2. *Biochemical & Biophysical Research Communications*. 268:172-7, 2000

Akashi S. Shimazu R. Ogata H. Nagai Y. Takeda K. Kimoto M. Miyake K. Cutting edge: cell surface expression and lipopolysaccharide signaling via the toll-like receptor 4-MD-2 complex on mouse peritoneal macrophages. *Journal of Immunology*. 164:3471-5, 2000

Anderton SM. van der Zee R. Goodacre JA. Inflammation activates self hsp60-specific T cells. *European Journal of Immunology*. 23:33-8, 1993

Appelmek BJ. An YQ. Geerts M. Thijs BG. de Boer HA. MacLaren DM. de Graaff J. Nuijens JH. Lactoferrin is a lipid A-binding protein. *Infection & Immunity*. 62:2628-32, 1994

Appels B. Burkart V. Kantwerk-Funke G. Funda J. Kolb-Bachofen V. Kolb H. Spontaneous cytotoxicity of macrophages against pancreatic islet cells. *Journal of Immunology*. 142:3803-8, 1989 Jun 1

Arnold-Schild D. Hanau D. Spehner D. Schmid C. Rammensee HG. de la Salle H. Schild H. Cutting edge: receptor-mediated endocytosis of heat shock proteins by professional antigen-presenting cells. *Journal of Immunology*. 162:3757-60, 1999

Baekkeskov S. Aanstoot HJ. Christgau S. Reetz A. Solimena M. Cascalho M. Folli F. Richter-Olesen H. DeCamilli P. DeCamilli P. Identification of the 64K autoantigen in insulin-dependent diabetes as the GABA-synthesizing enzyme glutamic acid decarboxylase. *Nature*. 347:151-6, 1990

Barnett AH. Eff C. Leslie RD. Pyke DA. Diabetes in identical twins. A study of 200 pairs. *Diabetologia*. 20:87-93, 1981

Baron P, Constantin G, D'Andrea A, Ponzin D, Scarpini E, Scarlato G, Trinchieri G, Rossi F, Cassatella MA. Production of tumor necrosis factor and other proinflammatory cytokines by human mononuclear phagocytes stimulated with myelin P2 protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 90:4414-8, 1993

Becker J. Craig EA. Heat-shock proteins as molecular chaperones. *European Journal of Biochemistry*. 219:11-23, 1994

Binder RJ. Harris ML. Menoret A. Srivastava PK. Saturation, competition, and specificity in interaction of heat shock proteins (hsp) gp96, hsp90, and hsp70 with CD11b+ cells. *Journal of Immunology*. 165:2582-7, 2000

Birk OS. Elias D. Weiss AS. Rosen A. van-der Zee R. Walker MD. Cohen IR. NOD mouse diabetes: the ubiquitous mouse hsp60 is a beta-cell target antigen of autoimmune T cells. *Journal of Autoimmunity*. 9:159-66, 1996

Birk OS. Elias D. Weiss AS. Rosen A. van-der Zee R. Walker MD. Cohen IR. NOD mouse diabetes: the ubiquitous mouse hsp60 is a beta-cell target antigen of autoimmune T cells. *Journal of Autoimmunity*. 9:159-66, 1996

Birnbaum G. Kotilinek L. Heat shock or stress proteins and their role as autoantigens in multiple sclerosis. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 835:157-67, 1997

Birnbaum G. Kotilinek L. Immunity to heat shock proteins and neurological disorders of women. *Infectious Diseases in Obstetrics & Gynecology*. 7:39-48, 1999

Birnbaum G. Kotilinek L. Schlievert P. Clark HB. Trotter J. Horvath E. Gao E. Cox M. Braun PE. Heat shock proteins and experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE): I. Immunization with a peptide of the myelin protein 2',3' cyclic nucleotide 3' phosphodiesterase that is cross-reactive with a heat shock protein alters the course of EAE. *Journal of Neuroscience Research*. 44:381-96, 1996

Birnbaum G. Stress proteins: their role in the normal central nervous system and in disease states, especially multiple sclerosis. *Springer Seminars in Immunopathology*. 17:107-18, 1995

Bohmer K. Keilacker H. Kuglin B. Hubinger A. Bertrams J. Gries FA. Kolb H. Proinsulin autoantibodies are more closely associated with type 1 (insulin-dependent) diabetes mellitus than insulin autoantibodies. *Diabetologia*. 34:830-4, 1991

Bosi E, Bonifacio E, Bottazzo GF: Autoantigens in IDDM. *Diabetes Rev*; 1 : 204-214, 1993

Bottazzo GF. Florin-Christensen A. Doniach D. Islet-cell antibodies in diabetes mellitus with autoimmune polyendocrine deficiencies. *Lancet*. 2:1279-83, 1974

Brenneman DE. Gozes I. A femtomolar-acting neuroprotective peptide. *Journal of Clinical Investigation*. 97:2299-307, 1996 May

Bundesamt für Statistik, Gesundheitsbericht für Deutschland, 1998

Burel C. Mezger V. Pinto M. Rallu M. Trigon S. Morange M. Mammalian heat shock protein families. Expression and functions. *Experientia*. 48:629-34, 1992

Burkart V. Kolb H. Macrophages in islet destruction in autoimmune diabetes mellitus. *Immunobiology*. 195:601-13, 1996

Burkhardt H. Kalden JR. Xenobiotic immunosuppressive agents: therapeutic effects in animal models of autoimmune diseases. *Rheumatology International*. 17:85-90, 1997.

Canadian European Diabetes Study Group: Cyclosporin-induced remission of IDDM after early intervention. Association of 1 yr of cyclosporin treatment with enhanced insulin secretion. The Canadian-European Randomized Control Trial Group. *Diabetes*. 37:1574-82, 1988

Catapano CV. Dayton JS. Mitchell BS. Fernandes DJ. GTP depletion induced by IMP dehydrogenase inhibitors blocks RNA-primed DNA synthesis. *Molecular Pharmacology*. 47:948-55, 1995

Charlton B. Bacej A. Mandel TE. Administration of silica particles or anti-Lyt2 antibody prevents beta-cell destruction in NOD mice given cyclophosphamide. *Diabetes*. 37:930-5, 1988

Chen L. Sigler PB. The crystal structure of a GroEL/peptide complex: plasticity as a basis for substrate diversity. *Cell*. 99:757-68, 1999

Chen S. Roseman AM. Hunter AS. Wood SP. Burston SG. Ranson NA. Clarke AR. Saibil HR. Location of a folding protein and shape changes in GroEL-GroES complexes imaged by cryo-electron microscopy. *Nature*. 371:261-4, 1994

Chen W. Syldath U. Bellmann K. Burkart V. Kolb H. Human 60-kDa heat-shock protein: a danger signal to the innate immune system. *Journal of Immunology*. 162:3212-9, 1999

Classen M. Diehl V., Kochsiek K (Herausgeber): Innere Medizin, *Urban & Schwarzenberg* 779-785, 1993

Colman PG. Nayak RC. Campbell IL. Eisenbarth GS. Binding of cytoplasmic islet cell antibodies is blocked by human pancreatic glycolipid extracts. *Diabetes*. 37:645-52, 1988

Colton CA. Chernyshev ON. Gilbert DL. Vitek MP. Microglial contribution to oxidative stress in Alzheimer's disease. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 899:292-307, 2000

Corbett JA, Wang JL, Hughes JH, Wolf BA, Sweetland MA, Lancaster JR, Mc Daniel MR jr. Nitric oxide and cyclic GMP formation induced by interleukin 1beta in islets of Langerhans. *Biochem J*; 287:229-235, 1993

Craig EA. Gambill BD. Nelson RJ. Heat shock proteins: molecular chaperones of protein biogenesis. *Microbiological Reviews*. 57:402-14, 1993

Craig EA. Weissman JS. Horwich AL. Heat shock proteins and molecular chaperones: mediators of protein conformation and turnover in the cell. *Cell*. 78:365-72, 1994

Cristau B. Schafer PH. Pierce SK. Heat shock enhances antigen processing and accelerates the formation of compact class II alpha beta dimers. *Journal of Immunology*. 152:1546-56, 1994

Cruciani RA. Barker JL. Durell SR. Raghunathan G. Guy HR. Zasloff M. Stanley EF. Magainin 2, a natural antibiotic from frog skin, forms ion channels in lipid bilayer membranes. *European Journal of Pharmacology*. 226:287-96, 1992

Cunha FQ. Assreuy J. Moncada S. Liew FY. Phagocytosis and induction of nitric oxide synthase in murine macrophages. *Immunology*. 79:408-11, 1993

Danieli MG. Candela M. Ricciatti AM. Reginelli R. Danieli G. Cohen IR. Gabrielli A. Antibodies to mycobacterial 65 kDa heat shock protein in systemic sclerosis (scleroderma). *Journal of Autoimmunity*. 5:443-52, 1992

de Graeff-Meeder ER. Rijkers GT. Voorhorst-Ogink MM. Kuis W. van der Zee R. van Eden W. Zegers BJ. Antibodies to human HSP60 in patients with juvenile chronic arthritis, diabetes mellitus, and cystic fibrosis. *Pediatric Research*. 34:424-8, 1993.

de Graeff-Meeder ER. van Eden W. Rijkers GT. Prakken BJ. Kuis W. Voorhorst-Ogink MM. van der Zee R. Schuurman HJ. Helders PJ. Zegers BJ. Juvenile chronic arthritis: T cell reactivity to human HSP60 in patients with a favorable course of arthritis. *Journal of Clinical Investigation*. 95:934-40, 1995

de Graeff-Meeder ER. van Eden W. Rijkers GT. Prakken BJ. Zegers BJ. Kuis W. Heat-shock proteins and juvenile chronic arthritis. *Clinical & Experimental Rheumatology*. 11 Suppl 9:S25-8, 1993

Delaney CA. Green MH. Lowe JE. Green IC. Endogenous nitric oxide induced by interleukin-1 beta in rat islets of Langerhans and HIT-T15 cells causes significant DNA damage as measured by the 'comet' assay. *FEBS Letters*. 333:291-5, 1993

DeNagel DC. Pierce SK. A case for chaperones in antigen processing. *Immunology Today*. 13:86-9, 1992 Mar

Doran JE. Biological effects of endotoxin. *Current Studies in Hematology & Blood Transfusion*. :66-99, 1992.

Duclohier H. Molle G. Spach G. Antimicrobial peptide magainin I from *Xenopus* skin forms anion-permeable channels in planar lipid bilayers. *Biophysical Journal*. 56:1017-21, 1989

Elias D. Cohen IR. Peptide therapy for diabetes in NOD mice. *Lancet*. 343:704-6, 1994 a

Elias D. Cohen IR. The hsp60 peptide p277 arrests the autoimmune diabetes induced by the toxin streptozotocin. *Diabetes*. 45:1168-72, 1996

Elias D. Marcus H. Reshef T. Ablamunits V. Cohen IR. Induction of diabetes in standard mice by immunization with the p277 peptide of a 60-kDa heat shock protein. *European Journal of Immunology*. 25:2851-7, 1995

Elias D. Markovits D. Reshef T. van der Zee R. Cohen IR. Induction and therapy of autoimmune diabetes in the non-obese diabetic (NOD/Lt) mouse by a 65-kDa heat shock protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 87:1576-80, 1990

Elias D. Meilin A. Ablamunits V. Birk OS. Carmi P. Konen-Waisman S. Cohen IR. Hsp60 peptide therapy of NOD mouse diabetes induces a Th2 cytokine burst and downregulates autoimmunity to various beta-cell antigens. *Diabetes*. 46:758-64, 1997

Elias D. Prigozin H. Polak N. Rapoport M. Lohse AW. Cohen IR. Autoimmune diabetes induced by the beta-cell toxin STZ. Immunity to the 60-kDa heat shock protein and to insulin. *Diabetes*. 43:992-8, 1994 **b**

Elias D. Reshef T. Birk OS. van der Zee R. Walker MD. Cohen IR. Vaccination against autoimmune mouse diabetes with a T-cell epitope of the human 65-kDa heat shock protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 88:3088-91, 1991

Elias D. Reshef T. Birk OS. van der Zee R. Walker MD. Cohen IR. Vaccination against autoimmune mouse diabetes with a T-cell epitope of the human 65-kDa heat shock protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 88:3088-91, 1991

Ellis RJ. Hemmingsen SM. Molecular chaperones: proteins essential for the biogenesis of some macromolecular structures. *Trends in Biochemical Sciences*. 14:339-42, 1989

Erkeller-Yuksel FM. Isenberg DA. Dhillon VB. Latchman DS. Lydyard PM. Surface expression of heat shock protein 90 by blood mononuclear cells from patients with systemic lupus erythematosus. *Journal of Autoimmunity*. 5:803-14, 1992

Experimental autoimmune encephalomyelitis. Qualitative and semiquantitative differences in heat shock protein 60 expression in the central nervous system. *J Immunol*;154:3548-56, 1995

Fehsel K. Jalowy A. Qi S. Burkart V. Hartmann B. Kolb H. Islet cell DNA is a target of inflammatory attack by nitric oxide. *Diabetes*. 42:496-500, 1993

Feige U. Mollenhauer J. Heat shock proteins. Introduction. *Experientia*. 48:621-2, 1992

Feltham JL. Gierasch LM. GroEL-substrate interactions: molding the fold, or folding the mold?. *Cell*. 100:193-6, 2000

Feng S.-H. Lo S.-C. Induced mouse spleen B-cell proliferation and secretion of immunoglobulin by lipid-associated membrane proteins of *Mycoplasma fermentans* incognitos and *Mycoplasma penetrans*. *Infect. Immun.* 62:3916, 1994

Fisch P. Malkovsky M. Kovats S. Sturm E. Braakman E. Klein BS. Voss SD. Morrissey LW. DeMars R. Welch WJ. et al. Recognition by human V gamma 9/V delta 2 T cells of a GroEL homolog on Daudi Burkitt's lymphoma cells. *Science.* 250:1269-73, 1990

Flavell RA. Allen H. Burkly LC. Sherman DH. Waneck GL. Widera G. Molecular biology of the H-2 histocompatibility complex. *Science.* 233:437-43, 1986

Frydman J. Nimmesgern E. Ohtsuka K. Hartl FU. Folding of nascent polypeptide chains in a high molecular mass assembly with molecular chaperones. *Nature.* 370:111-7, 1994

Gaba MK. Gaba S. Clark LT. Cardiovascular disease in patients with diabetes: clinical considerations. *Journal of the Association for Academic Minority Physicians.* 10:15-22, 1999

Gao YL. Brosnan CF. Raine CS. Experimental autoimmune encephalomyelitis. Qualitative and semiquantitative differences in heat shock protein 60 expression in the central nervous system. *Journal of Immunology.* 154:3548-56, 1995

Gao YL. Raine CS. Brosnan CF. Humoral response to hsp 65 in multiple sclerosis and other neurologic conditions. *Neurology.* 44:941-6, 1994

Georgopoulos C. McFarland H. Heat shock proteins in multiple sclerosis and other autoimmune diseases. *Immunology Today.* 14:373-5, 1993

Goldstein BM. Colby TD. IMP dehydrogenase : structural aspects of inhibitor binding. *Current Medicinal Chemistry.* 6:519-36, 1999

Green EA, Flavell RA. The initiation of autoimmune diabetes. *Current Opinion in Immunology*. 11:663-9, 1999 Dec.

Gupta RS. Evolution of the chaperonin families (Hsp60, Hsp10 and Tcp-1) of proteins and the origin of eukaryotic cells *Molecular Microbiology*. 15:1-11, 1995

Häcker H, Mischak H, Miethke T, Liptay S, Schmid R, Sparwasser T, Heeg K, Lipford G, Wagner H, 1998. CpG-DNA-specific activation of antigen-presenting cells requires stress kinase activity and is preceded by non-specific endocytosis and endosomal maturation. *The EMBO Journal* 17:6230-40

Halloran PF. Molecular mechanisms of new immunosuppressants. *Clinical Transplantation*. 10:118-23, 1996

Hancock RE, Lehrer R. Cationic peptides: a new source of antibiotics. *Trends in Biotechnology*. 16:82-8, 1998

Hanenberg H, Kolb-Bachofen V, Kantwerk-Funke G, Kolb H. Macrophage infiltration precedes and is a prerequisite for lymphocytic insulinitis in pancreatic islets of pre-diabetic BB rats. *Diabetologia*. 32:126-34, 1989

Hanenberg H., Kolb-Bachofen V, Kantwerk-Funke G, Kolb H. Macrophage infiltration precedes and is prerequisite for lymphocytic insulinitis in pancreatic islets of pre-diabetic BB rats. *Diabetologia* 32: 126-34, 1989

Hartl FU, Hlodan R, Langer T. Molecular chaperones in protein folding: the art of avoiding sticky situations. *Trends in Biochemical Sciences*. 19:20-5, 1994

Hartl FU. Molecular chaperones in cellular protein folding. *Nature*. 381:571-9, 1996 .

Heberlin A, Ruuth E, Delorme D, Michel-Heberlin C, Praz F. *Mycoplasma arginini* TUH-14 membrane lipoproteins induce production of interleukin-1, interleukin-6, and tumor necrosis factor α by human monocytes. *Infect. Immun*. 62:4690, 1994

Hedstrom L. IMP dehydrogenase: mechanism of action and inhibition. *Current Medicinal Chemistry*. 6:545-60, 1999

Held W. MacDonald HR. Weissman IL. Hess MW. Mueller C. Genes encoding tumor necrosis factor alpha and granzyme A are expressed during development of autoimmune diabetes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 87:2239-43, 1990

Held W. MacDonald HR. Weissman IL. Hess MW. Mueller C. Genes encoding tumor necrosis factor alpha and granzyme A are expressed during development of autoimmune diabetes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 87:2239-43, 1990 Mar.

Hemmi H. Takeuchi O. Kawai T. Kaisho T. Sato S. Sanjo H. Matsumoto M. Hoshino K. Wagner H. Takeda K. Akira S. A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. *Nature*. 408:740-5, 2000

Hendrix RW. Purification and properties of groE, a host protein involved in bacteriophage assembly. *Journal of Molecular Biology*. 129:375-92, 1979

Herold G, *Innere Medizin*, 1999

Hightower LE. Heat shock, stress proteins, chaperones, and proteotoxicity. *Cell*. 66:191-7, 1991

Hoffmann J, Kafatos F, Janeway Jr. C, Ezekowitz R, Phylogenetic Perspectives in Innate Immunity, *Science* 284: 1313-18, 1999

Hoshino K. Takeuchi O. Kawai T. Sanjo H. Ogawa T. Takeda Y. Takeda K. Akira S. Cutting edge: Toll-like receptor 4 (TLR4)-deficient mice are hyporesponsive to lipopolysaccharide: evidence for TLR4 as the Lps gene product. *Journal of Immunology*. 162:3749-52, 1999

Hunger RE. Carnaud C. Garcia I. Vassalli P. Mueller C. Prevention of autoimmune diabetes mellitus in NOD mice by transgenic expression of soluble tumor necrosis factor receptor p55. *European Journal of Immunology*. 27:255-61, 1997

Ido Y. Vindigni A. Chang K. Stramm L. Chance R. Heath WF. DiMarchi RD. Di Cera E. Williamson JR. Prevention of vascular and neural dysfunction in diabetic rats by C-peptide *Science*. 277:563-6, 1997

Itoh H. Komatsuda A. Wakui H. Miura AB. Tashima Y. Mammalian HSP60 is a major target for an immunosuppressant mizoribine. *Journal of Biological Chemistry*. 274:35147-51, 1999

Jaattela M. Wissing D. Emerging role of heat shock proteins in biology and medicine. *Annals of Medicine*. 24:249-58, 1992

Jansen A. Homo-Delarche F. Hooijkaas H. Leenen PJ. Dardenne M. Drexhage HA. Immunohistochemical characterization of monocytes-macrophages and dendritic cells involved in the initiation of the insulinitis and beta-cell destruction in NOD mice. *Diabetes*. 43:667-75, 1994

Jardetzky TS. Lane WS. Robinson RA. Madden DR. Wiley DC. Identification of self peptides bound to purified HLA-B27. *Nature*. 353:326-9, 1991

Jindal S. Dudani AK. Singh B. Harley CB. Gupta RS. Primary structure of a human mitochondrial protein homologous to the bacterial and plant chaperonins and to the 65-kilodalton mycobacterial antigen. *Molecular & Cellular Biology*. 9:2279-83, 1989

Johnstone M. Gearing AJ. Miller KM. A central role for astrocytes in the inflammatory response to beta-amyloid; chemokines, cytokines and reactive oxygen species are produced. *Journal of Neuroimmunology*. 93:182-93, 1999

Jones DB. Coulson AF. Duff GW. Sequence homologies between hsp60 and autoantigens. [Review] [33 refs] *Immunology Today*. 14:115-8, 1993

Kamada H. Itoh H. Shibata H. Koshio T. Hayashi A. Nakagami K. Inhibitory mechanism of mizoribine on the antibody production of mouse B cells stimulated with lipopolysaccharide. *Japanese Journal of Pharmacology*. 74:323-30, 1997.

Karvonen M. Tuomilehto J. Libman I. LaPorte R. A review of the recent epidemiological data on the worldwide incidence of type 1 (insulin-dependent) diabetes mellitus. World Health Organization DIAMOND Project Group [published erratum appears in *Diabetologia*, 38:642, 1994

Kaufmann SH. Heat shock proteins and the immune response. *Immunology Today*. 11:129-36, 1990

Kaufmann SH. Heat-shock proteins and pathogenesis of bacterial infections. *Springer Seminars in Immunopathology*. 13:25-36, 1991

Kaufmann SH. Schoel B. Wand-Wurttenberger A. Steinhoff U. Munk ME. Koga T. T-cells, stress proteins, and pathogenesis of mycobacterial infections. *Current Topics in Microbiology & Immunology*. 155:125-41, 1990

Kaufmann,S.H.E., B.Schoel. Heat shock proteins as antigens in immunity against infection and self, p 495-531. In R.I. Morimoto, A.Tissieres, G .Georgopoulos, The biology of heat shock proteins and molecular chaperones. *Cold Spring Habor Laboratory Press, Cold Spring Habor, N.Y., 1994*

Kaur I. Voss SD. Gupta RS. Schell K. Fisch P. Sondel PM. Human peripheral gamma delta T cells recognize hsp60 molecules on Daudi Burkitt's lymphoma cells. *Journal of Immunology*. 150:2046-55, 1993

Kiesel U, Oschilewski U, Kantwerk G, Maruta M, Hanenberg H, Treichel U, Kolb-Bachofen V, Hartung HP, Kolb H. 1986. Essential role of macrophages in the development of typ 1 diabetes in BB rats. *Transplant. Proc*. 18:1525-7

Kirschning CJ. Wesche H. Merrill Ayres T. Rothe M. Human toll-like receptor 2 confers responsiveness to bacterial lipopolysaccharide. *Journal of Experimental Medicine*. 188:2091-7, 1998

Kol A. Bourcier T. Lichtman AH. Libby P. Chlamydial and human heat shock protein 60s activate human vascular endothelium, smooth muscle cells, and macrophages. *Journal of Clinical Investigation*. 103:571-7, 1999

Kol A. Sukhova GK. Lichtman AH. Libby P. Chlamydial heat shock protein 60 localizes in human atheroma and regulates macrophage tumor necrosis factor-alpha and matrix metalloproteinase expression. *Circulation*. 98:300-7, 1998

Kolb H, Burkart V, Appels B, Hananberg H, Kantwerk-Funke G, Kiesel U, Funda J, Schraermeyer U, Kolb-Bachofen V. Essential contribution of macrophages to islet cell destruction in vivo and vitro. *J.Autoimmun*. 3 (Suppl.):S117-20, 1990

Kolb H. Kolb-Bachofen V. Type 1 (insulin-dependent) diabetes mellitus and nitric oxide. *Diabetologia*. 35:796-7, 1992

Kolb-Bachofen V. Epstein S. Kiesel U. Kolb H. Low-dose streptozocin-induced diabetes in mice. Electron microscopy reveals single-cell insulinitis before diabetes onset. *Diabetes*. 37:21-7, 1988 Jan

Kostyal D. A. Butler G. H. Beezhold D. H. A 48-kilodalton *Mycoplasma fermentans* membrane protein induces cytokine secretion by human monocytes. *Infect. Immun*. 62:3793, 1994

Kröncke KD. Brenner HH. Rodriguez ML. Etzkorn K. Noack EA. Kolb H. Kolb-Bachofen V. Pancreatic islet cells are highly susceptible towards the cytotoxic effects of chemically generated nitric oxide. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1182:221-9, 1993

Kröncke KD. Kolb-Bachofen V. Berschick B. Burkart V. Kolb H. Activated macrophages kill pancreatic syngeneic islet cells via arginine-dependent nitric oxide generation. *Biochemical & Biophysical Research Communications*. 175:752-8, 1991

Kröncke KD. Kolb-Bachofen V. Berschick B. Burkart V. Kolb H. Activated macrophages kill pancreatic syngeneic islet cells via arginine-dependent nitric oxide generation. *Biochemical & Biophysical Research Communications*. 175:752-8, 1991

Lamb JR. Bal V. Mendez-Samperio P. Mehlert A. So A. Rothbard J. Jindal S. Young RA. Young DB. Stress proteins may provide a link between the immune response to infection and autoimmunity. *International Immunology*. 1:191-6, 1989

Lammert E. Arnold D. Nijenhuis M. Momburg F. Hammerling GJ. Brunner J. Stevanovic S. Rammensee HG. Schild H. The endoplasmic reticulum-resident stress protein gp96 binds peptides translocated by TAP. *European Journal of Immunology*. 27:923-7, 1997

Lampeter EF. Homberg M. Quabeck K. Werner P. Gries FA. Kolb H. Accidental transmission of type-1 diabetes mellitus with HLA-identical bone marrow. *Medizinische Klinik*. 88:272-4, 1993

Landry SJ. Jordan R. McMacken R. Gierasch LM. Different conformations for the same polypeptide bound to chaperones DnaK and GroEL. *Nature*. 355:455-7, 1992

Le Roy D. Di Padova F. Tees R. Lengacher S. Landmann R. Glauser MP. Calandra T. Heumann D. Monoclonal antibodies to murine lipopolysaccharide (LPS)-binding protein (LBP) protect mice from lethal endotoxemia by blocking either the binding of LPS to LBP or the presentation of LPS/LBP complexes to CD14. *Journal of Immunology*. 162:7454-60, 1999

Lee KU, Amano K, Yoon JW. Evidence for initial involvement of macrophages in development of insulinitis in NOD mice. *Diabetes* 37:989-91, 1988

Lee KU. Kim MK. Amano K. Pak CY. Jaworski MA. Mehta JG. Yoon JW. Preferential infiltration of macrophages during early stages of insulinitis in diabetes-prone BB rats. *Diabetes*. 37:1053-8, 1988

Leslie RD. Elliott RB. Early environmental events as a cause of IDDM. Evidence and implications. *Diabetes*. 43:843-50, 1994

Li SG. Quayle AJ. Shen Y. Kjeldsen-Kragh J. Oftung F. Gupta RS. Natvig JB. Forre OT. Mycobacteria and human heat shock protein-specific cytotoxic T lymphocytes in rheumatoid synovial inflammation. *Arthritis & Rheumatism*. 35:270-81, 1992

Li Z. Srivastava PK. Tumor rejection antigen gp96/grp94 is an ATPase: implications for protein folding and antigen presentation. *EMBO Journal*. 12:3143-51, 1993

Lindquist S. Craig EA. The heat-shock proteins. *Annual Review of Genetics*. 22:631-77, 1988

Lindquist S. The heat-shock response. *Annual Review of Biochemistry*. 55:1151-91, 1986

Lo SS. Tun RY. Hawa M. Leslie RD. Studies of diabetic twins. *Diabetes-Metabolism Reviews*. 7:223-38, 1991

Lohmann T. Scherbaum WA. The demonstration and specificity of autoreactive T-lymphocytes in type-1 diabetes. *Deutsche Medizinische Wochenschrift*. 122:737-42, 1997

Loke S, Stein C, Zhang X, Mori K, Nakanishi M, Subasinghe C, Cohen J, Neckers L, Characterization of oligonucleotide transport into living cells. *Proc. Natl. Acad. Sci*. 86:3474-78, 1989

Makino S, Tochino Y. The spontaneously non-obese-diabetic mouse. *Exp. Anim*. 27: 27-32; 1978

Mandrup-Poulsen T. Bendtzen K. Nerup J. Egeberg J. Nielsen JH. Mechanisms of pancreatic islet cell destruction. Dose-dependent cytotoxic effect of soluble blood mononuclear cell mediators on isolated islets of Langerhans. *Allergy*. 41:250-9, 1986

Mandrup-Poulsen T. Bendtzen K. Nielsen JH. Bendixen G. Nerup J. Cytokines cause functional and structural damage to isolated islets of Langerhans. *Allergy*. 40:424-9, 1985

Mandrup-Poulsen T. Helqvist S. Wogensen LD. Molvig J. Pociot F. Johannesen J. Nerup J. Cytokine and free radicals as effector molecules in the destruction of pancreatic beta cells. *Current Topics in Microbiology & Immunology*. 164:169-93, 1990.

Matsuzaki K. Sugishita K. Harada M. Fujii N. Miyajima K. Interactions of an antimicrobial peptide, magainin 2, with outer and inner membranes of Gram-negative bacteria. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1327:119-30, 1997

Mattei D. Ozaki LS. de Silva LP. A Plasmodium falciparum gene encoding a heat shock-like antigen related to the rat 78 Kd glucose-regulated protein. *Nucleic Acids Research*. 16:5204, 1988

MCLaren N, Schatz D, Drasch A, Grave G. Conference summary: initial pathogenesis in IDDM. *Diabetes*; 38: 543-548, 1989

Meda L. Bonaiuto C. Szendrei GI. Ceska M. Rossi F. Cassatella MA. beta-Amyloid(25-35) induces the production of interleukin-8 from human monocytes. *Journal of Neuroimmunology*. 59:29-33, 1995

Meda L. Cassatella MA. Szendrei GI. Otvos L Jr. Baron P. Villalba M. Ferrari D. Rossi F. Activation of microglial cells by beta-amyloid protein and interferon-gamma. *Nature*. 374:647-50, 1995

Meda L. Cassatella MA. Szendrei GI. Otvos L Jr. Baron P. Villalba M. Ferrari D. Rossi F. Activation of microglial cells by beta-amyloid protein and interferon-gamma. *Nature*. 374:647-50, 1995

Medzhitov R. Janeway CA Jr. Innate immunity: the virtues of a nonclonal system of recognition. *Cell*. 91:295-8, 1997

Medzhitov R. Preston-Hurlburt P. Janeway CA Jr. A human homologue of the Drosophila Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature*. 388:394-7, 1997

Melchers I. Jooss-Rudiger J. Peter HH. Reactivity patterns of synovial T-cell lines derived from a patient with rheumatoid arthritis. I. Reactions with defined antigens and auto-antigens suggest the existence of multireactive T-cell clones. *Scandinavian Journal of Immunology*. 46:187-94, 1997

Melnick J. Argon Y. Molecular chaperones and the biosynthesis of antigen receptors. *Immunology Today*. 16:243-50, 1995

Metzler B. Schett G. Kleindienst R. van der Zee R. Ottenhoff T. Hajeer A. Bernstein R. Xu Q. Wick G. Epitope specificity of anti-heat shock protein 65/60 serum antibodies in atherosclerosis. *Arteriosclerosis, Thrombosis & Vascular Biology*. 17:536-41, 1997

Mordes JP. Desemone J. Rossini AA. The BB rat. *Diabetes-Metabolism Reviews*. 3:725-50, 1987

Morimoto, R.I., Tissieres, A., Georgopoulos, C. The Biology of Heat Shock Proteins and Molecular Chaperones. *Cold Spring Harbor Laboratory Press* (1994)

Morrison DC. Jacobs DM. Binding of polymyxin B to the lipid A portion of bacterial lipopolysaccharides. *Immunochemistry*. 13:813-8, 1976

Mosser DD. Caron AW. Bourget L. Denis-Larose C. Massie B. Role of the human heat shock protein hsp70 in protection against stress-induced apoptosis. *Molecular & Cellular Biology*. 17:5317-27, 1997

Mühlradt P.F. Quentenmeier H. Schmitt E. Involvement of interleukin-1 (IL-1), IL-6, IL-2, and IL-4 in generation of cytolytic T cells from thymocytes stimulated by a *Mycoplasma fermentans*-derived product. *Infect. Immun*. 59:3962, 1991

Mühlradt P.F. Kieß M. Meyer H. Süßmuth R. Jung G. Isolation, structure elucidation, and synthesis of a macrophage stimulatory lipopeptide from *Mycoplasma fermentans* acting at picomolar concentration. *J. Exp. Med*. 185:1951, 1997

Mühlradt P.F. Kieß M. Meyer H. Süßmuth R. Jung G. Structure and specific activity of macrophage-stimulating lipopeptides from *Mycoplasma hyorhinis*. *Infect. Immun*. 66:4804, 1998

Mueller C. Held W. Imboden MA. Carnaud C. Accelerated beta-cell destruction in adoptively transferred autoimmune diabetes correlates with an increased expression of the genes coding for TNF-alpha and granzyme A in the intra-islet infiltrates. *Diabetes*. 44:112-7, 1995

Multhoff G. Botzler C. Issels R. The role of heat shock proteins in the stimulation of an immune response. *Biological Chemistry*. 379:295-300, 1998

Multhoff G. Hightower LE. Cell surface expression of heat shock proteins and the immune response. *Cell Stress & Chaperones*. 1:167-76, 1996

Munk ME. Schoel B. Modrow S. Karr RW. Young RA. Kaufmann SH. T lymphocytes from healthy individuals with specificity to self-epitopes shared by the mycobacterial and human 65-kilodalton heat shock protein. *Journal of Immunology*. 143:2844-9, 1989

Nakhooda AF. Like AA. Chappel CI. Murray FT. Marliss EB. The spontaneously diabetic Wistar rat. Metabolic and morphologic studies. *Diabetes*. 26:100-12, 1977

Nerup J. Mandrup-Poulsen T. Molvig J. Helqvist S. Wogensen L. Egeberg J. Mechanisms of pancreatic beta-cell destruction in type I diabetes. *Diabetes Care*. 11 Suppl 1:16-23, 1988

Nerup J. Mandrup-Poulsen T. Molvig J. The HLA-IDDM association: implications for etiology and pathogenesis of IDDM. *Diabetes-Metabolism Reviews*. 3:779-802, 1987

Newcomb JR. Cresswell P. Characterization of endogenous peptides bound to purified HLA-DR molecules and their absence from invariant chain-associated alpha beta dimers. *Journal of Immunology*. 150:499-507, 1993

Nover L. Molecular cell biology of the heat stress response. Part I. *Naturwissenschaften*. 77:310-6, 1990

Ohashi K. Burkart V. Flohe S. Kolb H. Cutting edge: heat shock protein 60 is a putative endogenous ligand of the toll-like receptor-4 complex. *Journal of Immunology*. 164:558-61, 2000

Oschilewski M. Schwab E. Kiesel U. Opitz U. Stunkel K. Kolb-Bachofen V. Kolb H. Administration of silica or monoclonal antibody to Thy-1 prevents low-dose streptozotocin-induced diabetes in mice. *Immunology Letters*. 12:289-94, 1986

Oschilewski U, Kiesel U, Kolb H. Administration of silica prevents diabetes in BB-rats. *Diabetes* 34: 197-9, 1985

Pakala SV. Chivetta M. Kelly CB. Katz JD. In autoimmune diabetes the transition from benign to pernicious insulinitis requires an islet cell response to tumor necrosis factor alpha. *Journal of Experimental Medicine*. 189:1053-62, 1999

Palmer JP. Asplin CM. Clemons P. Lyen K. Tatpati O. Raghu PK. Paquette TL. Insulin antibodies in insulin-dependent diabetics before insulin treatment. *Science*. 222:1337-9, 1983

Pierce SK. DeNagel DC. VanBuskirk AM. A role for heat shock proteins in antigen processing and presentation. *Current Topics in Microbiology & Immunology*. 167:83-92, 1991

Pockley AG. Wu R. Lemne C. Kiessling R. de Faire U. Frostegard J. Circulating heat shock protein 60 is associated with early cardiovascular disease. *Hypertension*. 36:303-7, 2000

Poltorak A. He X. Smirnova I. Liu MY. Huffel CV. Du X. Birdwell D. Alejos E. Silva M. Galanos C. Freudenberg M. Ricciardi-Castagnoli P. Layton B. Beutler B. Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene. *Science*. 282:2085-8, 1998

Prowse S.J., Lafferty J., Nomikos N., Carotenuto P. The pathogenesis of spontaneous diabetes. *Annu. Inst. Pasteur*, 137D, 459-462, 1986

Pugin J. Heumann ID. Tomasz A. Kravchenko VV. Akamatsu Y. Nishijima M. Glauser MP. Tobias PS. Ulevitch RJ. CD14 is a pattern recognition receptor. *Immunity*. 1:509-16, 1994

Pujol-Borrell R. Todd I. Doshi M. Bottazzo GF. Sutton R. Gray D. Adolf GR. Feldmann M. HLA class II induction in human islet cells by interferon-gamma plus tumour necrosis factor or lymphotoxin. *Nature*. 326:304-6, 1987

Pukel C. Baquerizo H. Rabinovitch A. Destruction of rat islet cell monolayers by cytokines. Synergistic interactions of interferon-gamma, tumor necrosis factor, lymphotoxin, and interleukin 1. *Diabetes*. 37:133-6, 1988

Quayle AJ. Wilson KB. Li SG. Kjeldsen-Kragh J. Oftung F. Shinnick T. Sioud M. Forre O. Capra JD. Natvig JB. Peptide recognition, T cell receptor usage and HLA restriction elements of human heat-shock protein (hsp) 60 and mycobacterial 65-kDa hsp-reactive T cell clones from rheumatoid synovial fluid. *European Journal of Immunology*. 22:1315-22, 1992

Qureshi ST. Lariviere L. Leveque G. Clermont S. Moore KJ. Gros P. Malo D. Endotoxin-tolerant mice have mutations in Toll-like receptor 4 (Tlr4). *Journal of Experimental Medicine*. 189:615-25, 1999

Rabinovitch A: Roles of cytokines in IDDM pathogenesis and islets β -cell destruction *Diabetes rev.* 1993;1 :215-240

Radons J. Heller B. Burkle A. Hartmann B. Rodriguez ML. Kroncke KD. Burkart V. Kolb H. Nitric oxide toxicity in islet cells involves poly(ADP-ribose) polymerase activation and concomitant NAD⁺ depletion. *Biochemical & Biophysical Research Communications*. 199:1270-7, 1994

Raine CS. Wu E. Ivanyi J. Katz D. Brosnan CF. Multiple sclerosis: a protective or a pathogenic role for heat shock protein 60 in the central nervous system?. *Laboratory Investigation*. 75:109-23, 1996

Rambukkana A. Das PK. Witkamp L. Yong S. Meinardi MM. Bos JD. Antibodies to mycobacterial 65-kDa heat shock protein and other immunodominant antigens in patients with psoriasis. *Journal of Investigative Dermatology*. 100:87-92, 1993

Rammensee HG. Falk K. Rotzschke O. Peptides naturally presented by MHC class I molecules. *Annual Review of Immunology*. 11:213-44, 1993

Rana FR. Blazyk J. Interactions between the antimicrobial peptide, magainin 2, and *Salmonella typhimurium* lipopolysaccharides. *FEBS Letters*. 293:11-5, 1991

Rana FR. Macias EA. Sultany CM. Modzrakowski MC. Blazyk J. Interactions between magainin 2 and *Salmonella typhimurium* outer membranes: effect of lipopolysaccharide structure. *Biochemistry*. 30:5858-66, 1991

Rana FR. Sultany CM. Blazyk J. Interactions between *Salmonella typhimurium* lipopolysaccharide and the antimicrobial peptide, magainin 2 amide. *FEBS Letters*. 261:464-7, 1990

Reddy S. Yip S. Karanam M. Poole CA. Ross JM. An immunohistochemical study of macrophage influx and the co-localization of inducible nitric oxide synthase in the pancreas of non-obese diabetic (NOD) mice during disease acceleration with cyclophosphamide. *Histochemical Journal*. 31:303-14, 1999

Rietschel ET. Kirikae T. Schade FU. Mamat U. Schmidt G. Loppnow H. Ulmer AJ. Zahringer U. Seydel U. Di Padova F. et al. Bacterial endotoxin: molecular relationships of structure to activity and function. *FASEB Journal*. 8:217-25, 1994

Rigler R. Pramanik A. Jonasson P. Kratz G. Jansson OT. Nygren P. Stahl S. Ekberg K. Johansson B. Uhlen S. Uhlen M. Jornvall H. Wahren J. Specific binding of proinsulin C-peptide to human cell membranes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 96:13318-23, 1999

Ritossa F.: A new puffing pattern induced by temperature shock and DNP in *Drosophila*. *Experientia* 18, 571-573, 1962

Rock FL. Hardiman G. Timans JC. Kastelein RA. Bazan JF. A family of human receptors structurally related to *Drosophila* Toll. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 95:588-93, 1998

Rohane, P., Fathman C.G.: Initiation of autoimmunity in NOD-mice.

Rossini AA. Mordes JP. Like AA. Immunology of insulin-dependent diabetes mellitus. *Annual Review of Immunology*. 3:289-320, 1985

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

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

Schett G. Xu Q. Amberger A. Van der Zee R. Recheis H. Willeit J. Wick G. Autoantibodies against heat shock protein 60 mediate endothelial cytotoxicity. *Journal of Clinical Investigation*. 96:2569-77, 1995

Schirmbeck R. Reimann J. Peptide transporter-independent, stress protein-mediated endosomal processing of endogenous protein antigens for major histocompatibility complex class I presentation. *European Journal of Immunology*. 24:1478-86, 1994

Schumann RR. Leong SR. Flaggs GW. Gray PW. Wright SD. Mathison JC. Tobias PS. Ulevitch RJ. Structure and function of lipopolysaccharide binding protein. *Science*. 249:1429-31, 1990

Schütt & Schumann 1993

Scott FW. Kolb H. Cows' milk and insulin-dependent diabetes mellitus. *Lancet*. 348:613, 1996

Selmaj K. Brosnan CF. Raine CS. Colocalization of lymphocytes bearing gamma delta T-cell receptor and heat shock protein hsp65+ oligodendrocytes in multiple sclerosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 88:6452-6, 1991

Selmaj K. Brosnan CF. Raine CS. Expression of heat shock protein-65 by oligodendrocytes in vivo and in vitro: implications for multiple sclerosis. *Neurology*. 42:795-800, 1992

Shalit F. Sredni B. Rosenblatt-Bin H. Kazimirsky G. Brodie C. Huberman M. Beta-amyloid peptide induces tumor necrosis factor-alpha and nitric oxide production in murine macrophage cultures. *Neuroreport*. 8:3577-80, 1997

Shanafelt MC. Hindersson P. Soderberg C. Mensi N. Turck CW. Webb D. Yssel H. Peltz G. T cell and antibody reactivity with the *Borrelia burgdorferi* 60-kDa heat shock protein in Lyme arthritis. *Journal of Immunology*. 146:3985-92,

Shimada A. Kasatani T. Takei I. Maruyama T. Nomaguchi H. Ozawa Y. Ishii M. Kasuga A. Tashiro F. Miyazaki J. Yamamura K. Saruta T. Immune response to heat-shock protein correlates with induction of insulinitis in I-E alpha d transgenic NOD mice. *Diabetes*. 45:165-9, 1996

Shimazu R. Akashi S. Ogata H. Nagai Y. Fukudome K. Miyake K. Kimoto M. MD-2, a molecule that confers lipopolysaccharide responsiveness on Toll-like receptor 4. *Journal of Experimental Medicine*. 189:1777-82, 1999

Shinnick TM. Heat shock proteins as antigens of bacterial and parasitic pathogens. *Current Topics in Microbiology & Immunology*. 167:145-60, 1991

Shinnick TM. Vodkin MH. Williams JC. The Mycobacterium tuberculosis 65-kilodalton antigen is a heat shock protein which corresponds to common antigen and to the Escherichia coli GroEL protein. *Infection & Immunity*. 56:446-51, 1988

Sjoholm A. Aspects of the involvement of interleukin-1 and nitric oxide in the pathogenesis of insulin-dependent diabetes mellitus. *Cell Death & Differentiation*. 5:461-8, 1998

Smith ME. van der Maesen K. Somera FP. Macrophage and microglial responses to cytokines in vitro: phagocytic activity, proteolytic enzyme release, and free radical production. *Journal of Neuroscience Research*. 54:68-78, 1998

Srivastava PK. Peptide-binding heat shock proteins in the endoplasmic reticulum: role in immune response to cancer and in antigen presentation. *Advances in Cancer Research*. 62:153-77, 1993.

Srivastava PK. Udono H. Blachere NE. Li Z. Heat shock proteins transfer peptides during antigen processing and CTL priming. *Immunogenetics*. 39:93-8, 1994

Sumoski W. Baquerizo H. Rabinovitch A. Oxygen free radical scavengers protect rat islet cells from damage by cytokines. *Diabetologia*. 32:792-6, 1989

Suthanthiran M. Morris RE. Strom TB. Immunosuppressants: cellular and molecular mechanisms of action. *American Journal of Kidney Diseases*. 28:159-72, 1996

Takahashi S. Wakui H. Gustafsson JA. Zilliacus J. Itoh H. Functional interaction of the immunosuppressant mizoribine with the 14-3-3 protein. *Biochemical & Biophysical Research Communications*. 274:87-92, 2000

Takeuchi O. Kaufmann A. Grote K. Kawai T. Hoshino K. Morr M. Muhlradt PF. Akira S. Cutting edge: preferentially the R-stereoisomer of the mycoplasmal lipopeptide macrophage-activating lipopeptide-2 activates immune cells through a toll-like receptor 2- and MyD88-dependent signaling pathway. *Journal of Immunology*. 164:554-7, 2000

Theofilopoulos AN. The basis of autoimmunity: Part I. Mechanisms of aberrant self-recognition. *Immunology Today*. 16:90-8, 1995

Ulevitch RJ, Tobias PS. Receptor-dependent mechanism of cell stimulation by bacterial endotoxin. *Annu. Rev. Immunol*. 13: 437-57, 1995

Ulevitch RJ. Recognition of bacterial endotoxins by receptor-dependent mechanisms. *Advances in Immunology*. 53:267-89, 1993

Van der Goes A. Kortekaas M. Hoekstra K. Dijkstra CD. Amor S. The role of anti-myelin (auto)-antibodies in the phagocytosis of myelin by macrophages. *Journal of Neuroimmunology*. 101:61-7, 1999

Van Muiswinkel FL. Raupp SF. de Vos NM. Smits HA. Verhoef J. Eikelenboom P. Nottet HS. The amino-terminus of the amyloid-beta protein is critical for the cellular binding and consequent activation of the respiratory burst of human macrophages. *Journal of Neuroimmunology*. 96:121-30, 1999

van Roon JA. van Eden W. van Roy JL. Lafeber FJ. Bijlsma JW. Stimulation of suppressive T cell responses by human but not bacterial 60-kD heat-shock protein in synovial fluid of patients with rheumatoid arthritis. *Journal of Clinical Investigation*. 100:459-63, 1997

Vanbuskirk A. Crump BL. Margoliash E. Pierce SK. A peptide binding protein having a role in antigen presentation is a member of the HSP70 heat shock family. *Journal of Experimental Medicine*. 170:1799-809, 1989

Vardi P. Dib SA. Tuttleman M. Connelly JE. Grinbergs M. Radizabeh A. Riley WJ. Maclaren NK. Eisenbarth GS. Soeldner JS. Competitive insulin autoantibody assay. Prospective evaluation of subjects at high risk for development of type I diabetes mellitus. *Diabetes*. 36:1286-91, 1987

Vardi P. Ziegler AG. Mathews JH. Dib S. Keller RJ. Ricker AT. Wolfsdorf JI. Herskowitz RD. Rabizadeh A. Eisenbarth GS. et al. Concentration of insulin autoantibodies at onset of type I diabetes. Inverse log-linear correlation with age. *Diabetes Care*. 11:736-9, 1988

Verstovsek S. Maccubbin DL. Ehrke MJ. Mihich E. Polymyxin B-mediated lysis of tumor cells. *International Archives of Allergy & Immunology*. 100:47-52, 1993

Vorland LH. Ulvatne H. Rekdal O. Svendsen JS. Initial binding sites of antimicrobial peptides in *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases*. 31:467-73, 1999

Vyse TJ. Todd JA. Genetic analysis of autoimmune disease. *Cell*. 85:311-8, 1996

Wahren J. Ekberg K. Johansson J. Henriksson M. Pramanik A. Johansson BL. Rigler R. Jornvall H. Role of C-peptide in human physiology. *American Journal of Physiology - Endocrinology & Metabolism*. 278:E759-68, 2000

Walker R. Bone AJ. Cooke A. Baird JD. Distinct macrophage subpopulations in pancreas of prediabetic BB/E rats. Possible role for macrophages in pathogenesis of IDDM. *Diabetes*. 37:1301-4, 1988

Wang PY. Kitchens RL. Munford RS. Phosphatidylinositides bind to plasma membrane CD14 and can prevent monocyte activation by bacterial lipopolysaccharide. *Journal of Biological Chemistry*. 273:24309-13, 1998

Wang PY. Munford RS. CD14-dependent internalization and metabolism of extracellular phosphatidylinositol by monocytes. *Journal of Biological Chemistry*. 274:23235-41, 1999.

Wick G. Kleindienst R. Schett G. Amberger A. Xu Q. Role of heat shock protein 65/60 in the pathogenesis of atherosclerosis. *International Archives of Allergy & Immunology*. 107:130-1, 1995

Wick G. Xu Q. Atherosclerosis--an autoimmune disease. *Experimental Gerontology*. 34:559-66, 1999

Wicker LS. Todd JA. Peterson LB. Genetic control of autoimmune diabetes in the NOD mouse. *Annual Review of Immunology*. 13:179-200, 1995

Williams DB. Watts TH. Molecular chaperones in antigen presentation. *Current Opinion in Immunology*. 7:77-84, 1995 Feb

Wicker LS. Todd JA. Peterson LB. Genetic control of autoimmune diabetes in the NOD mouse. *Annual Review of Immunology*. 13:179-200, 1995

Williams DB. Watts TH. Molecular chaperones in antigen presentation. *Current Opinion in Immunology*. 7:77-84, 1995

Wright SD. Ramos RA. Tobias PS. Ulevitch RJ. Mathison JC. CD14, a receptor for complexes of lipopolysaccharide (LPS) and LPS binding protein *Science*. 249:1431-3, 1990

Xu Q. Willeit J. Marosi M. Kleindienst R. Oberhollenzer F. Kiechl S. Stulnig T. Luef G. Wick G. Association of serum antibodies to heat-shock protein 65 with carotid atherosclerosis. *Lancet*. 341:255-9, 1993

Yamagami T. Miwa A. Takasawa S. Yamamoto H. Okamoto H. Induction of rat pancreatic B-cell tumors by the combined administration of streptozotocin or alloxan and poly(adenosine diphosphate ribose) synthetase inhibitors. *Cancer Research*. 45:1845-9, 1985

Yang H. Young DW. Gusovsky F. Chow JC. Cellular events mediated by lipopolysaccharide-stimulated toll-like receptor 4. MD-2 is required for activation of mitogen-activated protein kinases and Elk-1. *Journal of Biological Chemistry*. 275:20861-6, 2000

Yang RB. Mark MR. Gray A. Huang A. Xie MH. Zhang M. Goddard A. Wood WI. Gurney AL. Godowski PJ. Toll-like receptor-2 mediates lipopolysaccharide-induced cellular signalling. *Nature*. 395:284-8, 1998

Yang XD. Feige U. Heat shock proteins in autoimmune disease. From causative antigen to specific therapy? *Experientia*. 48:650-6, 1992

Yoon JW. Jun HS. Cellular and molecular roles of beta cell autoantigens, macrophages and T cells in the pathogenesis of autoimmune diabetes. *Archives of Pharmacal Research*. 22:437-47, 1999

Yoon JW. Jun HS. Cellular and molecular roles of beta cell autoantigens, macrophages and T cells in the pathogenesis of autoimmune diabetes. *Archives of Pharmacal Research*. 22:437-47, 1999

Yoon JW. Role of viruses in the pathogenesis of IDDM. *Annals of Medicine*. 23:437-45, 1991

Yoon JW. The role of viruses and environmental factors in the induction of diabetes. *Current Topics in Microbiology & Immunology*. 164:95-123, 1990

Young RA. Stress proteins and immunology. *Annual Review of Immunology*. 8:401-20, 1990

Yu B. Hailman E. Wright SD. Lipopolysaccharide binding protein and soluble CD14 catalyze exchange of phospholipids. *Journal of Clinical Investigation*. 99:315-24, 1997

Zasloff M. Magainins, a class of antimicrobial peptides from *Xenopus* skin: isolation, characterization of two active forms, and partial cDNA sequence of a precursor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 84:5449-53, 1987

Ziegler AG. Erhard J. Lampeter EF. Nagelkerken LM. Standl E. Involvement of dendritic cells in early insulinitis of BB rats. *Journal of Autoimmunity*. 5:571-9, 1992

Zimmerman BT. Canono BP. Campbell PA. Silica decreases phagocytosis and bactericidal activity of both macrophages and neutrophils in vitro. *Immunology*. 59:521-5, 1986

Schumann RR. Leong SR. Flagg GW. Gray PW. Wright SD. Mathison JC. Tobias PS. Ulevitch RJ. Structure and function of lipopolysaccharide binding protein. *Science*. 249:1429-31, 1990

Ulevitch RJ. Tobias PS. Receptor-dependent mechanisms of cell stimulation by bacterial endotoxin. *Annual Review of Immunology*. 13:437-57, 1995

Wright SD. Ramos RA. Tobias PS. Ulevitch RJ. Mathison JC. CD14, a receptor for complexes of lipopolysaccharide (LPS) and LPS binding protein. *Science*. 249:1431-3, 1990

Wright SD. CD14 and innate recognition of bacteria. *Journal of Immunology*. 155:6-8, 1995

Zusammenfassung

Die genauen Pathomechanismen der vornehmlich immunologischen Zerstörung der insulinproduzierenden β -Zellen des Pankreas beim Typ 1 Diabetes mellitus werden bis heute nicht völlig verstanden. Neuere Befunde sprechen für eine Beteiligung von Hitzeschockproteinen am Entzündungsgeschehen der Insel. Unter anderem besitzen Hitzeschockproteine die Fähigkeit mit Makrophagen zu interagieren und diese zur Produktion von humoralen, β -zelltoxischen Sekretionsprodukten ($\text{TNF-}\alpha$, NO) anzuregen. Diese vornehmlich durch HSP 60 bedingte Aktivierung könnte eine wichtige Rolle bei der Progression der Insulitis der Langerhan'schen Inseln spielen. In der vorliegenden Arbeit sollte anhand eines Versuchsystems mit humanem HSP 60 und murinen Makrophagen versucht werden einen Stoff zu finden, der die Aktivierung der Makrophagen mittels HSP60 spezifisch unterdrückt, um so genauere Erkenntnisse über den bislang unbekanntem Interaktionsmechanismus zwischen Makrophagen und HSP60 zu gewinnen. In diesem Zellkultursystem bewirkte die Inkubation von Makrophagen mit HSP60 oder, als positive Kontrolle LPS und immunstimulatorische CPG-haltige DNA (ODN1668) die Produktion von $\text{TNF-}\alpha$ und NO. $\text{TNF-}\alpha$ wurde im Überstand mittels ELISA, NO als stabiles Reaktionsprodukt Nitrit mittels der Griess-Reaktion bestimmt. Mehrere eingesetzte potentielle Inhibitoren führten nicht zu einem spezifischen Effekt auf die $\text{TNF-}\alpha$ und NO-Produktion. So führte beispielsweise Mizoribine zwar zu einer Reduktion der $\text{TNF-}\alpha$ und NO-Produktion, zeigte dies aber nicht spezifisch bei der Stimulation mit huHSP 60, sondern auch bei der Stimulation mit LPS und ODN 1668.

Im Gegensatz dazu ergab die Inkubation der Zellen mit den Defensinen Magainin I, II und II Amid eine teilweise deutliche spezifische Hemmung der durch huHSP 60 angeregten Makrophagenaktivierung. So hemmte das Magainin II Amid die durch huHSP 60 und LPS induzierte $\text{TNF-}\alpha$ und NO-Bildung der Mausmakrophagen signifikant. Die stimulatorische Wirkung der Positivkontrolle ODN 1668 blieb davon unberührt. Magainin II zeigte im Vergleich zu Magainin II Amid einen schwächeren, Magainin I keinen inhibitorischen Effekt. Anhand des LAL-Assays, einem quantitativen enzymatischen Nachweisverfahren von bakteriellem LPS in Lösungen, konnte dargestellt werden, dass die Magainine mit LPS interagieren und dessen biologische Aktivität konzentrationsabhängig blockieren. Dieses Ergebnis legt die Vermutung nahe, dass die Verminderung der huHSP 60 Reaktivität durch vornehmlich Magainin II Amid auf eine Kontamination des huHSP60 mit LPS zurückzuführen sein könnte. Diese Vermutung konnte mittels des Endotoxinhemmstoffes Polymyxin-B nicht bestätigt werden. Polymyxin-B bindet an LPS und verhindert so dessen biologische Aktivität. Die stimulatorische Wirkung von huHSP 60 wurde im Gegensatz zu der von LPS nicht signifikant durch Polymyxin-B reduziert. Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass huHSP60 die Mausmakrophagen durch eine LPS-ähnliche Oberflächenstruktur aktiviert. LPS bewirkt durch eine Interaktion mit speziellen Oberflächenproteinen wie CD14, MD-2 und TLR-4 die Stimulation der Makrophagen. Phosphatidylinositol (Pip), ein Membranphospholipid, agiert als LPS-Antagonist in der Signaltransduktion über den TLR4-MD2-Komplex. Es bindet an CD14 und unterbindet die Zellstimulation durch LPS. Die Stimulation der Mausmakrophagen unter Inkubation mit Pip zeigte eine signifikante Reduktion der $\text{TNF-}\alpha$ und NO-Freisetzung bei der Stimulation mit LPS und huHSP60, jedoch keinen Effekt auf die Stimulation mit der Kontrolle ODN 1668. Eine direkte Interaktion von Pip mit LPS konnte anhand des LAL-Assays ausgeschlossen werden. Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass huHSP60 die Makrophagen durch eine Interaktion mit den membranständigen Proteinen CD-14 und dem TLR-4-MD-2 Komplex aktiviert. Das immunstimulierende Peptid MALP-2 aus Mykoplasmen aktiviert Immunzellen vornehmlich über den Toll-like-receptor-2. Es wurde in dieser Arbeit als zusätzliches Kontrollsystem eingesetzt, um die gefundenen Ergebnisse zu spezifizieren. MALP-2 führte zu einer konzentrationsabhängigen Stimulation der $\text{TNF-}\alpha$ und NO-Produktion in den Mausmakrophagen. Die Inkubation der Zellen mit Magainin I,II, II Amid oder Pip zeigte keine Reduktion der $\text{TNF-}\alpha$ und NO-Freisetzung unter der Stimulation mit MALP-2. Damit waren unspezifisch hemmende Effekte für diese Substanzen ausgeschlossen. Zusammenfassend stützen diese Ergebnisse die Hypothese, dass huHSP 60 eine LPS-ähnliche Oberflächenstruktur besitzt, die durch Interaktion mit dem CD14-TLR-4-MD2 Komplex eine Aktivierung von Makrophagen bewirkt.

Danksagung

Mein Dank gilt in erster Linie Herrn Prof. Dr. Kolb für die Überlassung des Themas und die hervorragende Betreuung in jeder Phase meiner Arbeit.

Des Weiteren danke ich Herrn Dr. V. Burkhart für die ausführlichen und fruchtbaren Diskussionen und für die Hilfe bei der Planung der Experimente.

Eine Umsetzung dieser Experimente wäre sicherlich nicht ohne die tatkräftige Mithilfe von Frau W. Fingberg, die mir jederzeit zur Seite stand, möglich gewesen. Danke.

Allen Mitarbeitern des DDFI danke ich für die anregenden Diskussionen und das besonders freundliche Arbeitsklima.

Meiner Familie bin ich sehr dankbar, dass Sie all dies ermöglicht hat und mir zu jederzeit meines bisherigen Lebens zur Seite stand und steht.

Curriculum vitae

Name: Robert Christian Rümenapf
Geburtsdatum: 24. Dezember 1974
Geburtsort: Wuppertal
Adresse: Forstmannstr. 13
45239 Essen
Familienstand: ledig

Schulbildung

1994 Abitur an der Gesamtschule Bockmühle Essen

Zivildienst

Juni 1994 - Juni 1995 Jugendgruppenleiter in der ev. Kirchengemeinde Essen-Werden.

Universitätslaufbahn

Juni 1995 - Sept. 1995 Lancaster University (Great Britain)
Okt. 1995 - Nov. 2002 Studium der Humanmedizin an der Heinrich-Heine Universität Düsseldorf
Oktober 1996 Vorschlag zur Aufnahme in die Studienstiftung des Deutschen Volkes
August 1997 Ärztliche Vorprüfung
August 1998 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
September 2001 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
November 2002 Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

Dissertation

Nov. 1999 – Okt. 2000 Dissertation am Deutschen Diabetes-Forschungsinstitut Düsseldorf. Thema: Spezifität der Makrophagen-aktivierenden Wirkung von Hitzeschockprotein 60

Famulaturen

Feb. 1996 - März 1996 Alfried Krupp Krankenhaus Essen, Orthopädie
Juli 1996 - Aug. 1996 Harbin Clinic, Rome, Georgia U.S.A., Chirurgie, Orthopädie
Feb. 1998 - April 1998 Floyd Medical Center, Rome, Georgia U.S.A. und Harbin Clinic, Rome, Georgia U.S.A., Radiologie, Anästhesie, Allgemeinmedizin
August 1999 Alfried-Krupp-Krankenhaus Essen, Gynäkologie
Februar 2000 Dr. Frädrich, Arzt für Allgemeinmedizin, Oberhausen
Feb. 2000 - April 2000 Fremantle Hospital, Fremantle, Western Australia, Australien, Notfallmedizin

Arzt im Praktikum

Seit Dezember 2002 Arzt im Praktikum am Ev. Krankenhaus Mülheim Ruhr
Fachbereich: Augenheilkunde