

Aus der Medizinischen Klinik  
mit dem Schwerpunkt Infektiologie  
der Medizinischen Fakultät der Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Nod1 vermittelt Endothelzellaktivierung  
durch *Chlamydophila pneumoniae*

zur Erlangung des akademischen Grades  
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
der Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Stefanie Förster

aus Berlin

Gutachter: 1. PD Dr. med. Stefan Hippenstiel  
2. Prof. Dr. med. Ralf Reiner Schumann  
3. Prof. Dr. med. Jens Gert Kuipers

**Datum der Promotion: 09.05.2008**

## Zusammenfassung

*Chlamydomphila pneumoniae* ist ein obligat intrazelluläres, gramnegatives Bakterium, welches akute und chronische Infektionen des respiratorischen Traktes verursacht. Darüber hinaus scheinen chronische oder rezidivierende Infektionen mit *C. pneumoniae* mit einem vermehrten Auftreten von Asthma bronchiale, COLD (chronisch obstruktive Lungenerkrankung) sowie Arteriosklerose assoziiert zu sein. Bisher ist nur wenig über die Erkennung von Chlamydien durch das angeborene Immunsystem als erste Instanz zur Abwehr eindringender Erreger bekannt. Während die transmembranären Toll-like Rezeptoren (TLRs) vor allem extrazelluläre Mikroorganismen erkennen, fungieren die kürzlich entdeckten, zytoplasmatischen Nod-like-Rezeptoren (NLR) als intrazelluläre Rezeptoren. Nod1 und Nod2 erkennen dabei unterschiedliche Peptidoglykan-Fragmente, welche üblicherweise in bakteriellen Zellwänden vorkommen. In dieser Arbeit sollte die Rolle von Nod1 und Nod2 in der Erkennung von *C. pneumoniae* durch das angeborene Immunsystem insbesondere in Endothelzellen untersucht werden.

Die Infektion von humanen Endothelzellen (HUVEC und HAEC) mit *C. pneumoniae* (TW-183) führte zu einer dosisabhängigen Induktion der IL-8-Sekretion. Interessanterweise waren hitzeinaktivierte Chlamydien hierzu nicht in der Lage. Darüber hinaus konnte in HUVEC und HAEC die *C. pneumoniae*-induzierte IL-8-Produktion mittels siRNA gegen Nod1 signifikant inhibiert werden. Weiterhin verstärkte die Überexpression von Nod1 oder Nod2 hierbei die Chlamydien-induzierte Aktivierung eines NF- $\kappa$ B-abhängigen Reportergens in HEK293-Zellen. Auch hitzeinaktivierte Chlamydien induzierten eine Nod1- und Nod2-vermittelte HEK293-Zellaktivierung, dies allerdings nur, wenn sie in die Zellen eingebracht wurden. Versuche mit dominant-negativen Signalmolekülmutanten ergaben zudem Hinweise auf eine Beteiligung von Rip2, IRAK1, IRAK2 und TRAF6, nicht jedoch von MyD88 in der Nod1- bzw. Nod2-abhängigen Signalkaskade.

Zusammenfassend zeigen die dargestellten Ergebnisse eine wichtige Rolle von Nod1 in der Endothelzellaktivierung durch *C. pneumoniae* an.

Schlagworte: Nod1, Nod2, TLR, angeborenes Immunsystem, *Chlamydomphila pneumoniae*

## Abstract

*Chlamydomphila pneumoniae* is an obligate intracellular, Gram-negative bacterium, which causes acute and chronic infections of the respiratory tract. Furthermore, chronic or recurrent infections with intracellularly persistent *C. pneumoniae* have been associated with an increased appearance of asthma bronchiale, GOLD (chronic obstructive lung disease) as well as atherosclerosis. Little is known about intracellular recognition of chlamydiae through the innate immune system as the first line defense against invading pathogens. While members of the transmembrane Toll-like receptors (TLRs) are suggested to mediate mainly host responses against extracellular pathogens and pathogenetic patterns, the recently identified group of cytosolic Nod-like receptors (NLRs) are believed to serve as intracellular receptors. Thus, Nod1 and Nod2 recognize different motives usually found in bacterial cell wall peptidoglycans. In this work the role of Nod1 and Nod2 in recognition of *C. pneumoniae* in endothelial cells was examined. Infection of human endothelial cells (HUVEC and HAEC) with *C. pneumoniae* (TW-183) led to a dose-dependent induction of IL-8 secretion. Interestingly, heat-inactivated chlamydia were in contrast unable to activate an IL-8 response in these cells. RNAi studies furthermore showed that the chlamydiae-induced IL-8 production in HUVEC and HAEC was dependent on Nod1. Moreover, overexpressed Nod1 and Nod2 enhanced chlamydia-induced NF- $\kappa$ B-dependent reporter gene activation in HEK293 cells. Interestingly, also heat-inactivated bacteria were able to induce NF- $\kappa$ B reporter gene activity via Nod1 or Nod2 when brought into the cells, but not when extracellular stimulation was performed. Experiments with dominant-negative mutants furthermore indicated an involvement of Rip2, IRAK1, IRAK2 and TRAF6, but not of MyD88, in the Nod1/2-dependent signaling cascade. Overall, the presented results show that Nod1 plays a crucial role in endothelial cell activation by *C. pneumoniae*.

Keywords: Nod1, Nod2, TLR, innate immunity, *Chlamydomphila pneumoniae*

Zusammenfassung	I
Abstract	II
Abkürzungsverzeichnis	VII
1 Einleitung	1
1.1 Theoretische Grundlagen	1
1.1.1 Das Immunsystem	1
1.1.1.1 Die Funktionen des Immunsystems	1
1.1.1.2 Einteilung des Immunsystems	1
1.1.1.3 Grundprinzipien des angeborenen Immunsystems	3
1.1.2 Toll-like-Rezeptoren	5
1.1.2.1 Lokalisation der Toll-like-Rezeptoren	5
1.1.2.2 Strukturelle Charakteristika von Toll-like-Rezeptoren	5
1.1.2.3 Durch die Toll-like-Rezeptoren erkannte Motive	6
1.1.2.4 Folgen der TLR-Aktivierung	6
1.1.3 Nod-like-Rezeptoren	7
1.1.3.1 Familiäre Zuordnung der Nod-like-Rezeptoren	7
1.1.3.2 Lokalisation von Nod1 und Nod2	8
1.1.3.3 Strukturelle Charakteristika von Nod-Rezeptoren	8
1.1.3.4 PAMPs von Nod1 und Nod2	9
1.1.3.5 Weiter mit der PGN-Erkennung in Verbindung gebrachte PRRs	12
1.1.3.6 Mit Nod-Mutationen assoziierte Erkrankungen	13
1.1.4 Intrazelluläre Signalwege	15
1.1.4.1 TLR-Signalweg	15
1.1.4.2 Signalweg von Nod1 und Nod2	19
1.1.4.3 NF-κB	21
1.1.5 Endothelzellen	22
1.1.6 <i>Chlamydophila pneumoniae</i>	23
1.1.6.1 Allgemeine Charakteristika	23
1.1.6.2 Durch <i>C. pneumoniae</i> hervorgerufene Krankheiten	23
1.1.6.3 Mechanismen der Zellinvasion durch <i>C. pneumoniae</i>	25
1.1.6.4 Erregervermehrung	26

1.1.6.5	PAMPs der Chlamydien	28
1.1.6.6	Chlamydien-Wirtszell-Interaktion	28
1.2	Aufgabenstellung	30
2	Material und Methoden	31
2.1	Anzucht und Aufreinigung von <i>C. pneumoniae</i>	31
2.1.1	Anzucht von <i>C. pneumoniae</i>	31
2.1.2	Aufreinigung von <i>C. pneumoniae</i>	32
2.2	Hitzeinaktivierung der Erreger	33
2.3	Zellkultur	34
2.3.1	Gewinnung von HUVEC	34
2.3.2	Kultivierung der HUVEC	35
2.3.3	Kultivierung der HAEC	35
2.3.4	Kultivierung der HEK293-Zellen	36
2.4	Transfektion von RNAi und Infektion von endothelialen Zellen	37
2.4.1	RT-PCR	37
2.4.1.1	Vorbereitende Schritte	37
2.4.1.2	Reverse Transkription (RT)	38
2.4.1.3	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	38
2.4.1.4	Darstellung der PCR-Produkte	39
2.4.2	RNAi-Experimente	40
2.4.3	Infektion	41
2.4.4	Nachweis der Infektion in HUVEC	41
2.4.5	IL-8-ELISA	42
2.5	Überexpressions- und Inhibitionsversuche in HEK293-Zellen	43
2.5.1	Transformation und Isolierung von Plasmid-DNA	43
2.5.2	Transfektion	44
2.5.3	HEK293-Zellinfektion und –Stimulation	45
2.5.4	Nachweis der Infektion in HEK293-Zellen	45
2.5.5	Luziferase-Bestimmung	46
2.5.6	Proteinbestimmung	46
2.5.7	Statistische Auswertung und benutzte Software	47
3	Ergebnisse	48
3.1	<i>C. pneumoniae</i> -infizierte Endothelzellen produzieren Interleukin 8	48

3.1.1	Infektion von HUVEC, Nachweis der Infektion	48
3.1.2	IL-8-Sekretion in HUVEC und HAEC nach <i>C.pneumoniae</i> -Infektion	49
3.1.3	Nod1- und Nod2-Expression in verschiedenen Zelllinien	51
3.2	RNAi-Experimente in HUVEC und HAEC	52
3.2.1	RT-PCR zum Nachweis der supprimierten endogenen Nod1-Expression	52
3.2.2	Einfluss von Nod1 auf die IL-8-Sekretion	52
3.3	Überexpressionsversuche in HEK293-Zellen	55
3.3.1	Nachweis der Infektion	55
3.3.2	Der Einfluss von Nod1 und Nod2 auf die NF- $\kappa$ B-Aktivierung durch Chlamydien	56
3.4	Bedeutung der NLR und TLRs als intra- bzw. extrazelluläre Rezeptoren in der Erkennung von <i>C. pneumoniae</i>	58
3.5	Signaltransduktion in HEK293-Zellen	60
3.5.1	Rip2 und MyD88	60
3.5.2	IRAK1, IRAK2 und TRAF6	62
4	Diskussion	64
4.1	Die Rolle von Nod1, Nod2 und der TLRs bei der Erkennung von <i>C. pneumoniae</i> in Endothelzellen	64
4.1.1	Epithel- und Endothelzellen in der angeborenen Immunabwehr	64
4.1.2	Extra- vs. intrazelluläre Rezeptoren in der Immunantwort von Endothelzellen	65
4.1.3	Erkennung von <i>C. pneumoniae</i> durch Nod1 und Nod2	66
4.1.4	Zusammenspiel von NLR und TLRs	67
4.2	PAMPs von <i>C. pneumoniae</i> in der Nod1- bzw. Nod2-vermittelten Immunantwort	69
4.2.1	Chlamydiale Moleküle, welche das angeborene Immunsystem aktivieren	69
4.2.2	Peptidoglykan und <i>C. pneumoniae</i>	69
4.2.3	Nod-like-Rezeptoren als antibakteriell wirkende Elemente in der Erregerabwehr	70
4.3	Signaltransduktion und Aktivierung proinflammatorischer Mediatoren über Nod1 und Nod2	72
4.3.1	Die intrazelluläre Nod1- bzw. Nod2-aktivierende Signalkaskade	72

4.3.2	Bedeutung von Rip2	74
4.3.3	Funktionen der IRAKs	74
4.3.4	Weitere regulatorische Moleküle im Nod1/2-Signalweg	75
4.3.5	Folgen der NF- $\kappa$ B-Aktivierung	75
4.3.6	Bedeutung von MAP-Kinasen im Nod1- bzw. Nod2-aktivierenden Signalweg	76
4.4	<i>C. pneumoniae</i> und Arteriosklerose	77
4.5	Schlussfolgerung und Ausblick	80
5	Literaturverzeichnis	81
6	Anhang	96
6.1	Veröffentlichungen	96
6.1.1	Originalarbeiten	96
6.1.2	Kongressbeiträge	96
6.2	Danksagung	98
6.3	Lebenslauf	99
6.4	Eidesstattliche Erklärung	100



## Abkürzungsverzeichnis

CARD	(engl.) caspase-activating and recruitment domain (deu.) Kaspasenaktivierungs- und Rekrutierungsdomäne
COLD	(engl.) chronic obstructive lung disease (deu.) chronisch obstruktive Lungenerkrankung
DAP	(engl.) diaminopimelate acid (deu.) Diaminopimelinsäure
EDTA	(engl.) ethylenediaminetetraacid (deu.) Ethylenediamintetraessigsäure
ELISA	(engl.) enzyme linked immunosorbent assay (deu.) Enzym-gebundenes Immunabsorbens-Untersuchung
ERK	(engl.) extracellular signal-regulated kinase (deu.) extrazelluläre Signal-regulierte Kinase
FCS	(engl.) fetal calf serum (deu.) fetales Kälberserum
FITC	(engl.) fluorescein-isothiocyanate (deu.) Fluoreszinoisothiozyanat
HAEC	(engl.) human aortic endothelial cells (deu.) humane aortale Endothelzellen
HSP	(engl.) heat shock protein (deu.) Hitzeschockprotein
HUVEC	(engl.) human umbilical vein endothelial cells (deu.) humane endotheliale Nabelschnurvenenzellen
IFN- $\beta$	(engl.) interferon- $\beta$ (deu.) $\beta$ -Interferon
IKK	(engl.) I $\kappa$ B kinase (deu.) I $\kappa$ B-Kinase
IL	(engl.) interleukin (deu.) Interleukin
IRAK	(engl.) interleukin-1 receptor-associated kinase (deu.) Interleukin-1-Rezeptor-assozierte Kinase
IRF	(engl.) interferon-regulatory factor (deu.) Interferon-regulierender Faktor

JNK	(engl.) Jun-N-terminal kinase (deu.) Jun-N-terminale Kinase
LPS	(engl.) lipopolysaccharide (deu.) Lipopolysaccharid
Mal	(engl.) MyD88-adaptor like (deu.) MyD88-Adapter ähnlich
MDP	(engl.) muramyl dipeptide (deu.) Muramyl-dipeptid
MHC	(engl.) major histocompatibility complex (deu.) Haupthistokompatibilitätskomplex
MKK	(engl.) mitogen-activated protein kinase (deu.) Mitogen-aktivierte Proteinkinase
MOI	(engl.) multiplicity of infection (deu.) Multiplizität der Infektion
NACHT	(engl.) neuronal apoptosis inhibitory protein, CIITA, HET-E and TP1 (deu.) neuronales Apoptosehemmungprotein, CIITA, HET-E und TP1
NBS	(engl.) nucleotide binding side (deu.) Nukleotidbindungsstelle
NF- $\kappa$ B	(engl.) nuclear factor $\kappa$ B (deu.) Kernfaktor $\kappa$ B
NLR	(engl.) Nod-like receptor (deu.) Nod-ähnlicher Rezeptor
Nod	(engl.) nucleotide oligomerization domain (deu.) Nukleotidoligomerisierungsdomäne
PACT	(engl.) PKR-activating protein (deu.) PKR-aktivierendes Protein
PAMPs	(engl.) pathogen-associated molecular patterns (deu.) Pathogen-assoziierte molekulare Muster
PBS	(engl.) phosphate buffered saline (deu.) Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	(engl.) polymerase chain reaction (deu.) Polymerasekettenreaktion

PGN	(engl.) peptidoglycane (deu.) Peptidoglykan
PKR	(engl.) protein kinase R (deu.) Proteinkinase R
PMSF	(engl.) phenylmethylsulphonylfluoride (deu.) Phenylmethylsulfonylfluorid
PRR	(engl.) pattern recognition receptor (deu.) Mustererkennungsrezeptor
RICK	(engl.) Rip-like CARD-containing domain (deu.) Rip-ähnliche, CARD-enhaltende Domäne
RNAi	(engl.) ribonucleic acid interference (deu.) Ribonukleinsäure-Interferenz
SDS	(engl.) sodium dodecyl sulphate (deu.) Natrium-Dodezylsulfat
TAK-1	(engl.) TGF- $\beta$ -activated kinase 1 (deu.) TGF- $\beta$ -aktivierte Kinase-1
TIRAP	(engl.) TIR domain-containing adapter protein (deu.) TIR-Domäne-enhaltendes Adapterprotein
TGF	(engl.) transforming growth factor (deu.) transformierender Wachstumsfaktor
TLR	(engl.) Toll-like receptor (deu.) Toll-ähnlicher Rezeptor
TNF $\alpha$	(engl.) tumor necrosis factor $\alpha$ (deu.) Tumornekrosefaktor $\alpha$
TOLLIP	(engl.) Toll-interacting protein (deu.) auf Toll einwirkendes Protein
TRAF6	(engl.) TNF receptor-associated factor 6 (deu.) TNF-Rezeptor-assoziierter Faktor 6
TRAM	(engl.) TRIF-related adaptor molecule (deu.) TRIF-verwandtes Adaptermolekül
TRIF	(engl.) TIR-domain-containing adaptor inducing interferon-beta (deu.) TIR-Domäne enthaltener Adapter, welcher Interferon- $\beta$ induziert

# 1 Einleitung

## 1.1 Theoretische Grundlagen

### 1.1.1 Das Immunsystem

#### *1.1.1.1 Die Funktionen des Immunsystems*

Infektionskrankheiten sind eine der Hauptursachen für Hospitalisierung und Tod weltweit. Eine frühzeitige Unterbindung der Erregervermehrung sowie die erfolgreiche Eradikation von Erregern sind für den Organismus unabdingbar. Das Immunsystem erkennt und schützt vor einer Infektion durch Bakterien, Viren, Pilzen und Parasiten und unterscheidet somit zwischen Selbst und Fremd. Weiterhin differenziert es zwischen gefährlich und harmlos und agiert dementsprechend mit Apoptose (Zelltod), Entzündung oder auch Anergie (Nichtreagieren auf ein Antigen) (Janeway et al., 2004).

#### *1.1.1.2 Einteilung des Immunsystems*

Das Immunsystem des Menschen lässt sich in das angeborene Immunsystem und das erworbene, adaptive System einteilen. Die angeborene Immunantwort ist der relativ unspezifisch und schnell reagierende Teil des Immunsystems, welcher in allen mehrzelligen Lebewesen einschließlich Pflanzen vorzufinden ist und somit die erste Instanz zur Abwehr von eindringenden Erregern darstellt. Die verzögert einsetzende und mehr spezifische, adaptive Immunantwort ist eine Besonderheit, die nur bei den Vertebraten vorzufinden ist. Das angeborene und das erworbene Immunsystem ergänzen sich und arbeiten sowohl mit humoralen und zellulären Komponenten (Janeway et al., 2002).

Das phylogenetisch jüngere, adaptive Immunsystem ist schon seit langem ein weit verbreitetes Forschungsobjekt und daher gut untersucht. Die wichtigsten Aspekte der erworbenen Immunantwort sollen hier kurz erläutert werden. Nach Aufnahme der Erreger, vorerst von Zellen der angeborenen Immunabwehr, und Prozessierung werden die Antigene über MHC-Moleküle auf den antigenpräsentierenden Zellen, zum Beispiel dendritischen Zellen und Makrophagen oder naiven T-Lymphozyten präsentiert. Die Rezeptoren der Zellen des erworbenen Immunsystems sind in variablen Gensegmenten

verschlüsselt, wobei die Vielfalt dieser Rezeptoren durch ein so genanntes Rearrangement der V-, D- und J-Segmente entsteht. Nach Bindung der Antigene an diese Rezeptoren kommt es zur Zelldifferenzierung und Aktivierung von B-Lymphozyten mit nachfolgender Produktion von Antikörpern, Aktivierung zytotoxischer T-Lymphozyten, NK-Zellen oder auch Eosinophiler und Erregereliminierung. Die Aktionsschwerpunkte der zellulären Abwehr sind Infektionen mit Viren, intrazellulären Bakterien und Pilzen. Die humorale Abwehr richtet sich vor allem gegen bakterielle Infektionen. Da die oben beschriebenen Vorgänge alle erst nach dem Erregerkontakt ablaufen müssen, findet die Aktivierung von Effektoren (Immunglobuline, Komplement, Zytokine) gegen das Pathogen nur verzögert, also erst nach ein paar Tagen, statt. Andererseits kommt es zur Bildung eines Erreger-spezifischen Gedächtnisses, welches eine schnellere Immunantwort nach Wiederkontakt mit dem Erreger erlaubt. Wichtige Effektorzytokine des erworbenen Immunsystems sind zum Beispiel Interleukin-2 (IL-2), IL-4, Interferon  $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) (Akira et al., 2006; Janeway et al., 2002; Janeway et al., 2004).

Im Folgenden sollen an dieser Stelle wichtige Unterschiede zwischen dem angeborenen Immunsystem und dem erworbenen Immunsystem aufgeführt werden: Das angeborene Immunsystem ist phylogenetisch älter. Die Fähigkeit zur Pathogenerkennung ist prinzipiell schon ab der Geburt vorhanden und muss nicht erst "erlernt" werden. Als wichtige Zellen der angeborenen Immunabwehr können myeloide Zellen (Neutrophile, Eosinophile, Basophile, Monozyten, Makrophagen und dendritische Zellen) und Lymphozyten (NK-Zellen) sowie auch Epithel- als Endothelzellen und potentiell jede andere Körperzelle genannt werden. Im Gegensatz zur erworbenen Immunabwehr sind die Rezeptoren der angeborenen Immunität Keimbahn-kodiert, ein Rearrangement ist nicht notwendig. Diese Rezeptoren werden auf einer Vielzahl von unterschiedlichen Zellen exprimiert. Es werden konservierte, pathogene Molekularstrukturen wie zum Beispiel LPS, Lipoteichonsäure und Peptidoglykane erkannt. Nach der Pathogendetektion erfolgt eine sofortige Aktivierung von Effektormechanismen (Janeway et al., 2002).

### *1.1.1.3 Grundprinzipien des angeborenen Immunsystems*

Das angeborene Immunsystem setzt sich aus verschiedenen Elementen zusammen. Hierzu zählen die physikalischen Barrierefunktionen der Epidermis und Mukosa mit Ziliaraktivität, Motilität, Desquamation und Mukussektion. Zelluläre Elemente der angeborenen Immunantwort stellen im Grunde jede Körperzelle insbesondere aber dendritische Zellen, Makrophagen, Granulozyten sowie auch Epithel- und Endothelzellen dar. Die Pathogenerkennung erfolgt mit Hilfe von „pattern recognition molecules“ (PRRs) (Basset et al., 2003). Die PRRs erkennen hoch konservierte Molekularstrukturen von Pathogenen, PAMPs (pathogen-associated molecular patterns) genannt, welche nur durch die Erreger und nicht durch die Wirtszellen gebildet werden (Medzhitov, 2001).

Die PAMPs führen essentielle physiologische Funktionen in den Mikroorganismen aus, eine Art "Resistenzentwicklung" gegenüber der angeborenen Immunantwort durch mutationsbedingte Variationen in diesen Molekülen findet daher kaum statt. Bestimmte PAMPs sind für ganze Klassen von Erregern charakteristisch, somit ist nur eine geringe Anzahl von Rezeptoren notwendig, um eine Vielzahl von Erregern zu erkennen. Zu den Molekülstrukturen, die als PAMPs erkannt werden, zählen zum Beispiel Lipopolysaccharid (LPS), Peptidoglykan (PGN), Flagellin und bakterielle oder virale DNA sowie virale einsträngige und doppelsträngige RNA (Akira et al., 2006; Takeda et al., 2003).

Im Gegensatz dazu entwickeln sich die Virulenzfaktoren der Erreger als mikrobielle Adaptation an die Umwelt im Wirt und werden zur Interaktion mit dem Wirt produziert. Sie dienen beispielsweise der Invasion der Wirtszelle, der Formierung von Kolonien, der Vermeidung der Immunantwort des Wirtes oder der Anpassung an neue Nahrungsquellen. Pathogene Virulenzfaktoren stellen häufig Motive dar, welche durch das adaptive Immunsystem erkannt werden (Medzhitov, 2001).

PRRs können entweder löslich oder zellassoziiert sein. Als lösliche Rezeptoren sind zum Beispiel das LPS-bindende Protein (LBP), Pentraxine, Komplementfaktoren und Kollektine bekannt (Janeway et al., 2002). Diese wirken bei der Erkennung sowie der nachfolgenden Eliminierung des Pathogens mit. Zu den zellassoziierten Rezeptoren gehören zum Beispiel die Toll-like-Rezeptoren (TLRs), die Scavenger-Rezeptoren, die Mannose-Rezeptoren sowie die RIG-like-Rezeptoren RIG-I und MDA-5 (Andrejeva et al., 2004; Janeway et al., 2002; Meylan et al., 2006).

Im Gegensatz zu den Rezeptoren der adaptiven Immunantwort, welche nur auf spezifischen Zelltypen vorhanden sind, sind Rezeptoren der angeborenen Immunabwehr relativ ubiquitär exprimiert (Janeway et al., 2004). Viele der genannten zellassozierten Rezeptoren aktivieren eine intrazelluläre Signalkaskade, welche nachfolgend die Expression inflammatorischer Mediatoren wie Zytokine und Chemokine reguliert und die weitere angeborene und erworbene Immunantwort steuert. Wichtige Funktionen der PRRs sind zudem Opsonierung, Komplementaktivierung, Aktivierung von Koagulationskaskaden, Steuerung von Phagozytose und Induktion von Apoptose (Medzhitov et al., 2000).

### 1.1.2 Toll-like-Rezeptoren

#### 1.1.2.1 Lokalisation der Toll-like-Rezeptoren

Die Familie der humanen TLRs umfasst 10 Mitglieder, genannt TLR1-10. Sie werden vor allem in Zellen der ersten Instanz der Wirtsabwehr exprimiert, dazu gehören Makrophagen, dendritische Zellen, dermale und mukosale Epithelzellen und Endothelzellen. Einige TLRs sind auch auf B- und T-Lymphozyten vorzufinden. Die TLRs sind transmembranäre Moleküle. Die Pathogenerkennung erfolgt somit an der Zelloberfläche oder im Fall von TLR3, TLR7, TLR8 und TLR9 in endosomalen, vakuolären und vesikulären Kompartimenten (Akira et al., 2006; O'Neill et al., 2007; Takeda et al., 2003).

#### 1.1.2.2 Strukturelle Charakteristika von Toll-like-Rezeptoren

TLRs bestehen aus zwei Domänen: Die extrazelluläre Domäne setzt sich aus LRRs (leucine rich repeats) zusammen, die zytoplasmatische Domäne ist homolog zum intrazellulären Teil des IL-1-Rezeptors und wird Toll/IL-1-Rezeptor(TIR)-Domäne genannt (Gay et al., 1991). Die LRRs sind für die Pathogenerkennung zuständig. Die TIR-Domäne vermittelt durch Interaktion mit anderen Proteinen die Signaltransduktion innerhalb der Zelle (Akira et al., 2006).

Toll-like-Rezeptoren als eine bedeutende Familie der humanen PRRs sind homolog zu Toll aus *Drosophila melanogaster*. Toll wurde ursprünglich als mütterliches Gen entdeckt, welches die dorsoventrale Achsenformation in dem Obstfliegenembryo kontrolliert (Anderson et al., 1985). Später konnte dann die bedeutende Rolle dieses Proteins in der Immunantwort von *Drosophila* ausgemacht werden (Lemaitre et al., 1996).

In den Pflanzen sind zytosolische sowie membrangebundene Resistance(R)-Proteine entdeckt worden, welche eine Wirtsabwehr auf mikrobielle Pathogene vermitteln. Einige der transmembranären R-Proteine besitzen Homologien zu den humanen TLRs mit gemeinsamen Charakteristika wie dem Vorhandensein von Leucine-reichen Wiederholungen (leucine rich repeats, LRRs), z.T. TIR-Domänen und der Erregererkennung auf der Zelloberfläche (Dangl et al., 2001).



### 1.1.2.3 Durch die Toll-like-Rezeptoren erkannte Motive

Ein besonders gut untersuchter und biologisch wichtiger Vertreter der PAMPs ist das Lipopolysaccharid (LPS) gramnegativer Bakterien. Es konnte gezeigt werden, dass LPS durch LPB (LPS-binding protein) und CD14 gebunden wird und schließlich in einer NF- $\kappa$ B-Aktivierung sowie einer nachfolgenden Bildung von Tumornekrosefaktor  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) mündet (Schumann et al., 1990). Jedoch erst 1998 konnte der eigentliche Signal-vermittelnde LPS-Rezeptor als TLR4 identifiziert werden (Poltorak et al., 1998). Zusätzlich zu LPS erkennt TLR4 wahrscheinlich auch virale Proteine sowie Hitzeschockproteine (Medzhitov, 2001). Ein weiterer gut untersuchter TLR ist TLR2, welches durch die Heterodimerbildung mit TLR1 bzw. TLR6 ein großes Spektrum an Molekülstrukturen wie tri- und diazetylierte Lipopeptide und Lipoteichonsäure grampositiver Bakterien und auch atypisches LPS von beispielsweise *Leptospira interrogans* erkennt. Der Komplex TLR1-TLR2 reagiert auf Triazyl-Lipopeptide und TLR6-TLR2 detektiert Diazyl-Lipopeptide wie z.B. MALP2 (mycoplasma lipopeptide-2) sowie Zymosan (Takeuchi et al., 2001; Takeuchi et al., 2002). TLR3 erkennt dsRNA, welches von den meisten Viren an einem bestimmten Punkt ihres Infektionszyklus gebildet wird (Alexopoulou et al., 2001). TLR5 deaktiviert Flagellin (Hayashi et al., 2001) und TLR7/8 erkennt einzelsträngige virale RNA sowie bestimmte antivirale Komponenten wie z.B. Imiquimod (Hemmi et al., 2002). Weiterhin soll die Erkennung von CpG-DNA-Motiven, welche vor allem in prokaryoter DNA vorkommt, durch TLR9 hier erwähnt sein (Hemmi et al., 2000). Die Funktion von humanem TLR10 ist noch unbekannt.

### 1.1.2.4 Folgen der TLR-Aktivierung

Die Erkennung von PAMPs durch TLRs führt u.a. zur Produktion von proinflammatorischen Zytokinen, zur Hochregulation kostimulatorischer Moleküle auf Antigen-präsentierenden Zellen und zur Reifung von dendritischen Zellen als ein zentraler Verbindungspunkt zwischen angeborener und erworbener Immunabwehr (Medzhitov, 2001).

### 1.1.3 Nod-like-Rezeptoren

#### 1.1.3.1 Familiäre Zuordnung der Nod-like-Rezeptoren

Die Nod-like-Rezeptoren (NLR) erlangten erstmals Aufmerksamkeit mit der Entdeckung eines Proteins, welches eine sehr große Ähnlichkeit mit Apaf-1, einem Apoptoseprotein, aufweist und als Nod1/CARD4 bezeichnet wurde (Bertin et al., 1999; Inohara et al., 1999). Der strukturelle Aufbau dieser beiden Proteine ist sehr ähnlich, so besitzen beide Proteine eine CARD-Domäne. Nod1 besitzt jedoch LRRs anstatt WD40-Wiederholungen am C-terminalen Ende. WD-40 dient als Erkennungsdomäne für mitochondrialen Schaden, durch Bindung von Cytochrom c kommt es zur Oligomerisierung von Apaf-1. Es folgt eine Interaktion mit der Procaspase-9 durch CARD-CARD-Interaktionen, die schließlich zur Apoptose der Zelle führt (Li et al., 1997). Nach Aktivierung von Nod1 erfolgt auch eine Selbstoligomerisierung, eine Interaktion der CARD-enthaltenden Signalmolekülen und wahrscheinlich ebenso eine Kaspasenaktivierung (siehe unten). Kurze Zeit später konnte Nod2/CARD15 als ein nah verwandtes Protein von Nod1 ausgemacht werden (Ogura et al., 2001b).

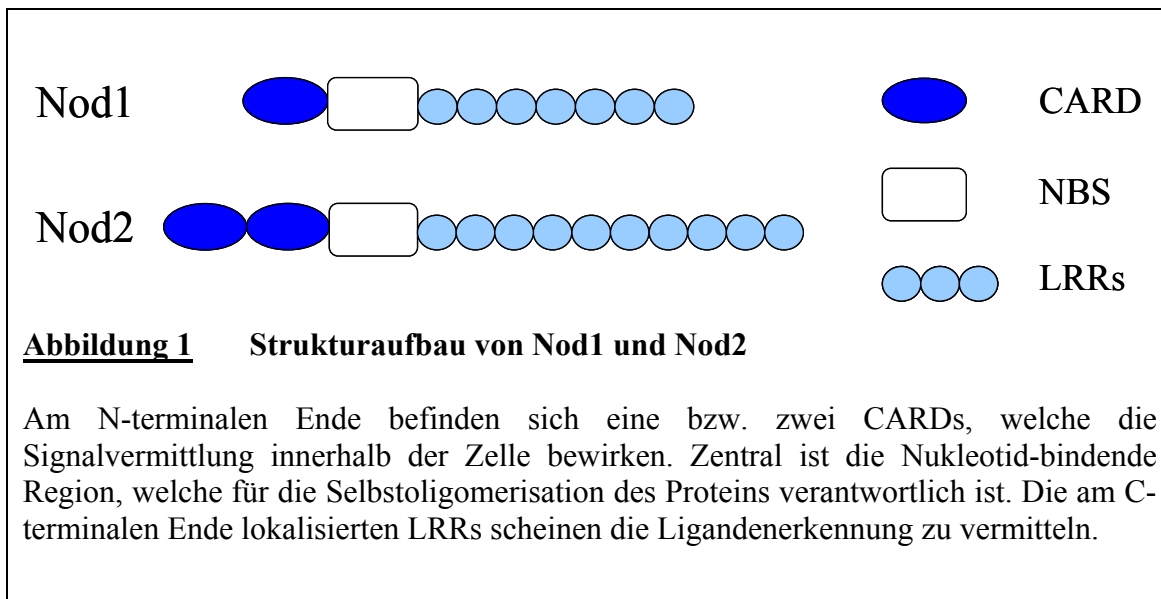
Bisher sind über 20 homologe Proteine zu Nod1 bekannt, jedoch ist die Funktion dieser Nod-like-Rezeptoren noch unklar. Aufgrund ihres Aufbaus können die NLR der Familie der CATERPILLER zugeordnet werden. Charakteristika dieser Familie sind CARD (caspase-activating and recruitment domain), Transkriptionsverstärker (transcription enhancer), R-(Purin)-bindend, Pyrin und viele Leuzin-reiche Wiederholungen (lots of LRRs) (Harton et al., 2002). Wichtige Vertreter sind neben Nod1/CARD4 und Nod2/CARD15 auch IPAF (ice-protease activating factor), NAIP (neuronal apoptosis inhibitory protein) sowie die NALPs (NACHT, LRR, pyrin domain) (Inohara et al., 2003a; Ting et al., 2005).

### *1.1.3.2 Lokalisation von Nod1 und Nod2*

Nod1 und Nod2 sind zytoplasmatische Proteine. Nod1 ist in nahezu allen Zellen vorzufinden (Inohara et al., 1999). Nod2 hingegen wird nur von wenigen Zellen exprimiert, dazu gehören Monozyten, Granulozyten sowie dendritische Zellen. Außerdem sind geringe Mengen an Nod2 in T-Zellen vorzufinden (Ogura et al., 2001b). Eine Hochregulation der Nod2-Expression in Leukozyten und Epithelzellen konnte nach Stimulation mit TNF $\alpha$  oder LPS beobachtet werden (Gutierrez et al., 2002).

### *1.1.3.3 Strukturelle Charakteristika von Nod-Rezeptoren*

Der Name Nod steht für „nucleotide-binding oligomerization domain“. NLR bestehen aus einer Effektor-bindenden Domäne (CARD), einer zentral lokalisierten Nukleotidbindungsstelle (NBS) und Leuzin-reichen Wiederholungen (LRRs) (Inohara et al., 2004). Nod2 besitzt zwei NH<sub>2</sub>-terminale CARDS, Nod1 dagegen nur eine CARD. Analog zur TIR-Domäne bei den TLRs dient die CARD-Domäne bei den NLR zur Signalübermittlung innerhalb der Zelle. Die CARD-Domänen vermitteln Protein-Protein-Interaktionen in verschiedenen Signalwegen der Zelle. Dementsprechend sind CARDS verschiedener Proteine in Apoptose und Entzündungsreaktionen verwickelt (Bertin et al., 2000; Hofmann et al., 1997). Die NBS ist verantwortlich für die ATP-abhängige Selbstoligomerisation des NLR, was eine Voraussetzung für die Aktivierung nachgeschalteter Proteine ist. Die NBS enthält Walker-A- und -B-Motive, welche eine ATP-spezifische P-Schleife sowie eine Mg<sup>2+</sup>-Bindungsstelle darstellen (Tschopp et al., 2003). Die LRRs hingegen scheinen analog den TLRs wichtig für die PAMPs-Erkennung zu sein (Kobe et al., 2001). Außerdem regulieren die LRRs die NLR negativ, das heißt in Abwesenheit von Stimuli falten sich die LRRs und verhindern die Selbstoligomerisation des Proteins (Strober et al., 2006). NLR weisen zudem Homologien zu wichtigen Vertretern der pflanzlichen Resistance-Proteinen auf (Ogura et al., 2001b). Eine grobe strukturelle Darstellung bietet die Abbildung 1.



#### 1.1.3.4 PAMPs von Nod1 und Nod2

Eine Aktivierung der NLR erfolgt nach der Erkennung von bestimmten PGN-Fragmenten (Girardin et al., 2003a; Girardin et al., 2003b). Entgegen der Aussage von ersten Studien, in denen PGN-verunreinigtes LPS verwendet wurde, erkennen Nod1 und Nod2 PGN und nicht LPS (Chamaillard et al., 2003b; Girardin et al., 2001; Inohara et al., 2001).

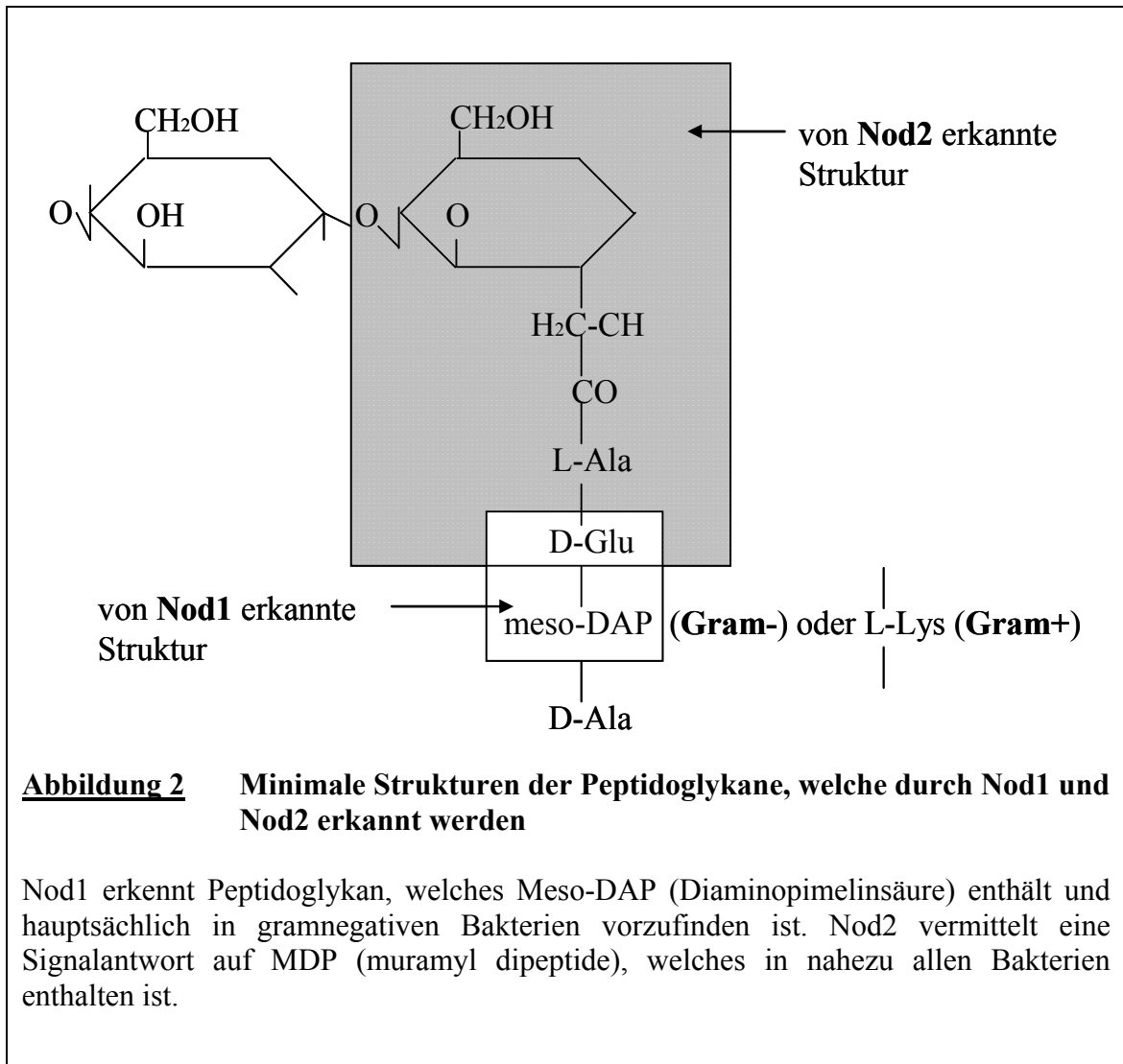
PGN ist ein Hauptbestandteil der Zellwand von grampositiven Bakterien, in gramnegativen Bakterien kommt PGN nur als dünne Schicht im periplasmatischen Raum vor. PGN ist verantwortlich für die Zellform und die mechanische Beweglichkeit der Bakterien. Es besteht aus Glykanketten, welche N-Azetylglukosamin (GlcNAc)- und N-Azetylmuraminsäure (MurNAc)-Zucker enthalten und mit kurzen Peptiden verbunden sind. Ein Unterschied zwischen grampositiven und gramnegativen Peptidoglykanen besteht in der Identität der dritten Aminosäure der Stammpeptide. In grampositiven Bakterien befindet sich an dieser Stelle zumeist Lysin und in gramnegativen Bakterien Diaminopimelinsäure (DAP). Eine Degradierung des PGN erfolgt u.a. während des bakteriellen Entwicklungszyklus durch spezifische bakterielle Hydrolasen oder durch Hydrolasen des Wirtes (Boneca, 2005).

Unlösliches, hochmolekulares PGN besitzt im Gegensatz zu synthetischen PGN-Fragmenten, welche die minimalen Nod-aktivierenden Strukturen enthalten, nur eine sehr geringe Nod1- bzw. Nod2-stimulatorische Fähigkeit (Inohara et al., 2003b). Daher scheint eine Prozessierung der PGN für die Erkennung durch NLR wichtig zu sein.

Im Wirt wird die Glykankette der PGN mit Hilfe des Lysozyms abgespalten, wobei kleinere Muropeptide entstehen, welche iE-DAP- und MDP-Strukturen enthalten. Das Lysozym ist in Körperflüssigkeiten einschließlich Blut und Tränen sowie in Phagozyten vorzufinden. Außerdem spaltet die N-Azetilmuramoyl-L-Alanin-Amidase aus der Leber das PGN im Blut und in der Peritonealflüssigkeit und führt somit zur Bildung iE-DAP-enthaltener Fragmente (Johannsen et al., 1991).

Die kleinste Struktur, welche durch Nod1 erkannt wird, ist das synthetisch herstellbare Dipeptid D-Glu-meso-DAP (siehe Abbildung 2 weißes Kästchen). Dieses Molekül ist vor allem in gramnegativen Bakterien, jedoch nicht natürlicherweise in Vertebraten vorzufinden. GlcNAc-MurACc-L-Ala- $\gamma$ -D-Glu-meso-DAP (GM-tri<sub>DAP</sub>), welches durch Spaltung der PGN durch Amidasen entsteht, ist die minimale natürlich vorkommende durch Nod1 erkannte Struktur (Chamaillard et al., 2003a; Girardin et al., 2003a). Nod2 reagiert auf Muramyldipeptid MurNAc-L-Ala-D-isoGln (MDP), ein PGN-Fragment, welches aus allen Peptidoglykanen durch Lyse mit der Muramidase gespalten werden kann (siehe Abbildung 2 graues Kästchen) (Girardin et al., 2003b; Inohara et al., 2003b).

Es existieren verschiedene Theorien, wie es zur Erkennung von PGN-Fragmenten kommen kann. Erstens wäre dies im Falle einer Infektion mit invasiven zytosolischen Bakterien vorstellbar, welche PGN-Fragmente freisetzen. Zweitens ist denkbar, dass Bakterien über Phago- bzw. Endozytose aufgenommen werden und nachfolgend die Bakterienzellwand durch lysosomale Hydrolasen degradiert wird. Hierfür wäre es allerdings erforderlich, dass Nod1 bzw. Nod2 an diese Phago- oder Endosomen rekrutiert werden oder dass PGN-Fragmente den Phagolysosomen entweichen würden, was jedoch bisher nicht klar bewiesen werden konnte. Drittens könnte PGN durch Injektion über bakterielle Sekretionssysteme in das Zellinnere geschleust werden, wie es für *Helicobacter pylori*-Infektionen gezeigt werden konnte (Viala et al., 2004).



**Abbildung 2** Minimale Strukturen der Peptidoglykane, welche durch Nod1 und Nod2 erkannt werden

Nod1 erkennt Peptidoglykan, welches Meso-DAP (Diaminopimelinsäure) enthält und hauptsächlich in gramnegativen Bakterien vorzufinden ist. Nod2 vermittelt eine Signalantwort auf MDP (muramyl dipeptide), welches in nahezu allen Bakterien enthalten ist.

### *1.1.3.5 Weiter mit der PGN-Erkennung in Verbindung gebrachte PRRs*

Zusätzlich zu Nod1 und Nod2 wird seit längerem TLR2 mit der Erkennung von PGN in Verbindung gebracht, jedoch könnte diese TLR2-stimulierende Aktivität durch Verunreinigungen mit den TLR2-Agonisten Lipoteichonsäure und Lipopeptiden begründet sein (Travassos et al., 2004).

Weiterhin wurden so genannte PGRP (peptidoglycan-recognition proteins) entdeckt, deren Rolle in der Immunabwehr in Vertebraten noch nicht eindeutig geklärt ist. Bisher ist bekannt, dass PGRP-S in den meisten polymorphonukleären Zellen und PGRP-L, welches eine lytische Aktivität besitzt, in der Leber exprimiert wird. Die PGRP-I $\alpha$  und -I $\beta$  sind nur im Ösophagus zu finden (Liu et al., 2001). Ein funktionelles Zusammenwirken von NLR und PGRP in der Erkennung und Immunantwort auf Peptidoglykane erscheint wahrscheinlich.

### *1.1.3.6 Mit Nod-Mutationen assoziierte Erkrankungen*

Mutationen im Nod2-Gen sind mit granulomatösen Erkrankungen wie Morbus Crohn und Blau-Syndrom assoziiert.

Die drei häufigsten, mit Morbus Crohn assoziierten Nod2-Polymorphismen Leu1007fsinsC, Gly908Arg und Arg702Trp bewirken Mutationen in den LRR-Domänen (Hugot et al., 2001). In westlichen Populationen besitzen über 50 % der Morbus Crohn-Patienten eine der häufigsten Nod2-Mutationen, bei 5-20 % der Patienten liegt diese Mutation homozygot oder zusammengesetzt heterozygot vor (van Heel et al., 2003). Dies zeigt die wichtige Rolle von Nod2 in der Pathogenese dieser Erkrankung auf.

Bei Überexpression Morbus Crohn-assoziiierter Mutanten von Nod2 konnte eine verminderte NF- $\kappa$ B-Aktivierung durch Peptidoglykan beobachtet werden (Ogura et al., 2001a). Da sich fast alle mit Morbus Crohn assoziierten Mutationen in den LRRs befinden, könnte die verminderte NF- $\kappa$ B-Aktivierung mit der beeinträchtigten PAMP-Erkennung durch die LRRs erklärt werden. Somit wird eine durch diese verminderte Nod2-Aktivität beeinträchtigte Immunantwort auf Darmbakterien diskutiert: Bei Patienten mit Morbus Crohn kommt es möglicherweise durch eine insuffiziente, Nod2-vermittelte, angeborene Immunantwort zu einer verstärkten Invasion von luminalen Bakterien in die Epithelzellen. Es resultiert in der nächsten Schicht der Mukosabarriere eine starke TLR- bzw. T-Lymphozyten-getriggerte Immunantwort mit nachfolgender übermäßiger Zytokinausschüttung (Kennzeichen von Morbus Crohn).

In der Pathogenese von Morbus Crohn spielt die Dysregulation unterschiedlicher Zytokine eine wichtige Rolle. In Nod2-defizienten Mäusen war ein Verlust der Erkennung von bakteriellem MDP mit reduzierter Aktivität verschiedener Signalmoleküle zu verzeichnen („loss-of-function“) (Kobayashi et al., 2005). Im Gegensatz dazu besaßen Mäuse mit homozygoter Nod2fs-Mutation nach Stimulation mit MDP erhöhte Spiegel an Interleukin 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) im Vergleich zum Wildtyp („gain-of-function“) (Maeda et al., 2005). Die Differenzen dieser beiden Publikationen sind möglicherweise auf genetische Unterschiede der Mäuse und eine unterschiedliche Experimentgestaltung zurückzuführen.

In vitro-Zellmodelle mit humanen Nod2-Mutationen-tragenden Zellen zeigten eine stark verminderte Antwort auf MDP (Inohara et al., 2003b; Li et al., 2004; Netea et al.,



2004). Es bleibt allerdings unklar, warum die Nod2fs-Mutation zu „loss-of-function“ in humanen Zellen und im Mausmodell zu „gain-of-function“ führen.

Weiterhin sind bestimmte Nod2-Mutationen in der zentralen Nukleotid-bindenden Region des Proteins mit dem Blau-Syndrom assoziiert und führen im Gegensatz zu den Morbus Crohn-assoziierten Mutationen zu einer verstärkten bzw. konstitutiven NF- $\kappa$ B-Aktivierung („gain-of-function“) (Chamaillard et al., 2003b).

Auch für Nod1 konnte kürzlich eine Assoziation von genetischen Variationen dieses Proteins und der Prädisposition zur Entwicklung einer IBD (inflammatory bowel disease) gezeigt werden (McGovern et al., 2005).

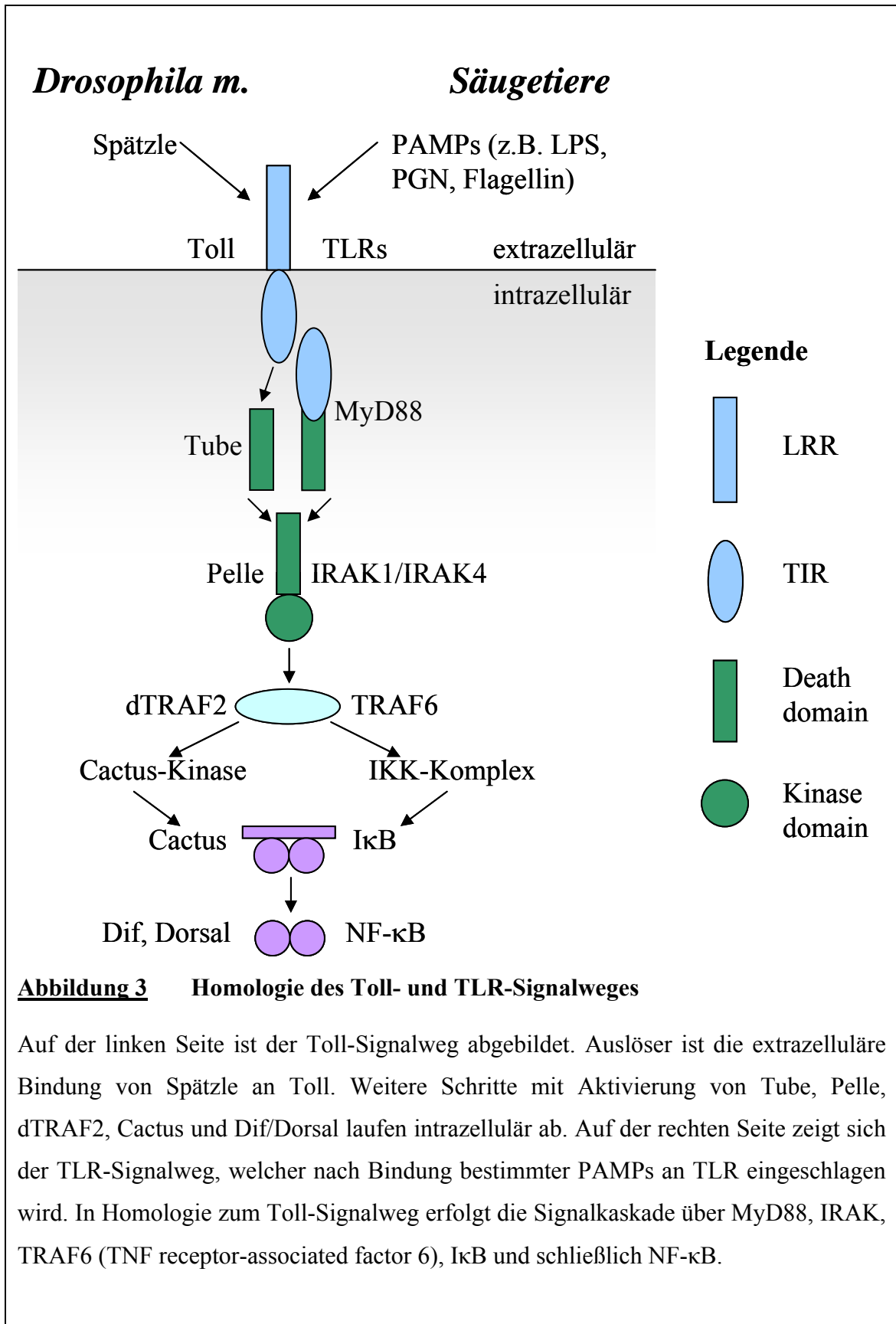
Darüber hinaus wurde ein Nod1-Polymorphismus auch mit erhöhten IgE-Spiegeln und Asthma bronchiale in Verbindung gebracht (Hysi et al., 2005). Dabei konnte ein Insertions-Deletions-Polymorphismus (ND<sub>1</sub>+32656) innerhalb des Nod1-Gens nachgewiesen werden, welcher bei Vorhandensein mit erhöhten IgE-Werten als auch mit dem Auftreten von Asthma bronchiale deutlich assoziiert ist. Die IgE-Spiegel waren dabei Allergen-unspezifisch, vermutlich da sie aus einer Modifikation der epithelialen Entzündungsreaktion durch Nod1-Varianten resultierten. Eine weitere veröffentlichte Studie konnte ebenso eine Assoziation von Nod1-Polymorphismen mit atopischen Ekzemen und Asthma bronchiale zeigen (Weidinger et al., 2005).

Insgesamt scheinen Polymorphismen der Nod1- und Nod2-Gene mit unterschiedlichen inflammatorischen bzw. immunologischen Krankheiten assoziiert zu sein.

### 1.1.4 Intrazelluläre Signalwege

#### 1.1.4.1 TLR-Signalweg

Der Toll-Signalweg als ein essentieller Faktor der Immunabwehr von *Drosophila melanogaster* ist zu den TLR- und IL-1-Rezeptor-Signalwegen im Vertebraten homolog, welche letztendlich zur Aktivierung von NF- $\kappa$ B führen. Toll, der IL-1-Rezeptor und TLR besitzen eine homologe intrazytoplasmatische Toll-IL-1R(TIR)-Domäne. Weitere Homologien finden sich in den beteiligten Signalmolekülen wie z.B. dTube/hMyD88, dPelle/hIRAK1 (interleukin1 receptor associated kinase), dDorsal,dDif/hNF- $\kappa$ B und dCactus/hI $\kappa$ B (Inhibitor von  $\kappa$ B) (Khush et al., 2001). Eine Übersicht zum Toll- und TLR-Signalweg gibt die Abbildung 3.

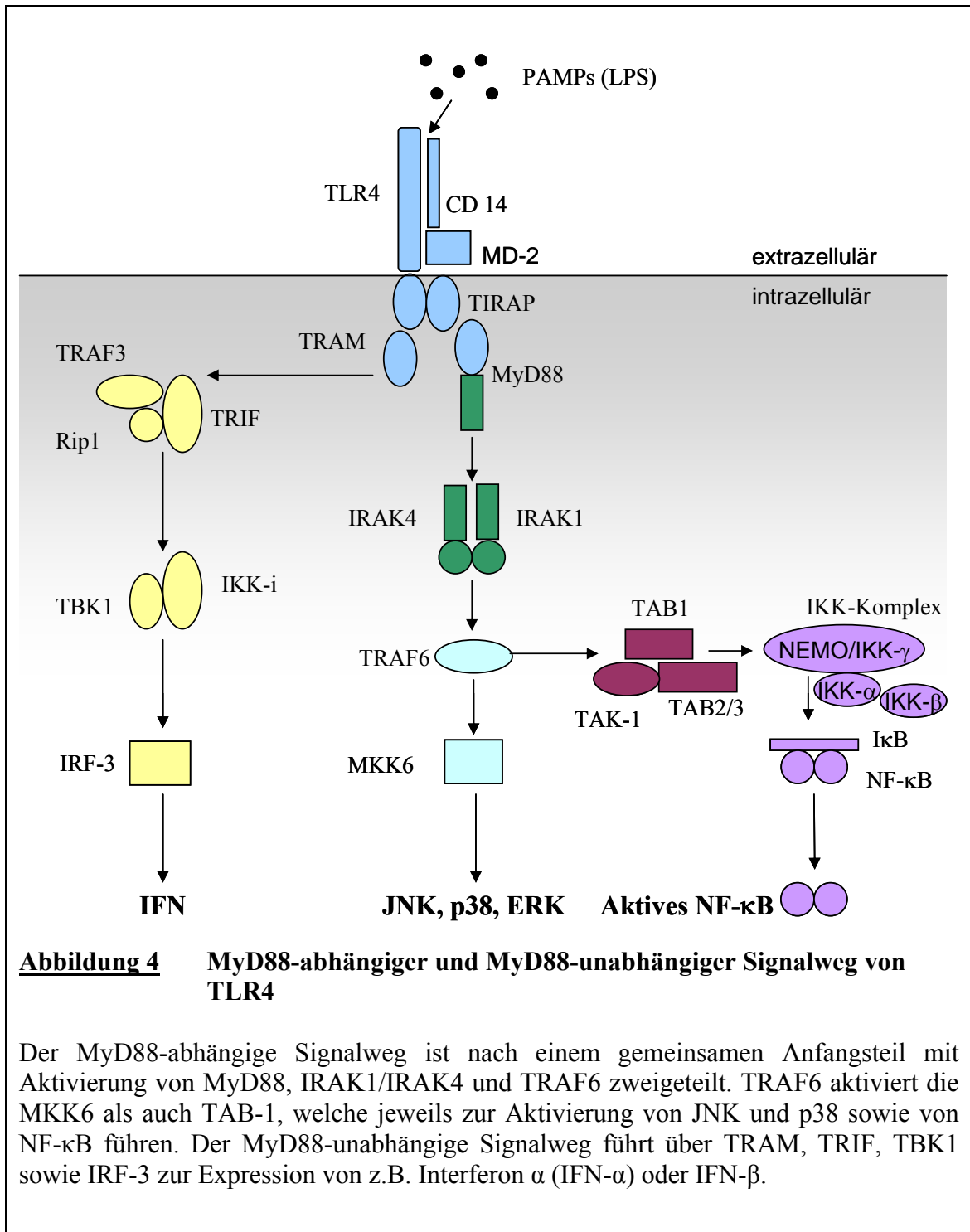


Für die TLRs sind in der Literatur unterschiedliche Signalwege beschrieben. Der Signalweg von TLR4 ist dabei am besten untersucht. Die LPS-Erkennung durch TLR4 ist von MD2 und CD14 als Korezeptoren abhängig. Nach Erkennung von LPS durch TLR4 bindet Mal und MyD88 an die intrazelluläre TIR-Domäne. Es folgt die Interaktion mit IRAK1 und IRAK4. Im Weiteren wird TRAF6 (TNF receptor-associated factor 6) nach Autophosphorylierung der IRAKs aktiviert und induziert die Aktivierung der TGF- $\beta$ -aktivierten Kinase (TAK-1) sowie der mitogen-aktivierten Proteinkinasekinase (MKK6). Im Einzelnen wird ein Komplex bestehend aus der TGF- $\beta$ -aktivierten Kinase (TAK-1) und TAK-1-bindende Proteine TAB1, TAB2 und TAB3 von TRAF6 rekrutiert. TAK-1 führt dann zur Phosphorylierung von IKK- $\beta$  und MKK6. Die aktivierte TAK-1 wiederum führt zur Aktivierung des I $\kappa$ B-Kinase(IKK)-Komplex, welcher aus den Kinasen IKK $\alpha$  und IKK $\beta$  und einer regulatorischen Untereinheit, NF- $\kappa$ B essential modulator(NEMO)/IKK $\gamma$  genannt, besteht. Der IKK-Komplex ist für die Serin-Phosphorylierung der inhibitorischen Moleküle (I $\kappa$ B) von NF- $\kappa$ B verantwortlich und führt somit zu einer Freisetzung von NF- $\kappa$ B.

Die Aktivierung von MKK6 hingegen bewirkt eine Aktivierung von MAP-Kinasen, p38, JNK (Jun-N-terminal kinase) und ERK (extracellular signal-regulated kinase) (Adachi et al., 1998; Fitzgerald et al., 2001; Horng et al., 2001).

Zusätzlich zum MyD88-abhängigen Signalweg existiert ein MyD88-unabhängiger Signalweg, welcher über TLR4 abhängig vom Adaptermolekül TRAM und TRIF ist. TLR3 aktiviert ausschließlich eine MyD88-unabhängige Signalkaskade, welche über TRIF vermittelt wird. Zur Aktivierung von NF- $\kappa$ B interagiert TRIF mit Rip1. Außerdem aktiviert TRIF TBK1 (TANK-bindende Kinase 1) über TRAF3. Dies führt zur Induktion der I $\kappa$ B-Kinase IKK-i, welche direkt IRF-3 und IRF-7 phosphoryliert. Phosphoryliertes IRF-3 und IRF-7 bilden Homodimere, welche im Nukleus ISREs (IFN-stimulated response elements) binden und somit zur Expression von IFN-induzierbaren Genen führen (Akira et al., 2006; Takeda et al., 2004).

Die Abbildung 4 zeigt den Ablauf des MyD88-abhängigen sowie MyD88-unabhängigen Signalweges von TLR4.



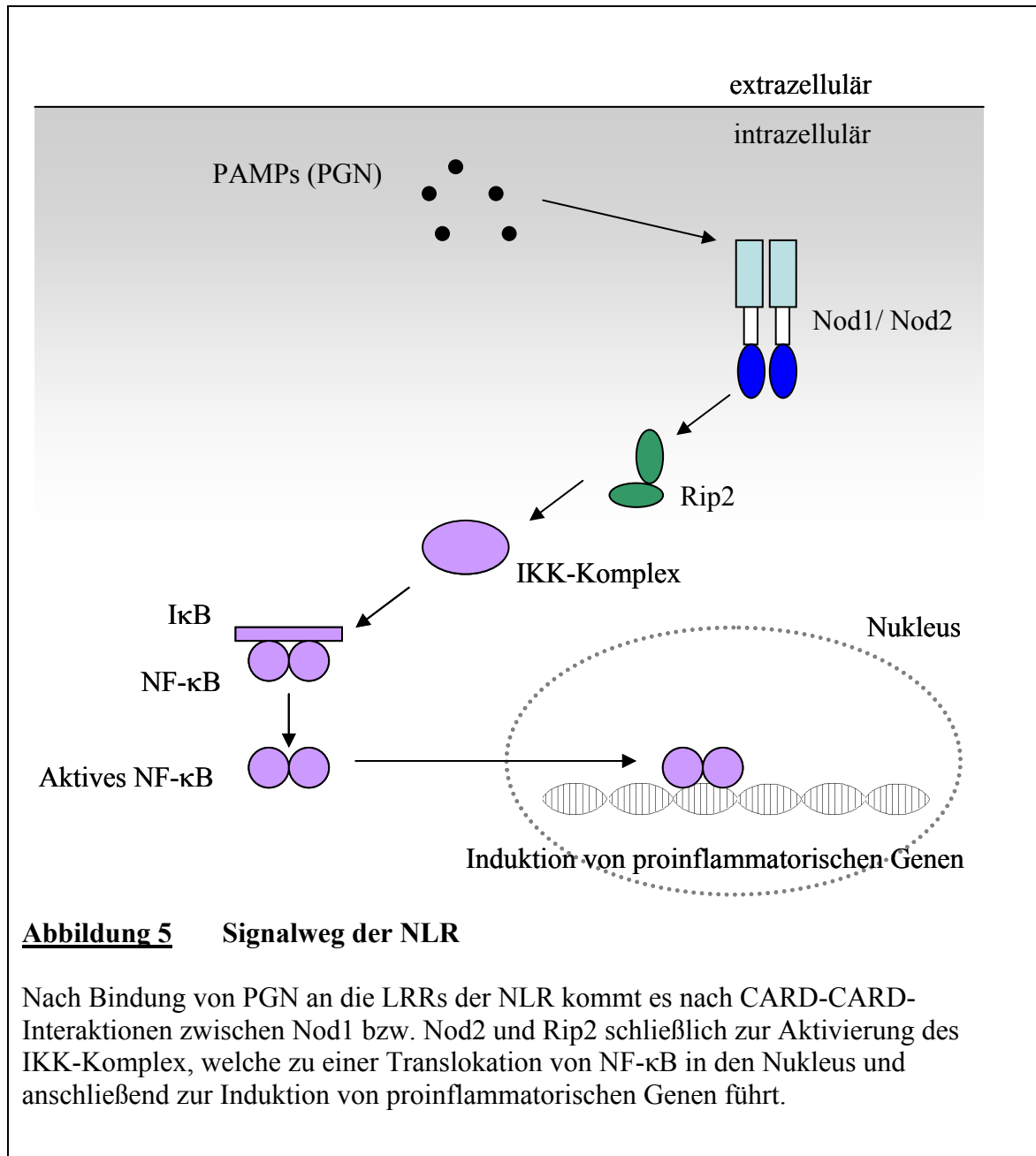
### 1.1.4.2 Signalweg von Nod1 und Nod2

Der Nod1- bzw. Nod2-vermittelte Signalweg ist bisher nur zum Teil verstanden. Es ist beschrieben, dass es nach Aktivierung von Nod1 bzw. Nod2 zur Entfaltung und Selbstoligomerisierung des Nod-Proteins kommt, wodurch eine Signalübermittlung ermöglicht wird (Philpott et al., 2004). Über die weiteren Schritte des Signalweges ist bisher bekannt, dass eine Interaktion der CARD von Nod1 bzw. Nod2 mit der CARD-Domäne der Kinase RICK/Rip2 erfolgt. Diese Interaktion ermöglicht eine Aktivierung des IKK-Komplexes und eine nukleäre Translokation von NF- $\kappa$ B mit anschließender Induktion von proinflammatorischen Genen (Inohara et al., 2000; Ogura, 2001b). Eine graphische Darstellung dazu bietet die Abbildung 5.

Weiterhin wurde beschrieben, dass die Promoter-Region von Nod2 eine NF- $\kappa$ B-Bindungsstelle enthält. Daher wird durch NF- $\kappa$ B die Expression von Nod2 gesteigert, das heißt Nod2 bewirkt selbst eine Hochregulation der eigenen Expression zur Wirkungsverstärkung. Die Nod2 nachgeschaltete Kinase RICK/Rip2 wird gleichermaßen durch NF- $\kappa$ B hochreguliert (Gutierrez et al., 2002; Kobayashi et al., 2002).

Rip2 ist ein CARD-enhaltendes Adapterprotein und wird auch RICK (Rip-like CARD-containing domain) bzw. CARDIAK (CARD-containing interleukin-1 $\beta$ -converting enzyme-associated kinase) genannt. Rip2 besitzt eine homologe Struktur zu Rip1, Rip3 und Rip4 (beteiligt an Signalwegen von TLR4, TLR3 und dem TNF $\alpha$ -Rezeptor) sowie zu den IRAKs und pflanzlichen Pto-Kinasen (Kobayashi et al., 2002; McCarthy et al., 1998). Abgesehen von der oben beschriebenen Aktivierung von NF- $\kappa$ B scheint Rip2 möglicherweise an der Aktivierung der Procaspase-1 mit nachfolgender Interleukin 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ )-Produktion beteiligt zu sein (Thome et al., 1998). Für Nod1 konnte ebenso eine Caspase-1-vermittelte Prozessierung von Pro-Interleukin-1 $\beta$  mit Aktivierung von IL-1 $\beta$  durch Nod1 gezeigt werden (Yoo et al., 2002). Dies lässt einen direkten Zusammenhang zwischen beiden Beobachtungen vermuten. Weiterhin ist in der Literatur beschrieben, dass Nod1 auch die c-JUN N-terminale Kinase nach Kontakt mit Bakterien aktiviert (Girardin et al., 2001).

Zusammenfassend scheinen Nod1 als auch Nod2 in unterschiedlichen Zellreaktionen eine Rolle zu spielen, wobei deren genaue Bedeutung nicht vollständig verstanden sind.



**Abbildung 5** Signalweg der NLR

Nach Bindung von PGN an die LRRs der NLR kommt es nach CARD-CARD-Interaktionen zwischen Nod1 bzw. Nod2 und Rip2 schließlich zur Aktivierung des IKK-Komplex, welche zu einer Translokation von NF-κB in den Nukleus und anschließend zur Induktion von proinflammatorischen Genen führt.

### 1.1.4.3 *NF-κB*

NF-κB ist in einer Vielzahl von physiologischen und auch Krankheitsprozessen u.a. wie Entwicklungsprozessen, Entzündungsreaktionen, Immunantworten, Zellwachstum, Kanzerogenese sowie Arteriosklerose involviert (Baldwin, 2001). NF-κB ist ein induzierbarer Transkriptionsfaktor der Rel-Familie. Über 150 verschiedene extrazelluläre Stimuli können zu einer Aktivierung von NF-κB führen (Pahl, 1999), beispielsweise werden Bakterien, Viren, Interleukine, Wachstumsfaktoren und verschiedene Stressfaktoren dazugezählt. In unstimulierten Zellen befinden sich die NF-κB-Proteine vor allem im Zytoplasma vor und sind mit den inhibitorischen Proteinen der IκB-Familie assoziiert. Proinflammatorische und stressassoziierte Signalkaskaden führen zu einer Phosphorylierung sowie einer Proteasom-abhängigen Degradierung von IκB bzw. einer partiellen Degradierung der Vorläufer, was wiederum zur Freisetzung von freiem NF-κB führt. Freies NF-κB lagert sich an κB-Bindungsstellen in Promotorregionen von z.B. proinflammatorischen Genen an und initiiert somit Transkription verschiedener Gene, wobei über 150 Zielgene ausgemacht wurden (Pande et al., 2005). Zu den NF-κB regulierenden Zielgenen zählen u.a. Akute-Phase-Proteine, Zelladhäsionsmoleküle, Zytokine wie IL-1, IL-2, IL-6, IL-8 und IFN-γ, TNFα und TNFβ, Enzyme, Wachstumsfaktoren, Apoptoseregulatoren sowie Transkriptionsfaktoren (Pahl, 1999). Zusammenfassend kann NF-κB als ein zentraler Vermittler oder humanen Stressantwort bezeichnet werden.



### 1.1.5 Endothelzellen

Das Blutgefäßsystem zählt zu den größten Organen des Körpers. Von großen Arterien und Venen bis hin zu den kleinsten postkapillären Venolen sind alle Gefäße mit Endothelzellen ausgekleidet. Dabei sind die Endothelzellen nicht nur eine bloße Beschichtung der Gefäßwand. Sie sind auch an unterschiedlichsten physiologischen Prozessen beteiligt: So übernehmen Endothelzellen aktive Transporte von Mikro- und Makromolekülen sowie Hormonen. Weiterhin sind sie an der Regulation des Blutdrucks, der Blutgerinnung, der Fibrinolyse, der Transmigration von Entzündungszellen und der Angiogenese beteiligt (Bouis et al., 2001).

Darüber hinaus sind sie ein Bestandteil der angeborenen Immunantwort. In humanen dermalen Endothelzellen und humanen Nabelschnurvenenzellen konnte eine starke TLR-4-, jedoch nur schwache TLR-2-Expression nachgewiesen werden (Faure et al., 2000). Diese TLRs zeigten eine Beteiligung bei der angeborenen Immunabwehr gegen unterschiedlichste Pathogene in vaskulären Endothelzellen.

Kardiovaskuläre Risikofaktoren wie Hypercholesterinämie, arterieller Hypertonus, Nikotinabusus und Diabetes mellitus verursachen oxidativen Stress. Dies führt zu einer endothelialen "Dysfunktion" mit nachfolgend verminderter Kapazität zur Aufrechterhaltung des Gleichgewichts. Dadurch wird ein pathologischer, lokaler Entzündungsprozess in den Gang gebracht, welcher durch die Entstehung von oxidativen Nebenprodukten und freien Radikalen noch begünstigt wird. Es resultiert eine Gefäßerkrankung, die Arteriosklerose genannt wird. Diese Pathomechanismen zeigen, dass Endothelzellen eine wichtige Rolle in dem Prozess der Arteriosklerosentstehung zukommen (Esper et al., 2006).

### 1.1.6 *Chlamydophila pneumoniae*

#### 1.1.6.1 Allgemeine Charakteristika

Chlamydien sind gramnegative, obligat intrazelluläre Bakterien. Die Chlamydien gehören zur Familie der Chlamydiaceae. Von den Chlamydien ist die Gattung der *Chlamydophila* abzugrenzen, zu denen *C. pneumoniae* und *C. psittaci* gehören. Nur ein Serotyp ist bisher von *C. pneumoniae* in der Literatur beschrieben, wobei der Mensch das einzige Erregerreservoir darstellt. Die Übertragung dieses Erregers erfolgt aerogen oder durch Speichelkontakt von Mensch zu Mensch.

Erstmal konnte *C. pneumoniae* 1965 aus der Konjunktiva eines taiwanesischen Kindes isoliert werden (TW183). 1983 wurde der respiratorische Stamm (AR39) isoliert. Beide Stämme zeigten eine Homologie von über 99,5% und wurden als eigene Chlamydien-Spezies mit dem Namen *C. pneumoniae* (Stamm TWAR) 1986 deklariert (Grayston et al., 1986).

Die *Chlamydophila* besitzen im Gegensatz zu den Chlamydien keine messbare Glykogenproduktion sowie eine andere Genomgröße. Da Chlamydien ATP nicht selbst erzeugen können, sind sie auf die intrazelluläre Vermehrung in den Wirtszellen und deren ATP-Synthese angewiesen (Hesse et al., 2003).

#### 1.1.6.2 Durch *C. pneumoniae* hervorgerufene Krankheiten

*C. pneumoniae* verursacht akute respiratorische Erkrankungen wie Sinusitis, Pharyngitis, Bronchitis und Pneumonie (Clements et al., 2002). Darüber hinaus kann durch *C. pneumoniae* eine Exazerbation der GOLD (chronic obstructive lung disease) hervorgerufen werden (Blasi et al., 2002). Obwohl ein hoher Durchseuchungsgrad mit *C. pneumoniae* (etwa 60 % der 20-Jährigen) besteht, lässt sich die genaue Verbreitung von *C. pneumoniae*-Infektionen nur schätzen. Laut der aktuellen CAPNETZ-Untersuchung sind jedoch lediglich 0,9 % der ambulant erworbenen Pneumonien durch *C. pneumoniae* verursacht (Aldous et al., 1992; Wellinghausen et al., 2006; Welte et al., 2006). Die Inkubationszeit für Infektionen mit *C. pneumoniae* beträgt circa 1-4 Wochen.

Es besteht weiterhin eine Assoziation zwischen der chronisch-persistierenden bzw. rezidivierenden Infektion mit *C. pneumoniae* und dem vermehrtem Auftreten von Asthma und GOLD (Laurila et al., 1997). Außerdem ist dieser Erreger mit

Arteriosklerose in Zusammenhang gebracht worden (Kol et al., 1998; Libby et al., 1997; Muhlestein et al., 1998): 1988 wurde eine Studie publiziert, welche eine Serokonversion von Antikörpern gegen das Epitop von chlamydialen LPS während der akuten Myokardinfarktsperiode zeigte (Libby et al., 1997). Diese Serokonversion konnte nicht bei Patienten mit chronischer Herzerkrankung nachgewiesen werden, jedoch zeigte sich in beiden Gruppen (akuter Myokardinfarkt, chronische Herzerkrankung) ein erhöhter Antikörpertiter gegen *C. pneumoniae* im Vergleich zur gesunden Population. Möglicherweise lag bei den Patienten mit chronischer koronarer Herzerkrankung (KHK) eine chronische Infektion mit *C. pneumoniae* vor und der akute Myokardinfarkt war ein Zeichen der akuten Exazerbation dieser Infektion. Der Nachweis von *C. pneumoniae* innerhalb koronarer Plaques auch bei Patienten ohne Antikörper gegen Chlamydien (Kuo et al., 1993) ergab einen weiteren Hinweis darauf, dass *C. pneumoniae* möglicherweise einen Pathogenesefaktor für das akute Koronarsyndrom darstellt. Nach dieser Hypothese unterstützt eine chronische, asymptomatische Infektion mit *C. pneumoniae* die Entstehung von Arteriosklerose und möglicherweise auch die Plaqueinstabilität. Auch chlamydiales Hitzeschockprotein 60 (HSP60) konnte in Makrophagen innerhalb der Plaques nachgewiesen werden und ist möglicherweise ein bedeutsamer Pathogenesefaktor der Arteriosklerose (Kol et al., 1998). So scheint es zu immunologischen Kreuzreaktionen zwischen bakteriellem und humanem HSP60 zu kommen. Libby et al konnten zeigen, dass die chlamydiale Infektion von humanen Monozyten zu einer TNF $\alpha$ - sowie IL-6-Produktion führen, welche dann über eine Exazerbation der lokalen Inflammation möglicherweise zu Plaqueinstabilität und Thrombose führen (Libby, 1995). Mittlerweile ist der Nachweis von *C. pneumoniae* mit Hilfe von vielfältigen Methoden wie Elektronmikroskopie, Immunhistochemie, PCR (Polymerase chain reaction), in situ-Hybridisierung und Kultur gelungen (Kuo et al., 1995).

Es wird vermutet, dass die Chlamydien nach pulmonaler Infektion durch Monozyten transportiert werden oder über einen direkten Zugang zum Blutstrom bei kurzzeitiger chlamydialer Bakteriämie in den Systemkreislauf gelangen (Krull et al., 1999). Es gibt verschiedene Hinweise auf eine aktive Beteiligung von *C. pneumoniae* an der resultierenden Entzündungsreaktion der Gefäßwände. *C. pneumoniae* kann sich in den Endothel- und auch glatten Muskelzellen der Gefäßwände vermehren und führt in diesen Zellen zu einer Induktion der Produktion von Adhäsinen, Zytokinen, Wachstums- und Gewebefaktoren (Kol et al., 1999).

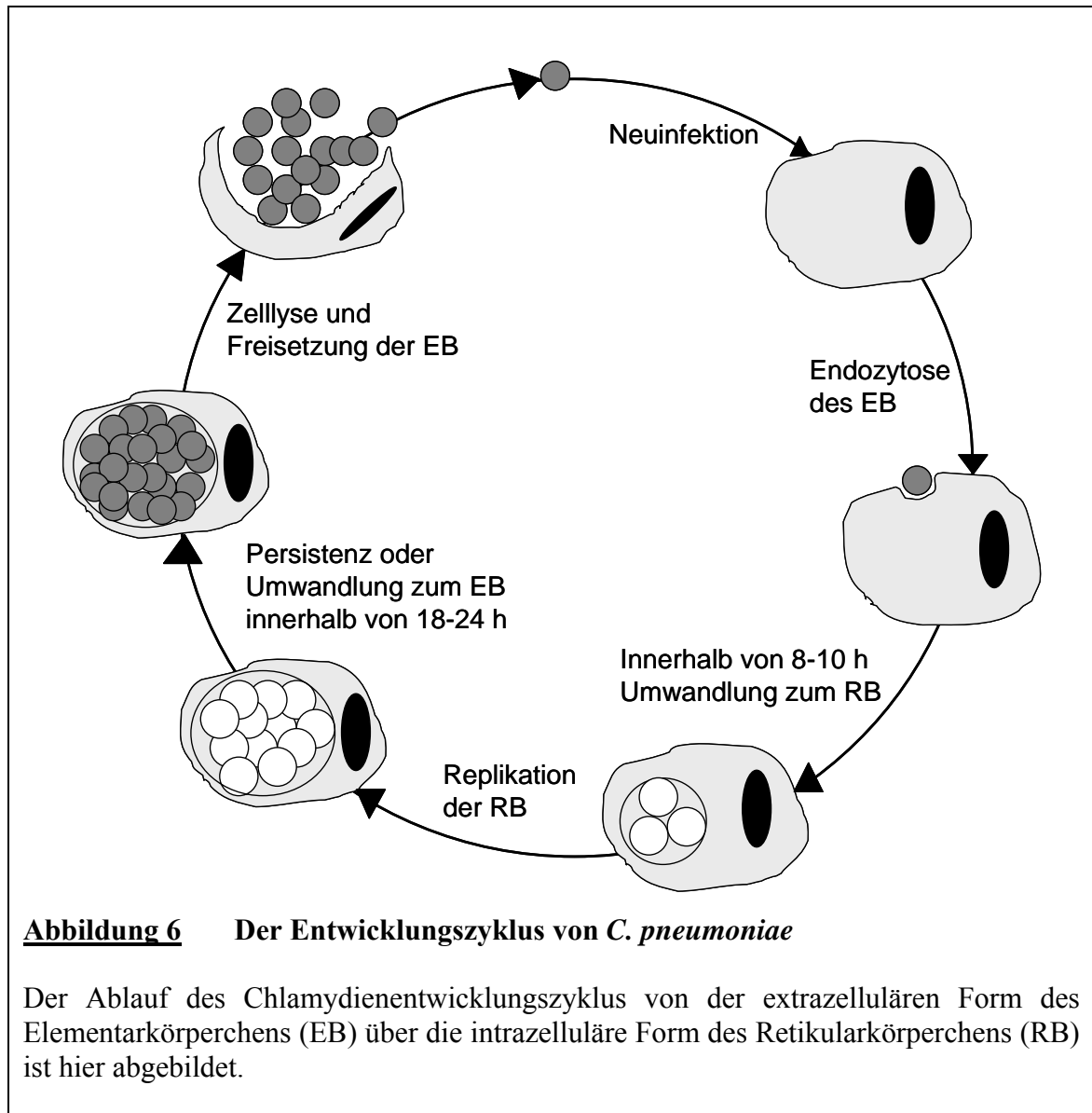
### 1.1.6.3 Mechanismen der Zellinvasion durch *C. pneumoniae*

Die Internalisierung von Chlamydien ist ein endozytotischer Vorgang (Dautry-Varsat et al., 2005). Mögliche Rezeptoren der initialen Zelladhäsion von *C. pneumoniae* könnten die Heparansulfat-ähnlichen Glykosaminoglykane auf der Oberfläche der Zielzellen sein, welche auf der Oberfläche von Epithelzellen nachgewiesen wurden (Wuppermann et al., 2001). Dabei handelt es sich wahrscheinlich um reversible, elektrostatische Interaktionen zwischen diesen Molekülen und Teilen von *C. pneumoniae*.

Auf Endothelzellen wurde der Mannose-6-Phosphat/Insulin-ähnlicher Wachstumsfaktor 2-Rezeptor als weiteres die Zellinvasion von *C. pneumoniae*-vermittelndes Zelloberflächenmolekül ausgemacht (Puolakkainen et al., 2005). Danach folgt eine irreversible Interaktion mit einem weiteren, bisher unbekanntem Wirtszellrezeptor. Durch die Rezeptoraktivierung folgt die Initiierung spezieller Wirtszellsignalwege, wodurch eine bakterielle Internalisierung getriggert wird. Dabei ist es schwierig, diese dem Eintrittsprozess zugehörige Zellaktivierung von Prozessen abzugrenzen, welche der inflammatorischen Wirtszellantwort im Sinne einer Abwehrreaktion dienen. Die GTPase Dynamin2 ist an der chlamydialen Endozytose in die Epithelzellen maßgeblich beteiligt. Sie reguliert die Abspaltung neugeformter Vesikel aus der Plasmamembran und verknüpft endozytotische Moleküle mit dem Aktin-Zytoskelett durch Verbindung unterschiedlichster Proteine (Dautry-Varsat et al., 2005). Durch Sekretion von bakteriellen Proteinen kann im Allgemeinen eine Internalisierung getriggert werden. Im Fall von *C. pneumoniae* ist ein TypIII-Sekretionssystem bekannt, welches Tarp sezerniert. Dieses Protein führt dann zu einer Rekrutierung von Aktin (Clifton et al., 2004) und somit zu der Internalisierung von *C. pneumoniae*.

### 1.1.6.4 Erregervermehrung

Im Laufe des Entwicklungsprozesses nehmen Chlamydien zwei unterschiedlich differenzierte Formen an. Das Elementarkörperchen (EB oder elementary body) ist die extrazelluläre, infektiöse Entwicklungsform, welche nur ca. 0,3 µm groß ist und keine meßbare metabolische Aktivität besitzt. Die intrazelluläre, replikative Entwicklungsform nennt man Retikularkörperchen (RB oder reticulate body). Dieses zeichnet sich durch eine Größe von 1 µm, eine metabolische Aktivität und das Fehlen von Infektiosität aus. Der Replikationszyklus der Chlamydien findet in zytoplasmatischen Vakuolen statt. Die infektiösen Elementarkörperchen gelangen, wie oben beschrieben, durch rezeptorvermittelte Endozytose in die Zellen. Danach erfolgt unter Rekrutierung von Substraten und Energieträgern der Wirtszelle die Entwicklung zum Retikularkörperchen. Die Signale, welche eine Differenzierung vom EB zum RB sowie vom RB zum EB auslösen, sind unbekannt. Die Umwandlung geschieht innerhalb von 8-10 h, gefolgt von Proliferation und Teilung der Erreger. Schließlich findet eine Zurückdifferenzierung der Retikularkörperchen in Elementarkörperchen statt, welche nach dem Verlassen der Zelle neue Zellen infizieren können ((Perfettini et al., 2003), Abbildung 6). Durch den Zelltod der epithelialen Zellen kommt es zur Freisetzung von infektiösen Elementarkörperchen (Kuo et al., 1995), welche wiederum neue Zellen infizieren können. Der gesamte Replikationszyklus von *C. pneumoniae* dauert 2-3 Tage.



### 1.1.6.5 PAMPs der Chlamydien

Das chlamydiale Genom konnte 1999 vollständig entschlüsselt und eine Vielzahl von Proteinen-kodierenden Sequenzen identifiziert werden (Kalman et al., 1999). Nur wenige dieser Proteine besitzen jedoch eine immunmodulatorische Aktivität. Als mögliche chlamydiale Moleküle, welche im Sinne von PAMPs eine Zellaktivierung vermitteln, kommen Proteine des äußeren Membrankomplexes ("outer membrane complex") wie Omp1 (major outer membrane proteine, MOMP), Omp2, OmpA/B, Omp3 oder OmcB in Frage. Weitere chlamydiale PAMPs sind die chlamydialen Hitzeschockproteine cHSP60 bzw. GroEL-1 sowie chlamydiales LPS. Darüber hinaus besitzen die Chlamydien möglicherweise Peptidoglykan oder Peptidoglykan-ähnliche Strukturen (Cunningham et al., 2003; Krull et al., 2005). Mögliche Virulenzfaktoren von *C. pneumoniae* sind ein Typ-III-Sekretionssystem sowie der "chlamydiale Proteasen- oder Proteasom-ähnlicher Aktivitätsfaktor" (CPAF).

### 1.1.6.6 Chlamydien-Wirtszell-Interaktion

In verschiedenen Studien konnte gezeigt werden, dass TLR2 und TLR4 eine wichtige Rolle in der Erkennung von *C. pneumoniae* durch verschiedene Wirtszellen spielen (Prebeck et al., 2001; Sasu et al., 2001). Hierbei schien TLR2 eine größere Bedeutung als TLR4 in der Erkennung von *C. pneumoniae* zu besitzen, wobei beide zusammen eine optimale Zytokinsekretion bewirkten. Chlamydiales HSP60 als auch LPS scheinen eine Zellaktivierung über TLR4 zu verursachen. Die chlamydialen PAMPs, welche die TLR2-Aktivierung vermitteln, sind bisher nicht identifiziert. Allerdings werden Peptidoglykan oder Peptidoglykan-ähnliche Strukturen diskutiert (Netea et al., 2002). Unmethylierte chlamydiale CpG-DNA könnte darüber hinaus über TLR9 erkannt werden (Derbigny et al., 2005). Mannose-bindendes Lektin vermittelt eventuell die Zellaktivierung durch chlamydiales MOMP (Swanson et al., 1998).

In humanen Endothelzellen wurde nach Infektion mit *C. pneumoniae* eine Aktivierung der MAP-Kinasen ERK1/2, p38 MAPK und SAPK/JNK beobachtet (Krull et al., 1999; Krull et al., 2004). Die Chlamydieninfektion führt darüber hinaus zu einer verstärkten Expression von einer Vielzahl proinflammatorischer Zytokine wie IL-1, IL-8, Gro- $\alpha$ , GM-CSF (Rasmussen et al., 1997).

Weiterhin führt eine Chlamydieninfektion in endothelialen Zellen zu einer gesteigerten Expression der Adhäsionsmoleküle E-Selektin (endothelial-leukocyte adhesion molecule-1), ICAM-1 (intracellular adhesion molecule-1) und VCAM-1 (vascular cell adhesion molecule-1) (Kaukoranta-Tolvanen et al., 1996; Krull et al., 1999). Ebenso wurde eine vermehrte Expression dieser Adhäsionsmoleküle in Epithelzellen, glatten Muskelzellen und Makrophagen nach Stimulation mit chlamydialem als auch humanem HSP60 (Hitzeschockprotein 60) beschrieben (Kol et al., 1999).

Zusammengenommen führt die Chlamydieninfektion verschiedenster Wirtszellen wie z.B. Endothelzellen zu einer angeborenen Immunantwort. Während die Bedeutung zumindest einiger transmembranärer PRRs hier gut untersucht ist, ist die Beteiligung intrazellulärer PRRs bisher unklar.



## 1.2 Aufgabenstellung

*C. pneumoniae* ist an der Pathogenese verschiedener, klinisch bedeutsamer Erkrankungen beteiligt. Eine Erkennung dieses Bakteriums über TLRs wurde beschrieben, jedoch ist die Bedeutung von intrazellulären Rezeptoren der angeborenen Immunantwort bei der Erkennung der Chlamydien bisher nicht untersucht.

Im Rahmen dieser Dissertation sollte die Hypothese geprüft werden, ob Nod1 und Nod2 als intrazelluläre Rezeptoren die *C. pneumoniae*-induzierte Endothelzellaktivierung vermitteln. Daraus ergeben sich folgende Fragestellungen:

1. Reagieren Endothelzellen auf eine *C. pneumoniae*-Infektion im Sinne einer Immunantwort?
2. Sind die intrazellulären PRRs Nod1 bzw. Nod2 an der Immunantwort der Endothelzellen auf eine *C. pneumoniae*-Infektion beteiligt?
3. Welche intrazellulären Moleküle sind an der Chlamydien-aktivierten Nod1-abhängigen Signaltransduktion beteiligt?

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Anzucht und Aufreinigung von *C. pneumoniae*

Wichtige Lösungen:

*PBS*<sup>-/-</sup> (PAA Laboratories GmbH, Cölbe): 137 mM NaCl, 2,6 mM KCl, 1,76 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 8,1 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; pH 7,4

*HEp2-Zellkulturmedium*: EARLE'S MEM (Gibco/Invitrogen, Karlsruhe) mit 10 % FCS (fetales Kälberserum, PAA; vor Verwendung Hitzeinaktivierung für 45 min bei 56°C), 1 % L-Glutamin (Seromed/Biochrom, Berlin), 1 % nichtessentielle Aminosäuren (Gibco), 0,1 % Gentamycin (Gibco) und 0,2 % Amphotericin B (Sigma, München)

*HEp2-Infektionsmedium*: EARLE'S MEM mit 1 % L-Glutamin, 1 % nichtessentielle Aminosäuren, 0,1 % Gentamycin, 0,1 % Cyclohexamid (Fluka Biochemika, Buchs, Schweiz) und 0,2 % Amphotericin B

*SPG-Puffer*: 0,7 M Saccharose; 3,7 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 0,15 M KCl; 5 mM Glutaminsäure; pH 7,4

Es wurde *C. pneumoniae* Stamm TW183 (American Type Culture Collection [ATCC], Rockville, USA, VR2282) verwendet. Die Kultivierung und Aufreinigung erfolgte nach Maass et al. (Maass et al., 1993).

#### 2.1.1 Anzucht von *C. pneumoniae*

HEp2-Zellen (Karzinomzellen vom Mundboden; ATCC) sind in HEp2-Zellkulturmedium kultiviert worden. Ca. 50 % konfluente HEp2-Zellen in T25-Zellkulturflaschen (Nunc®, Wiesbaden) wurden mit *PBS*<sup>-/-</sup> (Phosphat-gepufferte Salzlösung) gewaschen und mit *C. pneumoniae* in einer Konzentration von 1,75x10<sup>4</sup> IFU/ml inkubiert. Diese Zellen wurden anschließend 60 min bei 800xg und 37°C zentrifugiert (Hettich Rotina 48 RC, Bäch, Schweiz) und im Brutschrank bei 37°C inkubiert.

Nach drei Tagen sind die infizierten Zellen chlamydiale Einschlußkörperchen enthaltend mit einem Zellschaber (Corning Incorporated costar®, Corning, USA) abgelöst und für 2 min zusammen mit sterilisierten, 2 mm kleinen Glasperlen durch den Vortexer (MS2 Minishaker IKA®, Staufen, Deutschland) aufgeschlossen worden. Die

Zelltrümmer mit den Elementarkörperchen wurden im Verhältnis 1:4 mit neuem Infektionsmedium gemischt und zur erneuten Infektion weiterer HEp2-Zellen verwendet. Nicht verwendete Zellen lagerten bis zur Verwendung bei -80°C.

Der Erfolg der Chlamydieninfektion wurde durch Färbung von infizierten Hep2-Zellen mit Fluoreszinoisothiozyanat (FITC)-Chlamydienantikörper (IMAGEN<sup>TM</sup> Chlamydia; DAKO, Zug, Schweiz) kontrolliert (Methode unter 2.4.4. beschrieben).

### 2.1.2 Aufreinigung von *C. pneumoniae*

Die bei -80°C gelagerten, mit *C. pneumoniae* infizierten HEp2-Zellen wurden bei 37°C im Wasserbad aufgetaut und sofort auf einem Vortexer mit autoklavierten Glasperlen aufgeschlossen (2 min). Anschließend wurden die Trümmer in 50 ml Falcon-Gefäße umgefüllt und 15 min bei 250xg und 4°C zentrifugiert (Hettich Rotanta MR), um die Zelltrümmer der HEp2-Zellen zu sedimentieren. Der Überstand mit den Elementarkörperchen wurde für 60 min in einer Ultrazentrifuge (Sorvall® RC5C Plus, Kendro Laboratory Products GmbH, Langenselbold, Deutschland) bei 20.000xg und 4°C zentrifugiert. Danach wurde der Überstand vorsichtig dekantiert und die Pellets mit den chlamydialen Elementarkörperchen in SPG (Saccharose-Phosphat-Glutamat)-Puffer mit 20 % hitzeinaktiviertem fetalen Kälberserum (FCS) gelöst. Zur weiteren Trennung von Zellresten wurden die Elementarkörperchen durch ein 40 µm-Nylon-Sieb (Falcon®) filtriert, in Kryoröhrchen (NUNC CryoTube<sup>TM</sup> Vials) aliquotiert und bis zur Verwendung bei -80°C wiederum gelagert.

Zur Konzentrationsbestimmung erfolgte die Infektion von auf Thermanox®-Plättchen gewachsenen HEp2-Zellen mit den aufgereinigten Einschlußkörperchen. Dazu wurde eine Verdünnungsreihe der Stocklösung in Zehnerpotenzen angelegt und für 24 h inkubiert. Durch Auszählen von Einschlußkörperchen in mit Chlamydien-infizierten Zellen unter dem Konfokalmikroskop konnte die Anzahl an infektiösen Einheiten (infection forming units, IFUs) der Chlamydien bestimmt werden. Daraus ergibt sich das Maß für die eingesetzte Menge von Chlamydien. Eine genaue Beschreibung der einzelnen Methoden erfolgt in den jeweiligen Unterkapiteln.

Zusätzlich wurde nach der oben beschriebenen Vorgehensweise ein Extrakt aus Hep2-Zellen jedoch ohne Infektion mit *C. pneumoniae* erzeugt. Dieses wurde bei den Versuchen parallel getestet, um eine Zellstimulation durch HEp2-Reste oder Resten von verwendeten Chemikalien auszuschließen.

Die in der Aufreinigung gewonnenen *C. pneumoniae* wurden mittels PCR und Kultur auf mögliche bakterielle Kontaminationen (z.B. Mykoplasmen) hin untersucht.

## **2.2 Hitzeinaktivierung der Erreger**

Für einige Experimente wurde *C. pneumoniae* bei 95°C im Heizschüttler (Eppendorf Thermomixer 5436, Wesseling-Berzdorf, Deutschland) für 30 min hitzeinaktiviert.

Durch die Zufuhr von Hitze sollten Proteine denaturiert sowie die Anheftung und Ingestion von chlamydialen Elementarkörpern verhindert werden (Eissenberg et al., 1983).

## 2.3 Zellkultur

### 2.3.1 Gewinnung von HUVEC

Wichtige Lösungen:

*PBS<sup>+/+</sup> mit Mg/Ca* (Biochrom AG): 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 7,3 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1,5 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,9 mM CaCl<sub>2</sub>, 0,6 mM MgCl<sub>2</sub>; pH 7,4

Für siRNA-Versuche und IL-8-Assays wurden HUVEC (human umbilical vein endothelial cells, humane endotheliale Nabelschnurvenenzellen) verwendet. Bei der Gewinnung von HUVEC unterstützte uns die Geburtshilfe-Abteilung des Humboldt Krankenhauses in Berlin-Reinickendorf durch das Sammeln von Nabelschnüren. Diese wurden in PBS<sup>+/+</sup> bis zur Verwendung gelagert.

Die Isolation der HUVEC wurde nach einem modifizierten Protokoll von Jaffé et al. durchgeführt (Jaffe et al., 1973).

Unter der Sterilbank (Sterilbank Laminair HB 2448, Hereaus, Berlin) wurden die Nabelschnurvenen mit einer Kanüle (Braunole R, 18G, Braun Melsungen, Melsungen, Deutschland) versehen und anschließend mit sterilem PBS (mit Mg<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup>) ausgespült. Danach erfolgte die Füllung mit 0,025 %iger Typ II Kollagenase und die 20-minütige Inkubation der Nabelschnüre im Brutschrank. Das Herauslösen der Endothelzellen geschah durch vorsichtiges Massieren und Ausspülen mit Medium 199 EARLE (Biochrom, Berlin). Die gewonnenen Zellen wurden für 10 min bei 350xg zentrifugiert. Das Pellet mit den HUVEC wurde in Endothel Basal Medium (PAA) mit 10 % FCS resuspendiert und im Brutschrank bei 37°C aufbewahrt. Die dabei verwendeten Zellkulturflaschen waren vorher eine Stunde mit 0,5 %iger Gelatinelösung behandelt worden. Für die Versuche kamen konfluente Monolayer von frisch isolierten Primärkulturen zur Verwendung. Die Monolayer bestanden zu über 98 % aus reinen endothelialen Zellen im typischen Kopfsteinpflasterprofil, dem immunhistochemischen Vorhandensein von von-Willebrand-Faktor (vWF), CD31, CD62P/E und der Aufnahmefähigkeit von DiI-Acetyl-LDL.

### 2.3.2 Kultivierung der HUVEC

Wichtige Lösungen:

*HUVEC-Zellkulturmedium* : Endothel Basal Medium mit 10% FCS, 1 % L-Glutamin, 1 % Penicillin-Streptomycin (Biochrom), 0,02 % Amphotericin B und 0,04 % EGF (Gibco)

*HUVEC-Infektionsmedium* : Endothel Basal Medium mit 1 % FCS, 1 % L-Glutamin und 0,02 % EGF

Die konfluenten HUVEC wurden nach dem Waschen mit PBS<sup>-/-</sup> mit 0,5 % Trypsin-EDTA (Gibco) von den T75-Zellkulturflaschen abgelöst. Nach Beobachtung einer Zusammenkuglung der Zellen unter dem Mikroskop wurden die Zellen durch einen leichten Schlag vom Zellkulturflaschenboden gelöst. Sofort wurde Zellkulturmedium hinzugegeben und für die Infektionsversuche in jeweils vier 48-Well-Platten (Falcon®) bzw. für RNAi-Versuche in drei T75-Zellkulturflaschen, die vorher gelatiniert worden waren, ausgesät. Bei Erreichen von einer ungefähr 90 %igen Konfluenz konnten die HUVEC für die jeweiligen Experimente genutzt werden.

### 2.3.3 Kultivierung der HAEC

Wichtige Lösungen:

*HAEC-Zellkulturmedium*: EGM-2 (Cambrex, Hess Oldendorf, Deutschland) mit den dazugehörigen Wachstumssupplementen Hydrokortison, hFGF-B, VEGF, R<sup>3</sup>-IGF-1, Ascorbinsäure, Heparin, FBS, hEGF, GA-1000

*HAEC-Infektionsmedium*: EGM-2

Die humanen aortalen Endothelzellen (HAEC; Clonetics, San Diego, USA) wurden in T75-Zellkulturflaschen kultiviert und für die Experimente jeweils die Menge einer Flasche in drei 48-Well-Platten (Infektionsversuche) bzw. in drei T75-Zellkulturflaschen (RNAi-Versuche) ausgesät. Dazu wurden die HAEC mit PBS<sup>-/-</sup> gewaschen und anschließend mit Trypsin (0,025 %)-EDTA (0,01 %) 2 min im Brutschrank inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe einer Trypsin-Neutralisations-Lösung abgestoppt. Danach konnten die abgelösten Zellen durch 5-minütige Zentrifugation bei 1200 rpm sedimentiert werden. Nach Absaugen des Überstandes

wurden die HAEC in Zellkulturmedium gelöst und eine Zellkulturflasche auf vier Platten bzw. drei Flaschen verteilt.

### 2.3.4 Kultivierung der HEK293-Zellen

Wichtige Lösungen:

*HEK293-Zellkulturmedium* : DMEM (Invitrogen, Paisley, Großbritannien) mit 10% FCS, 1 % Penicillin-Streptomycin

*HEK293-Infektionsmedium*: DMEM

Die Kultur von HEK293-Zellen (DSMZ Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig) erfolgte in T75-Zellkulturflaschen. Für die Transfektions- und Infektionsversuche wurden die Zellen in 24-Well-Platten (Falcon®) ausgesät. Dazu wurden die Zellen mit PBS<sup>-/-</sup> gewaschen und von Zellkulturflaschenboden durch Spülen mit PBS gelöst und anschließend 5 min bei 1200 rpm (Hettich Rotina 48 RC) zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgesaugt, die Zellen in Zellkulturmedium gelöst und anschließend 80.000 Zellen pro Well (24-Well-Platte) ausgesät.

## 2.4 Transfektion von RNAi und Infektion von endothelialen Zellen

### 2.4.1 RT-PCR

Wichtige Lösungen:

*Master-Mix für RT* (Mengenangaben pro Probe): 5x AMV-Puffer (Sigma; 4 µl), Nukleotide dNTP (Promega, Mannheim; 2 µl einer 10 mM Stocklösung), Hexamer-Primer (Pharmacia, Erlangen; 1 µl ein Stocklösung mit 0,2 µg/µl), RNase-Inhibitor RNasin® (Promega; 0,75 µl) und AMV Reverse Transkriptase (Promega; 0,75 µl)

*Master-Mix für PCR* (Mengenangaben pro Probe): 10x Red Taq Puffer (Sigma; 2,5 µl), Nukleotide dNTP (0,5 µl einer 10 mM Stocklösung), FW- Primer (0,25 µl einer Stocklösung mit 0,5 µg/µl), RV-Primer (0,25 µl einer Stocklösung mit 0,5 µg/µl), Red Taq (für Nod1 und Nod2 bzw. GAPDH; 1 µl), Aqua tridest (15,5 µl); Aus dieser Lösung wurden 20 µl des Master-Mixes entnommen.

*TAE-Puffer*: 40 mM TrisAcetat, 1 mM EDTA; pH 8,0

*GAPDH-Primer* (TIB Molbiol, Berlin): sense 5'-CCACCCATGGCAAATTCCATGGCA-3' , antisense 5'-TCTAGACGGCAGGTCAGGTCC-3'

*Nod1-Primer* (TIB MolBiol): sense 5'-AAGCGAAGAGCTGACCAAAT-3' , antisense 5'-TTCATAGACTTTGGCCTCCTC-3'

*Nod2-Primer* (TIB MolBiol): sense 5'-AGCCATTGTCAGGAGGCTC-3' , antisense 5'-CGTCTCTGCTCCATCATAGG-3'

Mittels der Polymerase-Kettenreaktion kann aus einer sehr geringen Nukleinsäure-Menge innerhalb weniger Stunden ein spezifisches Fragment in vitro millionenfach angereichert werden.

#### 2.4.1.1 Vorbereitende Schritte

Die Lyse der Zellen wurde mit RLT-Puffer (Qiagen, Hilden, Deutschland) durchgeführt und im nächsten Schritt die RNA mit „RNeasy Mini“-Kit (Qiagen) extrahiert. Dieses besteht aus einem spezialisierten Hochsalzpuffersystem zur Bindung von Basen. Zuerst wurden die Proben lysiert und in der Anwesenheit von denaturierenden, Guanin-Isothiozyanat (GITC)-enthaltenen Puffer homogenisiert, wodurch die RNasen schnell



inaktiviert wurden, um eine Isolierung von intakter RNA zu gewährleisten. Zusätzlich wurde Ethanol für optimale Bindungsbedingungen eingesetzt. Die Proben wurden in eine RNeasy-Säule gebracht, wo die RNA an die RNeasy-Quarzmembran binden und die Verunreinigungen abgewaschen werden konnten. Die aufgereinigte RNA wurde schließlich mit destilliertem Wasser eluiert.

Für weiterführende RT-PCR-Experimente wurden nach photometrischer Ermittlung (Spektralphotometer Uvicon UV 860, Kontron, München) der RNA-Konzentration bei 260 nm die Probenmengen auf 1 µg RNA mit destilliertem Wasser ausgeglichen.

### *2.4.1.2 Reverse Transkription (RT)*

Dieser Schritt diente dazu, cDNA nach einer RNA-Vorlage durch Umkehr der Transkription unter Katalyse der reversen Transkriptase zu synthetisieren. cDNA ist die intronlose Version des Genoms, stabiler als mRNA und enthält nur die Nukleotidsequenzen, die gerade in den präparierten Zellen exprimiert wurden.

Die extrahierte RNA (1 µg) wurde in 11,5 µl mit H<sub>2</sub>O gelöst und für 5 min bei 70° im PCR-Gerät (MJ Research PTC-200, Biozym Diagnostik GmbH, Hess, Deutschland) inkubiert. Erst nach Abkühlen des Thermoblocks auf 42°C wurde der Master-Mix (8,5 µl je Probe) hinzugegeben. Nun erfolgte die Umschreibung zur cDNA in der PCR-Maschine, welche während der ersten 60 min die Temperatur von 42°C hielt und anschließend die RT-Reaktion durch Erhitzen auf 95°C (5 min) beendete.

### *2.4.1.3 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)*

Bei der PCR werden bestimmte Eigenschaften der natürlichen DNA-Replikation genutzt. Eine DNA-Polymerase synthetisiert einen neuen, komplementären DNA-Strang an einer einzelsträngigen Nukleinsäurematrize. Das entscheidende Prinzip der PCR ist die zyklische Wiederholung der einzelnen Reaktionsschritte, wodurch die Ausgangsmenge an DNA bis zu einem Faktor von etwa  $10^7$  amplifiziert werden kann.

Der 1/16-Teil der gewonnenen cDNA (gelöst in 5 µl) wurde mit dem jeweiligen Master-Mix (je 20 µl) vermischt und in der PCR-Maschine dann wie folgt vermehrt:

- *Denaturierung*: Durch Erhitzen (94°C) wurde die cDNA in ihre Einzelstränge aufgespalten.

- *Hybridisierung*: Spezifische Oligonukleotide, so genannte Primer, banden an der gesuchten, spezifischen DNA-Sequenz (64°C für Nod1, 62°C für Nod2, 60°C für GAPDH). Sie dienten als Startpunkt für ein temperaturstabiles Enzym, die Taq-Polymerase.
- *DNA-Synthese*: Unter Zugabe der zum Aufbau der Doppelhelix notwendigen Desoxynukleotidtriphosphate wurde ein komplementärer Zweitstrang des gesuchten DNA-Stücks in Verlängerung des Primers (72 °C) polymerisiert.

Durch erneutes Erhitzen wurden weitere Verdopplungszyklen (insgesamt 30 für Nod1, 33 für Nod2, 30 für GAPDH) eingeleitet. Diese Amplifikation führte zu einem exponentiellen Prozess, in dem zahlreiche Amplifikate der Zielsequenz synthetisiert werden konnten.

#### 2.4.1.4 Darstellung der PCR-Produkte

Durch Elektrophorese (Bio-Rad Sub-Cell® GT, Bio-Rad Laboratories GmbH, München) konnte die DNA im 1,5 %igen Agarose-Gel aus TAE-Puffer, Agarose (Promega) und Ethidiumbromid (4 µl/100 ml) bei 100 V in 60 min aufgetrennt werden. Die Banden konnten im UV-Transluminator (TFX-20M Life Technologies, Bochum) unter der Abdunkelhaube betrachtet sowie fotografiert (Olympus Digitalkamera C-4040, Hamburg) werden.

## 2.4.2 RNAi-Experimente

### RNA-Sequenzen:

*Kontroll-siRNA* (Ambion, Huntingdon, Großbritannien): sense

UUCUCCGAACGUGUCACGUtt, antisense ACGUGACACGUUCGGAGGAGAAtt

*Nod1-1-siRNA* (Ambion): sense GGGUGAGACCAUCUUCAUtt, antisense AUGAA-  
GAUGGUCUCACCCtg

*Nod1-2-siRNA* (Ambion): sense GGCCAAAGUCUAUGAAGAUtt, antisense AUCU-  
UCAUAGACUUUGGCtc

*Nod1-3-siRNA* (Ambion): sense 5'-GGAGAUCUACAUGGACACtt-3' antisense 5'-  
GGUGUCCAUGUAGAUCUCCtc-3'

Die Expression von endogenem Nod1 wurde mittels RNAi supprimiert. Diese Methode beruht auf die Degradation von spezifischer mRNA. Das Prinzip soll hier kurz erläutert werden.

Die meisten eukaryotischen Zellen besitzen ein angeborenes, intrazelluläres Überwachungssystem, welches beispielsweise nach einer viralen Zellinfektion auf fremde dsRNA reagiert. Durch Verarbeitung der dsRNA durch die Dicer RNase III entstehen kleinere Fragmente, die so genannte small interfering RNA (siRNA). Synthetisch hergestellte siRNA ist käuflich erhältlich und kann z.B. durch Elektroporation oder kationische Liposomen-vermittelte Transfektion in die Zellen eingebracht werden. Diese siRNA verbindet sich zu einem siRNA enthaltenen Ribonukleoproteinkomplex, aus welchem die RNA-induzierte „silencing“-Komplex (RISC)-Endonuklease entsteht. Diese lagert sich an die homologe mRNA an, welche dadurch schließlich degradiert wird. Dadurch wird die Translation der betroffenen mRNA unterbunden (Tuschl et al., 2002).

In dem hier beschriebenen Versuch wurden die doppelsträngigen RNA-Oligonukleotide mittels Elektroporation (Amaxa Nucleofector<sup>TM</sup>, Köln) in die Zellen eingebracht. Dieses Verfahren beruht auf eine temporäre Porenbildung mit elektrischen Impulsen, welche eine Aufnahme der siRNA ermöglicht.

Verwendet wurden subkonfluente HUVEC in der zweiten Passage. Jede Probe bestand aus einer Million Zellen, 1,5 µg der jeweiligen siRNA und 100 µl HUVEC Nucleofector<sup>TM</sup>-Lösung (Amaxa). Die Nucleofektion erfolgte im Amaxa Nucleofector<sup>TM</sup> nach dem Protokoll des Herstellers.

Schließlich wurden die Proben zusammen mit HUVEC-Zellkulturmedium (siehe oben) in gelatinierte 48-Well-Platten (Falcon®) gegeben und im Brutschrank bei 37°C inkubiert.

Da für die HAEC kein spezifisches Nukleofektionsprotokoll vom Hersteller (Amaxa) existiert, wurde bei den RNAi-Experimenten das Basis-Kit für endotheliale Säugetierzellen verwendet und optimale Transfektionsbedingungen ermittelt. Schließlich wurden 500.000 Zellen und 2 µg siRNA eingesetzt und die Nukleofektion mit dem Programm M-03 durchgeführt. Anschließend wurden die nukleofektierten Zellen mit HAEC-Zellkulturmedium in 48-Well-Platten inkubiert.

### 2.4.3 Infektion

Vor der Infektion wurden die Zellen mit PBS<sup>-/-</sup> gewaschen. Dem Infektionsmedium wurden entweder *C. pneumoniae* (MOI = 0,5-5) oder 10 ng/ml TNFα zugesetzt und schließlich zu den Zellen gegeben. Ein Teil der Zellen wurde unbehandelt gelassen. Nach einer Zentrifugation für 60 min bei 37°C und 800xg zur Verbesserung der Adhärenz und Internalisierung der Chlamydien in die Zellen erfolgte eine 16-stündige Inkubation im Brutschrank bei 37°C. Danach wurden die Überstände für die IL-8-Bestimmung entnommen.

### 2.4.4 Nachweis der Infektion in HUVEC

Die Infektion der HUVEC erfolgte wie oben beschrieben, jedoch wurden in die 48-Well-Platten vor der Gelatinierung und Zellzusatz sterilisierte Glasplättchen gelegt, so dass diese zusammen mit der Zellschicht nach der Anfärbung entnommen werden konnten.

Die Zellen wurden zweimal mit PBS gewaschen und anschließend 10 min bei -20°C mit Methanol fixiert. Spezifische FITC-Chlamydienantikörper (Imagen, DAKO) wurden nach 20-minütiger Inkubation bei 37°C wieder von den Glasplättchen gewaschen. Im Fluoreszenzmikroskop (Olympus Phase Kontrast ULWCD 0.30) konnten die Elementarkörperchen mit den gebundenen Antikörpern betrachtet und bei 20-facher Vergrößerung fotografiert (Olympus Digitalkamera C-4040) werden.

### 2.4.5 IL-8-ELISA

Zur Bestimmung der Interleukin-8-Konzentration aus den Überständen diente das Human IL-8 ELISA Set (R&D Systems, Wiesbaden).

Das Prinzip beruht auf dem Sandwichverfahren. Der monoklonale, humane IL-8-Antikörper wurde in Vertiefungen von Polystyrolplatten (96-Well NUNC® ELISA Platten) gebunden. Nach Blocken von freien Protein-Bindungsstellen, konnten in einer bestimmten Abfolge die Vertiefungen dann weiter mit Antigen und Enzym-konjugierten Antikörpern beschichtet werden.

Zwischen den einzelnen Schritten erfolgten mehrere Waschschrte mit PBS und 0,05 % Tween (Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland). Zunächst wurde die Antigenlösung (Überstände der HUVEC in einer Verdünnung von 1:1000) inkubiert und nach 2 h die ungebundenen Proteine gewegewaschen. Nach Zugabe eines Biotin-konjugierten Antigen-Antikörpers und die nach 1 h folgende Ergänzung von Enzym-Reagenzien (Streptavidin-Meerrettich-Peroxidase mit Streptavidin) konnte der Nachweis über eine enzymatische (Peroxidase) Farbreaktion erfolgen. Die Farbreaktion, welche zur Menge der gebundenen enzymkonjugierten anti-IgG-Antikörper korreliert, wurde nach 20 min mit 2 NH<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> gestoppt und quantitativ mit dem ELISA-Photometer (Dynatech MR 5000, Rückersdorf, Deutschland) erfasst.

## 2.5 Überexpressions- und Inhibitionsversuche in HEK293-Zellen

### 2.5.1 Transformation und Isolierung von Plasmid-DNA

Wichtige Lösungen:

*LB-Medium* : mit 1 % Trypton, 0,5 % Hefeextrakt und 0,5 % NaCl

Folgende humane Expressionsvektoren wurden für die Überexpressionsversuche in HEK293-Zellen verwendet: cDNA3- (Leervektor), cDNA3 Nod1 (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. G. Nuñez, Ann Arbor, Michigan, USA), cDNA3 Nod2 (G. Nuñez), pFlag-CMV1 TLR2 (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. C. Kirschning, München, (Kirschning et al., 1998)), NF- $\kappa$ B-Luziferase-Reportergen, RSV- $\beta$ -Galaktosidase (Opitz et al., 2001).

Das NF- $\kappa$ B-Luziferase-Reportergen enthält NF- $\kappa$ B-Fragmente, welche in einem pGL3Basis-Vektor zusammen mit einem minimalen  $\beta$ -Globin-Promotor sowie einem Luziferasegen eingebunden wurden (Krull et al., 1999).

Für weitere Überexpressionsversuche mit den HEK293-Zellen wurden Vektoren mit dominant-negativen pCMV-Rip2 (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. P. Dempsey, Los Angeles, USA), pFlag-CMV1-MyD88 (Tularik Inc., San Francisco, USA), pFlag-CMV1-IRAK1 (C. Kirschning), pFlag-CMV1-IRAK2 (C. Kirschning) und pFlag-CMV1-TRAF6 (C. Kirschning) verwendet.

Bei dem dominant-negativen MyD88 ist nur der C-terminale Teil kodiert (Aminosäuren 152-296; (Wesche et al., 1997)). Das dominant-negative Rip2 ist ebenfalls eine trunkierte Form, welche nur die Aminosäuren 1-434 des Rip2 enthält (Chin et al., 2002). Das dominant-negative IRAK1 besteht lediglich aus den Aminosäuren 1-215 und auch das dominant-negative IRAK2 ist nur eine trunkierte Form (Aminosäuren 97-590; (Muzio et al., 1997)). Das dominant-negative TRAF6 enthält nur die Aminosäuren 298-522 (Muzio et al., 1997).

Zur Transformation wurden kompetente *E. coli* (DH5 $\alpha$ ) mit 100 ng Plasmid-DNA für 30 min auf Eis inkubiert. Danach erfolgte für 45 s eine Inkubation bei 42°C im Hitzeblock (Eppendorf Thermomixer 5436) zur Unterstützung der Plasmidaufnahme in die *E. coli*. Es folgte eine zweiminütige Abkühlung auf Eis. Im LB-Medium ohne Antibiotikum konnten sich die transformierten Bakterien 60 min bei 37°C im Schüttler

(Uniequip) unselektiert vermehren. Das selektive Bakterienwachstum erfolgte nach Ausstreichen von jeweils 50 µl der Lösung auf LB-Agar-Platten mit Ampicillin (Roche; alle verwendeten Expressionsvektoren besaßen eine Ampicillin-Resistenz) über Nacht im Inkubator. Nach 24 h konnten die Kolonien mit den transformierten *E. coli* gepickt und zur Plasmidisolierung verwendet werden.

Zunächst wurden die transformierten *E. coli* in eine exponentielle Wachstumsphase gebracht. Hierfür wurde eine Vorkultur mit LB-Medium (5 ml) und Ampicillin (100 µl) bereitet. Eine Kolonie wurde mit einer sterilen Öse von der Agarplatte entnommen und mit dem Vorkulturmedium in einem Wärmeschüttler für 6 h inkubiert. Die selektiv transformierten *E. coli* aus der Vorkultur wurde im Verhältnis 1:1000 zusammen mit LB-Medium (50 ml) und Ampicillin (100 µg/ml) in eine Übernachtskultur überführt. Die Inkubation geschah über Nacht bei 37°C im Wärmeschüttler. Danach erfolgte die Isolation der DNA nach Protokoll mit dem EndoFree Plasmid Midi Kit (Qiagen).

Das Prinzip soll hier kurz erläutert werden. Zunächst wurden die Bakterien aus der Übernachtskultur durch Zentrifugation für 15 min bei 6000xg und 4°C angereichert und das Bakterienpellet mit NaOH-SDS lysiert. Dabei kam es zur reversiblen Denaturierung der Plasmid-DNA, welche durch Filtration von den anderen, in Kaliumdodezylsulfat gefällten Bestandteilen getrennt werden konnte. Nach Binden der Plasmid-DNA an ein Anionenaustauscherharz folgte die Reinigung, dann die Eluierung der DNA mit Salzpuffer und schließlich nach Entsalzen durch eine Isopropanol-Präzipitation die Lösung der Plasmid-DNA im TE-Puffer.

Die Konzentration der aufgereinigten DNA konnte im Photometer bei 260 nm bestimmt werden. Die Plasmid-DNA wurde bei -20°C gelagert.

### 2.5.2 Transfektion

Die Überexpression bestimmter Proteine erforderte die Plasmidaufnahme in HEK293-Zellen. Hierfür wurde das CalPhos<sup>TM</sup>Mammalian Transfection Kit (BD Biosciences Clontech, Palo Alto, USA) verwendet. Das Prinzip ist eine Kristallbildung aus Kalziumphosphat und DNA, welche dann durch Endozytose in die Zellen gelangen.

Ca. 70 %-konfluenten HEK293-Zellen in 24-Well-Platten (Falcon®) wurde ein Gemisch aus Calcium-Phosphat und Plasmid-DNA nach Anleitung des Herstellers zugesetzt. Die dabei verwendeten DNA-Mengen waren für Nod1 und Nod2 0,2 ng, für TLR2 0,01 µg, für β-Gal und NF-κB 0,5 µg, für dnRip2 und dnMyD88 0,02 µg sowie

für dnIRAK1, dnIRAK2 und dnTRAF6 0,05 µg. Die jeweiligen transfizierten DNA-Mengen wurden durch Zugabe eines nicht kodierenden Vektors auf eine gleich hohe Gesamtmenge an DNA der einzelnen Proben konstant gehalten.

Nach einer Inkubation für 4 h im Brutschrank bei 37°C wurden die Zellen mit PBS gewaschen und Zellkulturmedium hinzu gegeben. Zur Kontrolle einer ausgeglichen Transfektionsrate wurde bei einigen Versuchen in den Proben parallel die β-Galaktosidase-Aktivität bestimmt, welche immer nahezu konstant war. Am Tag nach der Transfektion konnten die transfizierten Zellen zur Stimulation weiterverwendet werden.

### 2.5.3 HEK293-Zellinfektion und –Stimulation

Am Tag nach der Transfektion wurden die Zellen stimuliert. Nach dem Waschen mit PBS wurde zu den Zellen Medium mit *C. pneumoniae* in verschiedenen Konzentrationen (MOI = 0,5-5), 10 ng/ml TNFα oder auch nur DMEM (als Leerwert) gegeben. Die Zellen wurden anschließend 60 min bei 800xg zentrifugiert und für 7 h inkubiert.

### 2.5.4 Nachweis der Infektion in HEK293-Zellen

Die Zellen wuchsen auf Thermanox®-Plättchen (Falcon Culture Slide, Becton Dickinson, Rutherford, USA) in den 24-Well-Platten an und wurden mit *C. pneumoniae* (MOI = 0,5) stimuliert. Durch Fixierung mit 3 % Paraformaldehyd für 20 min und Permeabilisierung mit 1 % Triton für 15 min konnte der Chlamydiennachweis mit einem spezifischen, monoklonalen Antikörper gegen Chlamydien (Sanofi Diagnostics Pasteur, Freiburg) über Nacht bei 4°C erfolgen. Die gebundenen Antikörper wurden durch ALEXA-488-konjugierte, monoklonale Antikörper (Molecular Probes, Eugene, USA) bei 4°C über Nacht detektiert. F-Aktin wurde mit ALEXA-546-konjugiertem Phalloidin (Molecular Probes) dargestellt. Unter Verwendung eines konfokalen Mikroskops (Zeiss LSM 5 Pascal, Jena) wurden Zellen bei einer 60-fachen Vergrößerung fotografiert.



### 2.5.5 Luziferase-Bestimmung

Hierzu kam das „Luciferase Assay System“ von Promega zur Verwendung. Um die NF- $\kappa$ B-Aktivierung in HEK293-Zellen messen zu können, wurde ein NF- $\kappa$ B-abhängiges Reportergen transfiziert (siehe Kapitel 2.5.2.). Nach der Aktivierung band NF- $\kappa$ B an spezifische Bindungsstellen, welche dem Luziferase-Reporter gen vorgeschaltet waren und führte somit zu einer Expression des Enzyms Luziferase. Die Menge an Luziferase in den Proben konnte nach Ablauf einer photochemischen Reaktion mit dem Photometer quantifiziert werden.

Die Zellen wurden nach Stimulation mit einem speziellen Lyse-Puffer (Promega) lysiert. Die Zelltrümmer konnten durch eine 2 min lange Zentrifugation (Hettich MIKRO 24-48 R) sedimentiert werden. Die aus dem Überstand entnommenen Proben wurden mit „Luciferase reagent buffer“ (Promega) im Verhältnis 1:6 vermischt. Es fand eine biolumineszente Reaktion statt, bei der Käfer-Luziferin mit ATP und Sauerstoff durch die Glühwürmchen-Luziferase und Magnesium zu Oxyluziferin, AMP, Phosphat, Kohlendioxid und Licht reagierten. Nach 3 s wurde die entstandene Lichtemission bei 562 nm im Luminometer (Lumat LB 9501, Berthold Technologies, Bad Wildbad, Deutschland) quantifiziert, welche mit der NF- $\kappa$ B-Aktivierung in der Probe korrelierte.

### 2.5.6 Proteinbestimmung

Die ermittelten Luziferasewerte wurden mit den dazugehörigen Proteinkonzentrationen der jeweiligen Proben abgeglichen, um Fehler, durch unterschiedliche Zellzahlen hervorgerufen, auszugleichen.

Dazu wurde das Bradford-Reagenz (BioRad) 1:5 mit destilliertem Wasser verdünnt und die Probe im Verhältnis von 1:200 dazugegeben. Der im Bradford-Reagenz enthaltene Farbstoff Coomassie Brilliant Blue® verlagert bei Bindung von basischen und aromatischen Aminosäuren sein Absorptionsmaximum von 465 nm zu 595 nm. Die Messung der Absorption wurde dann bei 595 nm mit einem Spektralphotometer (UVICON 922) gemessen und mit Hilfe einer Albumin-Standardkurve die Proteinkonzentration ermittelt.

Die relativen Luziferaseaktivitäten (als Maß der NF- $\kappa$ B-Aktivierung) errechnete sich aus der Division des Luziferasewertes durch die Proteinkonzentration.

### 2.5.7 Statistische Auswertung und benutzte Software

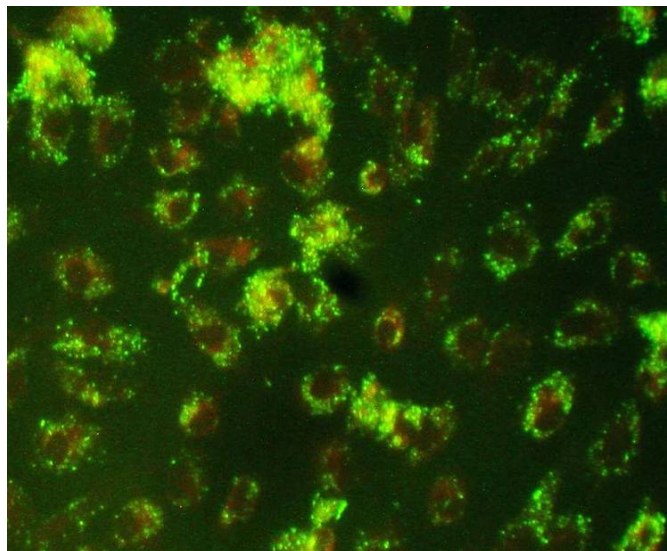
Alle Versuche wurden mehrfach erfolgreich durchgeführt. Die Abbildungen der PCR wurden mit dem Programm Adobe Photoshop (D1-4.0) bearbeitet. Als Programme zur Ermittlung von Mittelwerten und Standardabweichungen wurde Microsoft Excel 2000 verwendet. Die stimulatorischen Effekte von *C. pneumoniae* und inhibitorische Effekte der dominant-negativen Mutanten sowie der siRNA's wurden mit dem Students-T-test unter Verwendung von Prism 3.02 (Graph Pad) bewertet. Eine Irrtumswahrscheinlichkeit weniger als 5 % wurde als signifikant angesehen, wobei  $p < 0,05$  mit einem Sternchen und  $p < 0,01$  mit einem doppelten Sternchen gekennzeichnet wurden.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 *C. pneumoniae*-infizierte Endothelzellen produzieren Interleukin 8

##### 3.1.1 Infektion von HUVEC, Nachweis der Infektion

Untersucht wurde die Infektion von humanen Endothelzellen am Modell der humanen umbilikalvenösen Endothelzellen (HUVEC). Nach Inkubation der HUVEC mit *C. pneumoniae* Stamm TW183 (72 h,  $3,5 \times 10^7$ ) zeigte sich fluoreszenzmikroskopisch eine ausgeprägte Endothelzellinvasion. Die Darstellung der Einschlußkörperchen mit spezifischen FITC-gekoppelten-Antikörpern erfolgte nach Fixation des infizierten Endothelzellmonolayers. Die Antikörper bildeten die detektierten Chlamydien grün ab, durch die rote Gegenfärbung der Zellen ließen sich die Erreger von anderen Zellbestandteilen deutlich abgrenzen. Die Abbildung 7 zeigt eine Fotografie der infizierten HUVEC (MOI=5) unter UV-Licht bei einer 20fachen Vergrößerung. Eine deutliche Invasion der HUVEC durch *C. pneumoniae* ist zu erkennen.



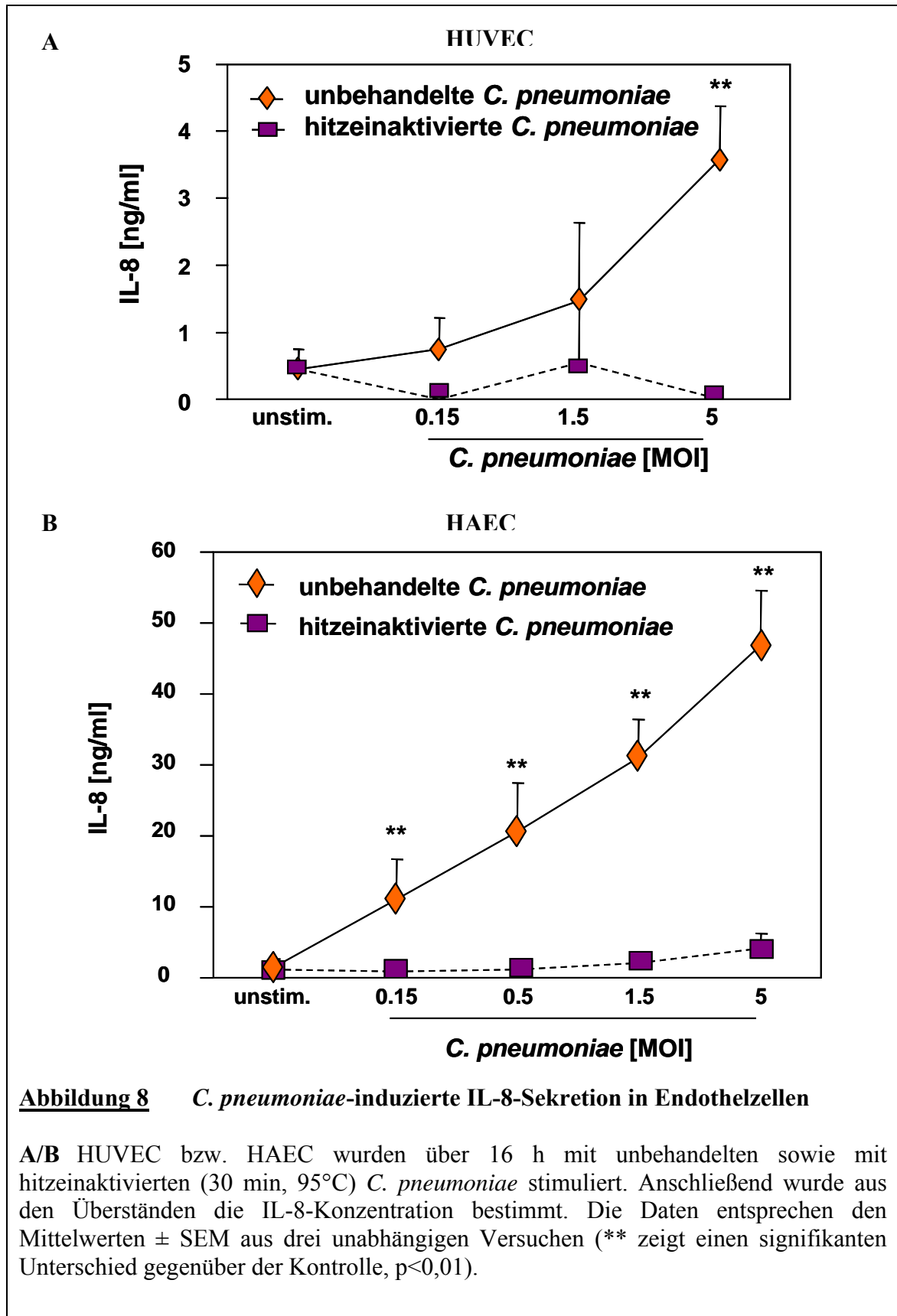
**Abbildung 7** Invasion von *C. pneumoniae* in HUVEC

Die auf Glasplättchen angewachsenen HUVEC wurden über 16 h mit *C. pneumoniae* (MOI=5) stimuliert. Es folgte eine Fixierung und Permeabilisierung mit Methanol. Die Elementarkörperchen stellten sich nach Anfärbung mit spezifischen FITC-Chlamydienantikörpern bei UV-Licht grün in den infizierten HUVEC dar.

### 3.1.2 IL-8-Sekretion in HUVEC und HAEC nach *C.pneumoniae*- Infektion

Im Weiteren sollte die Fähigkeit der Chlamydien untersucht werden, eine IL-8-Sekretion in Endothelzellen hervorzurufen. Zusätzlich zu HUVEC wurden auch humane aortale Endothelzellen (HAEC) verwendet. Konfluente HUVEC und HAEC wurden mit verschiedenen Konzentrationen von lebenden und hitzeinaktivierten *C. pneumoniae* infiziert und für 16 h inkubiert. Aus den Überständen der infizierten Zellen konnten anschließend mit Hilfe eines IL-8-ELISA die IL-8-Sekretion gemessen werden.

Die Abbildungen 8A und 8B machen deutlich, dass eine Infektion von HUVEC und HAEC mit lebenden Chlamydien zu einer konzentrationsabhängigen Steigerung der IL-8-Sekretion führt. Im Gegensatz dazu induzierten hitzeinaktivierte *C. pneumoniae* kaum eine IL-8-Sekretion in diesen Endothelzellen.



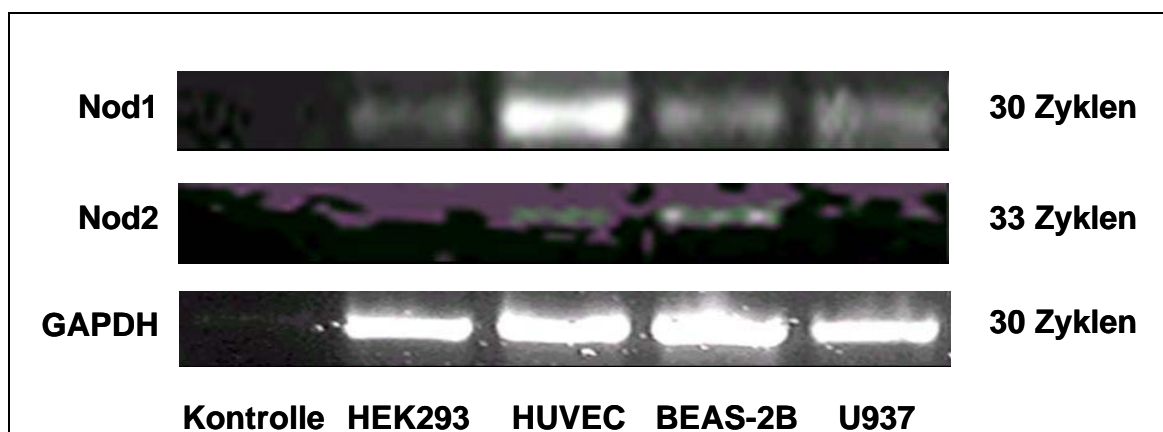
### 3.1.3 Nod1- und Nod2-Expression in verschiedenen Zelllinien

Nachfolgend sollte untersucht werden, inwiefern NLR als intrazelluläre PRRs eine Rolle bei der angeborenen Immunantwort auf eine Chlamydieninfektion spielen. Hierfür wurde die Expression von Nod1 und Nod2 in HUVEC sowie weiteren Zelllinien mit Hilfe der RT-PCR untersucht.

Neben HUVEC und HAEC wurden zwei Epithelzelllinien (HEK293-Zellen, human embryonic kidney cells; BEAS-2B, humane Bronchialepithelzellen) sowie die monozytäre Zelllinie U937 (humane histiozytäre Lymphomzellen) getestet.

In der Abbildung 9 ist die Nod1- und Nod2-Expression in den verschiedenen Zelllinien dargestellt. Die Expression des „house keeping genes“ GAPDH diente zur Kontrolle. Die erfolgreiche Äquilibrierung der untersuchten RNA-Mengen zeigt sich in der Darstellung der Banden von GAPDH, die in den Proben der unterschiedlichen Zelllinien gleich stark vertreten sind.

Es zeigt sich deutlich, dass Nod1-mRNA in HUVEC stark und in den anderen Zelllinien nur schwach exprimiert wird. Nod1 konnte auch in HAEC nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Nod2 schien im Wesentlichen in den BEAS-2B-Zellen exprimiert zu sein. Somit stellt Nod1 einen möglichen Kandidaten als intrazellulärer PRR dar, welcher *C. pneumoniae* in Endothelzellen erkennt.



**Abbildung 9** Die Expression von Nod1 und Nod2 in verschiedenen Zelllinien

Mit Hilfe der RT-PCR wurde die Nod1- und Nod2-Expression in HEK293-Zellen, HUVEC, BEAS-2B und U937-Zellen untersucht. Nach elektrophoretischer Auftrennung im Agarosegel wurden die PCR-Produkte im UV-Licht dargestellt. Parallel dazu wurde die Expression des „house keeping genes“ GAPDH ermittelt.

## 3.2 RNAi-Experimente in HUVEC und HAEC

### 3.2.1 RT-PCR zum Nachweis der supprimierten endogenen Nod1-Expression

Um die Rolle von Nod1 in der angeborenen Immunantwort von HUVEC auf eine *C. pneumoniae*-Infektion zu untersuchen, wurden im Folgenden „loss-of-function“-Experimente mit Nod1-siRNA durchgeführt. RNA interference dient der Suppression der Expression bestimmter Genprodukte. Es kamen drei verschiedene Nod1-siRNA-Sequenzen sowie eine unspezifische Kontroll-siRNA zum Einsatz. Die siRNA wurde mittels Elektroporation in die Wirtszellen eingebracht. Eine Reverse-Transkriptase-PCR und eine anschließende Gelelektrophorese erlaubten die Darstellung der RNA-Expression von Nod1 nach Transfektion der Zellen mit den verschiedenen siRNA-Sequenzen.

In der Abbildung 10 ist die mRNA-Expression von Nod1 nach siRNA-Transfektion und einer 24-stündigen Inkubation gezeigt. Nach Verwendung der Nod1-siRNA-Sequenzen S1 und S2 kam es zu einer deutlich verminderten Nod1-Expression. Hingegen zeigte die Kontroll-Transfektion ohne siRNA (-) sowie die Transfektion einer unspezifischen Kontrollsequenz (c) keinen Einfluss auf die Nod1-mRNA-Expression. Bei der Verwendung des gleichen Versuchsaufbaus mit HAEC konnten gleiche Ergebnisse erzielt werden (Daten nicht gezeigt). Somit stellen RNAi-Experimente eine effektive Methode zur Inhibition der Nod1-Expression und nachfolgender "loss-of-function"-Experimente in endothelialen Zellen dar.

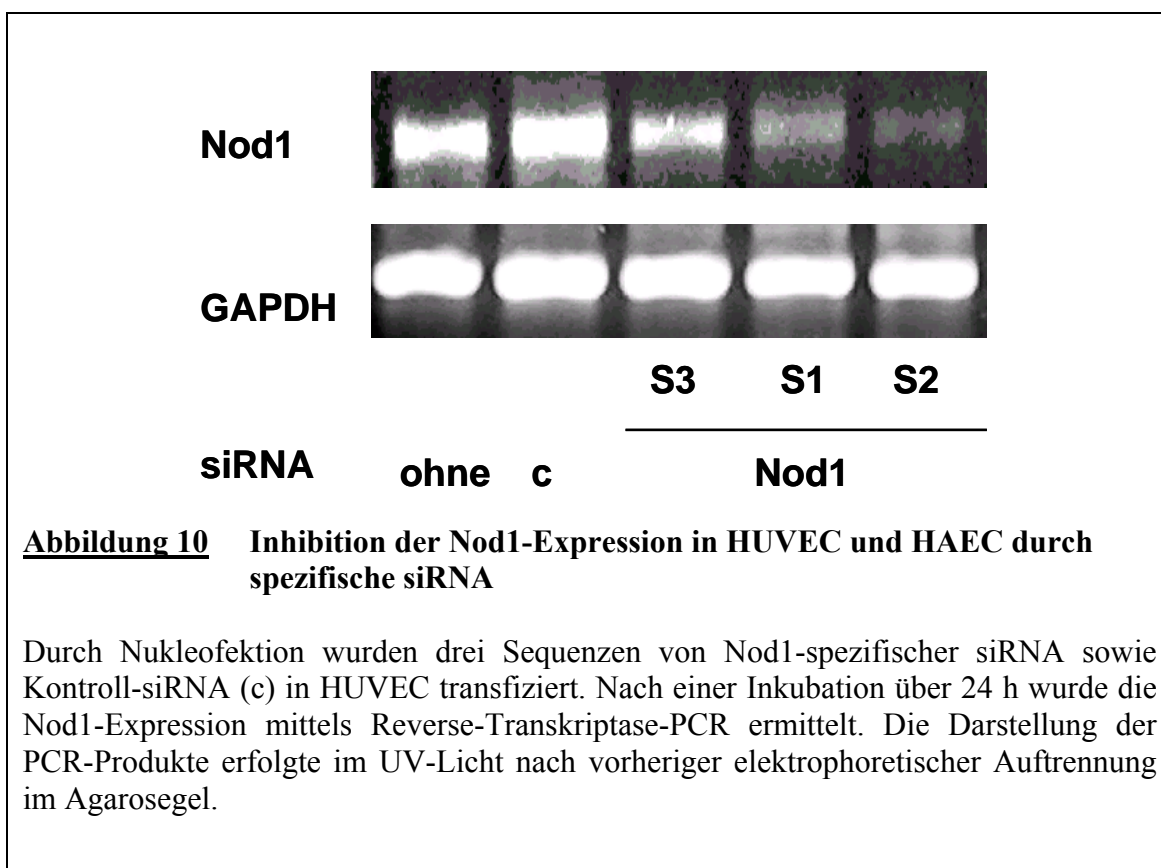
### 3.2.2 Einfluss von Nod1 auf die IL-8-Sekretion

In nicht transfizierten HUVEC und HAEC wurde eine Zellaktivierung durch *C. pneumoniae* in Form einer IL-8-Aktivierung gezeigt (siehe Abbildung 8). Zur Untersuchung der Beteiligung von Nod1 an dieser Zellaktivierung sollte nun die IL-8-Ausschüttung in Nod1-supprimierten Zellen mit der Zellantwort in untransfizierten bzw. mit Kontroll-siRNA-transfizierten Zellen verglichen werden.

Die mit spezifischer Nod1-siRNA und unspezifischer Kontroll-siRNA transfizierten Zellen wurden 72 h nach der Transfektion mit *C. pneumoniae* (MOI=0,5) bzw. mit

TNF $\alpha$  für 16 h inkubiert. Aus den Überständen wurde die IL-8-Konzentration bestimmt (Abbildung 11A).

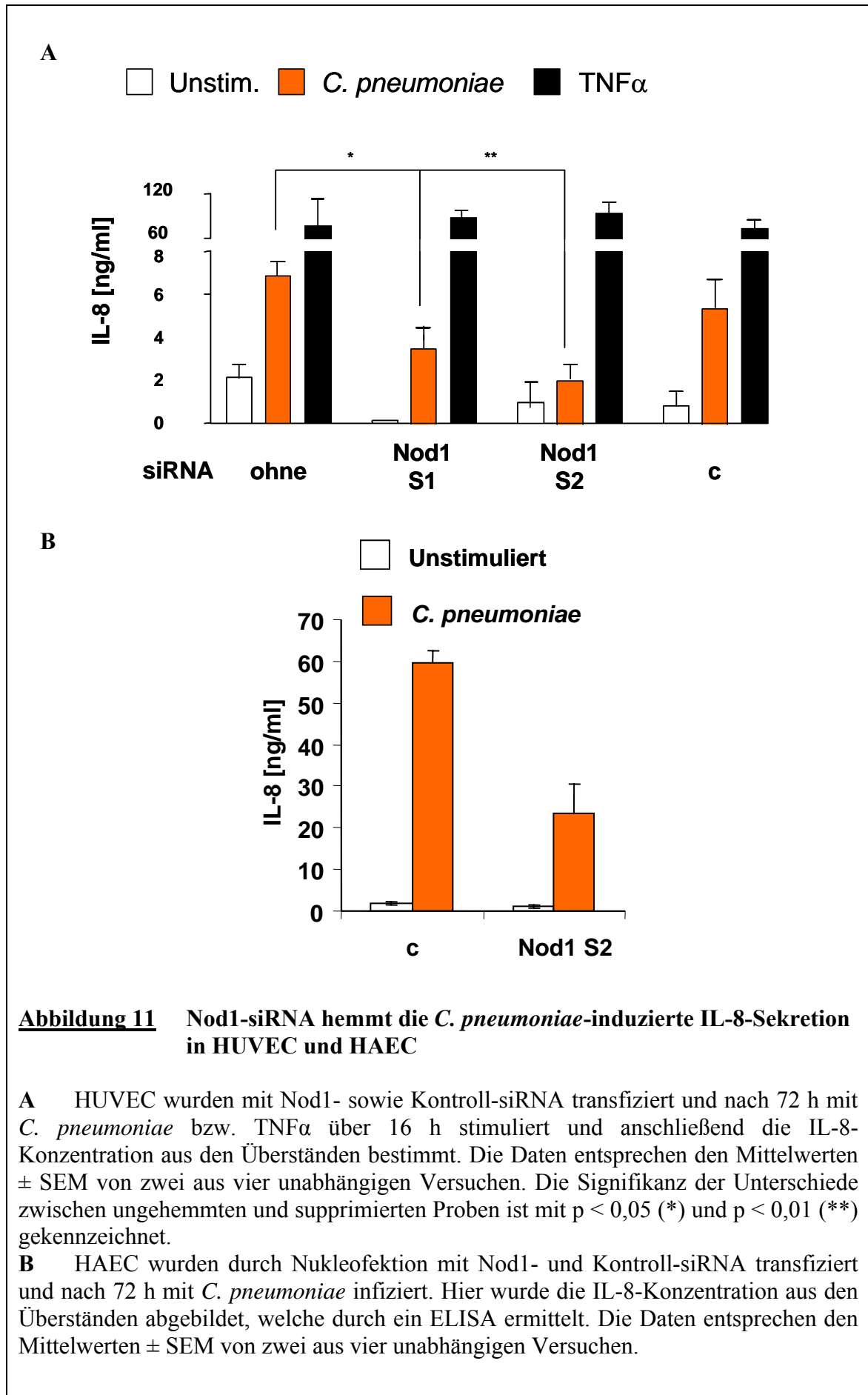
Die Abbildung 11A zeigt eine Hemmung der IL-8-Ausschüttung in den Nod1-siRNA transfizierten HUVEC gegenüber den nicht transfizierten bzw. mit Kontroll-siRNA transfizierten Zellen. TNF $\alpha$  bewirkte eine IL-8-Ausschüttung, welche durch keine der verwendeten siRNAs gehemmt wurde. Dies zeigt die Spezifität der beobachteten Ergebnisse an, welche eine Nod1-abhängige IL-8-Sekretion nach *C. pneumoniae*-Infektion darlegen. Ähnliche Ergebnisse konnten unter Verwendung von HAEC erzielt werden (Abbildung 11B). Auch hier produzierten Nod1-supprimierte Zellen deutlich weniger IL-8 nach Chlamydieninfektion gegenüber den mit Kontroll-siRNA transfizierten Zellen. Demnach spielt Nod1 eine wichtige Rolle in der Immunantwort auf *C. pneumoniae* in endothelialen Zellen.



**Abbildung 10** Inhibition der Nod1-Expression in HUVEC und HAEC durch spezifische siRNA

Durch Nukleofektion wurden drei Sequenzen von Nod1-spezifischer siRNA sowie Kontroll-siRNA (c) in HUVEC transfiziert. Nach einer Inkubation über 24 h wurde die Nod1-Expression mittels Reverse-Transkriptase-PCR ermittelt. Die Darstellung der PCR-Produkte erfolgte im UV-Licht nach vorheriger elektrophoretischer Auftrennung im Agarosegel.

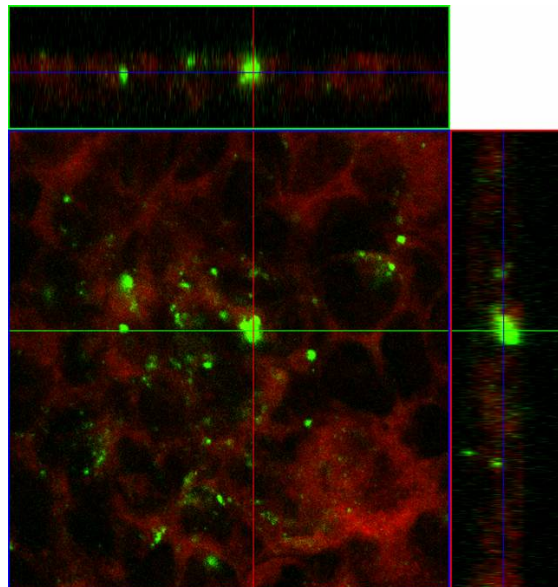




### 3.3 Überexpressionsversuche in HEK293-Zellen

#### 3.3.1 Nachweis der Infektion

Des weiteren wurden zur weiteren Untersuchung der Nod1- bzw. Nod2-abhängigen Zellaktivierung HEK293-Zellen für Überexpressionsversuche verwendet. Diese Standardzelllinie ist sehr gut mit Plasmid-DNA zu transfizieren und wird deshalb in der Forschung sehr häufig für Überexpressionsexperimente insbesondere auch im Forschungsfeld der „innate immunity“ verwendet (Chamaillard et al., 2003a; Girardin et al., 2003a; Inohara et al., 2000; Ogura, 2001b). Zu Beginn der Versuchsreihe war die Fähigkeit von *C. pneumoniae*, diese Zellen zu invadieren, nachzuweisen. Hierfür wurden die Zellen nach der Infektion mit Chlamydien (MOI=0,5) fixiert, permeabilisiert und mit spezifischen Chlamydien-Antikörpern (grün) sowie einem Antikörper gegen F-Aktin (rot) angefärbt. Abbildung 12 zeigt die HEK293-Zellen mit den Chlamydien in der Konfokalmikroskopie bei 60-facher Vergrößerung. Eine multiple Internalisierung von *C. pneumoniae*-Elementarkörperchen in diese Zellen ist auf dem Foto erkennbar, was durch die Z-stack-analysis bestätigt wurde.



**Abbildung 12** Infektion mit *C. pneumoniae*

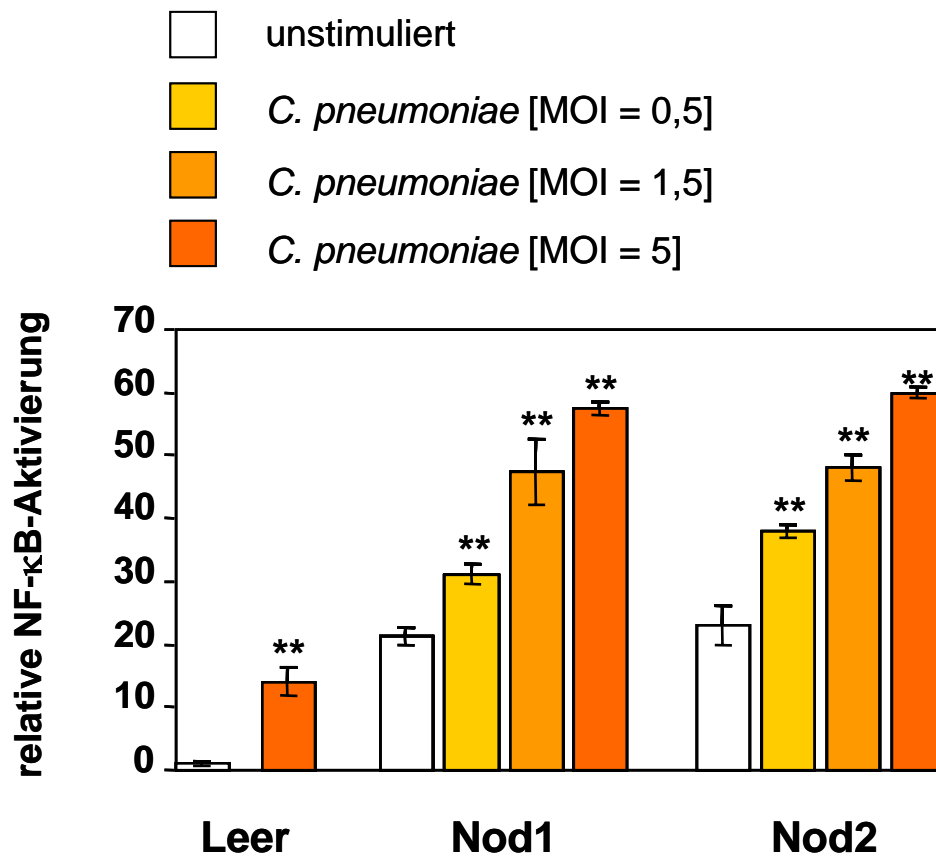
HEK293-Zellen wurden mit *C. pneumoniae* (MOI=0,5) infiziert. Die Abbildung zeigt eine Anfärbung der Chlamydien mit spezifischen Antikörpern (grün) und Darstellung von F-Aktin der Zellen (rot) in Konfokalmikroskopie bei 60-facher Vergrößerung.

### 3.3.2 Der Einfluss von Nod1 und Nod2 auf die NF- $\kappa$ B-Aktivierung durch Chlamydien

Zur Bestätigung der vorherigen Experimente, welche eine Rolle von Nod1 in der Wirtszellinfektion mit *C. pneumoniae* zeigten, wurden nachfolgend „gain-of-function“-Experimente in HEK293-Zellen durchgeführt. Diese Zellen exprimieren nachweislich kein TLR2 und TLR4 (Kirschning et al., 1998) sowie sehr wenig Nod1 und kaum Nod2 (siehe Abbildung 9).

Dazu wurden Plasmide, welche für Nod1 und Nod2 kodierten, oder als Kontrolle ein Leervektor mit einem NF- $\kappa$ B-abhängigen Reporter gen in die Zellen kotransfiziert. Am nächsten Tag erfolgte die Infektion mit *C. pneumoniae* (MOI 0,5, 1,5 und 5) für 7 h, worauf die Aktivität des NF- $\kappa$ B-abhängigen Luziferase-Reporter genes ermittelt werden konnte.

In der Abbildung 13 ist eine Verstärkung der Chlamydien-induzierten NF- $\kappa$ B-Aktivierung durch Nod1- und Nod2-Überexpression zu erkennen. Zellen mit überexprimierten Nod1 bzw. Nod2 zeigen eine hohe konstitutive Aktivität von NF- $\kappa$ B, welche nicht eindeutig erklärt werden kann, jedoch schon mehrfach in anderen publizierten Studien beobachtet wurde (Bertin et al., 1999; Bonen et al., 2003; Girardin et al., 2003b). Zusammenfassend deuten die Daten jedoch an, dass Nod1, aber auch Nod2 eine NF- $\kappa$ B-Aktivierung durch *C. pneumoniae* in HEK293-Zellen vermitteln können. Darüber hinaus konnte auch eine verstärkte, Chlamydien-induzierte IL-8-Sekretion nach Nod1- bzw. Nod2-Überexpression beobachtet werden (Daten nicht gezeigt).



**Abbildung 13** Nod1- und Nod2-abhängige NF-κB-Aktivierung in HEK293-Zellen nach Infektion mit *C. pneumoniae*

Nach transienter Transfektion von HEK293-Zellen mit Nod1, Nod2 oder einem leeren Expressionsvektor sowie einem NF-κB-Luziferase-Reporter gen wurden die Zellen mit *C. pneumoniae* infiziert. Nach 7 h wurden die Zellen lysiert und die relative Luziferaseaktivität ermittelt. Die Daten entsprechen den Mittelwerten  $\pm$  SEM aus drei unabhängigen Versuchen (\*\* zeigt einen signifikanten Unterschied gegenüber der Kontrolle,  $p < 0,01$ ).

### **3.4 Bedeutung der NLR und TLRs als intra- bzw. extrazelluläre Rezeptoren in der Erkennung von *C. pneumoniae***

Um die Rolle von intrazellulären (Nod1 und Nod2) versus extrazellulärem PRR (TLR2) in der Chlamydien-induzierten Immunantwort genauer zu untersuchen, wurden erneut lebende sowie hitzeinaktivierte *C. pneumoniae* verwendet. Dieser Erreger wurde entweder auf die Zellen gegeben (extrazelluläre Stimulation) oder mit Hilfe der Calcium-Phosphat-Transfektion in die Zellen eingebracht (wie z.B. beschrieben in (Girardin et al., 2003a; Inohara et al., 2003b)).

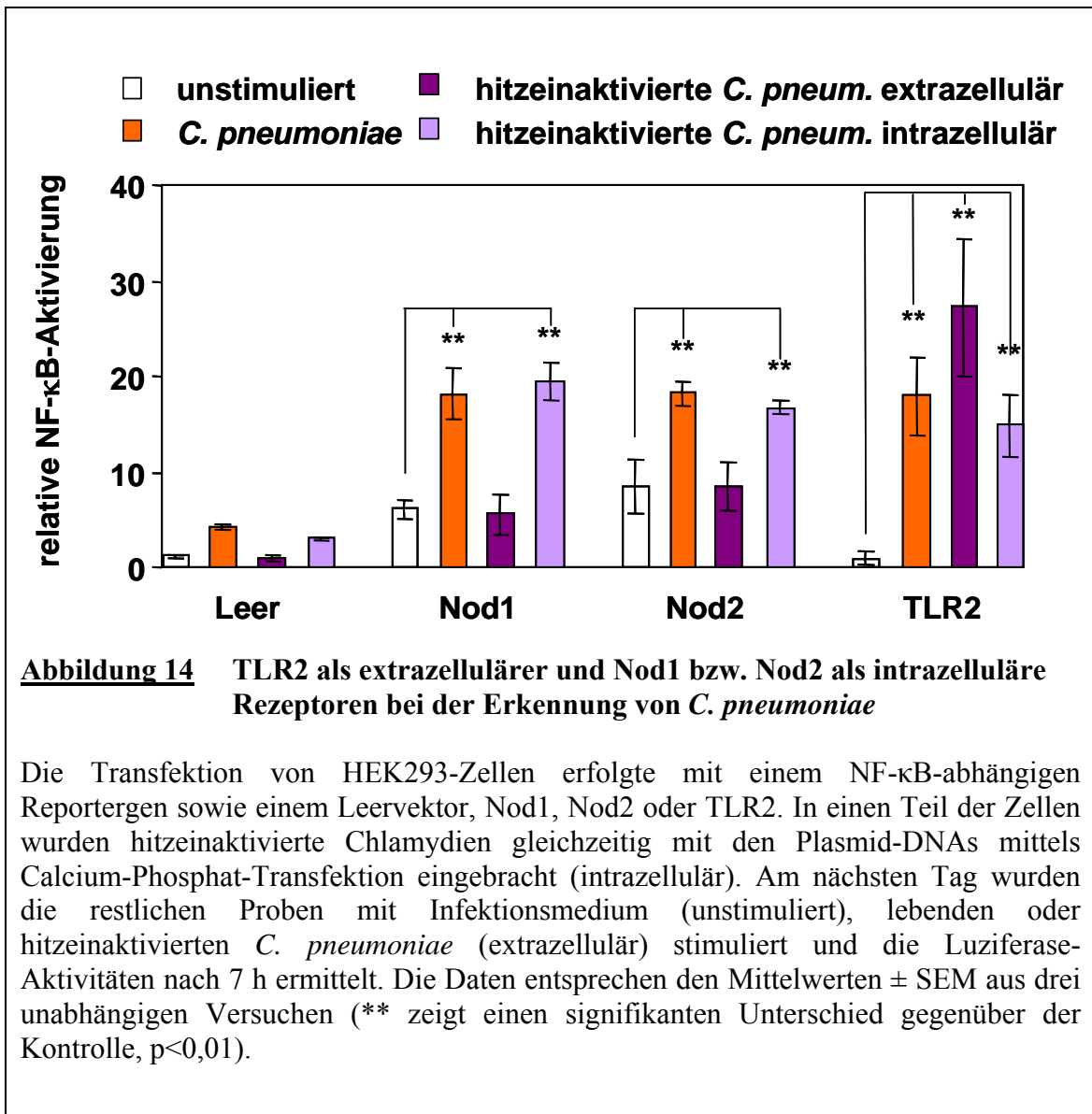
Im Einzelnen erfolgte eine Transfektion der HEK293-Zellen mit Nod1, Nod2, TLR2 oder dem Leervektor. Ein NF- $\kappa$ B-Luziferase-Reportergen wurde kotransfiziert, zusätzlich wurden in einem Teil der Zellen hitzeinaktivierte *C. pneumoniae* eingebracht. Am nächsten Tag wurde ein anderer Teil der Zellen mit unbehandelten bzw. hitzeinaktivierten Chlamydien stimuliert und die NF- $\kappa$ B-Aktivierung anhand der Luziferase-Aktivitäten ermittelt.

Die Abbildung 14 zeigt eine Nod1- und Nod2-abhängige bzw. eine TLR2-abhängige NF- $\kappa$ B-Aktivierung durch lebende *C. pneumoniae*. Im Gegensatz zu den lebenden Chlamydien waren hitzeinaktivierte Erreger nur in der Lage die Zellen über Nod1 oder Nod2 zu aktivieren, wenn sie durch Transfektion in die Zellen eingebracht wurden. Bei der extrazellulären Stimulation mit hitzeinaktivierten *C. pneumoniae* konnte eine HEK293-Zellaktivierung über TLR2, nicht jedoch über Nod1 oder Nod2 beobachtet werden.

Bei Nod1 und Nod2 liegt eine fast gleich hohe NF- $\kappa$ B-Aktivierung nach der Stimulation mit lebenden *C. pneumoniae* sowie intrazellulären, hitzeinaktivierten Chlamydien vor. Die intrazelluläre Stimulation der TLR2-transfizierten Zellen mit hitzeinaktivierten Chlamydien bewirkt im Gegensatz zu extrazellulären Stimulation nur eine geringe NF- $\kappa$ B-Aktivierung. Die mäßige NF- $\kappa$ B-Aktivierung durch intrazellulär zugesetzte, hitzeinaktivierte Chlamydien in TLR2-exprimierenden Zellen könnte auf ein temporär extrazelluläres Vorhandensein der Erreger während der Transfektion oder eine bei der Stimulationszeit möglicherweise auftretende Zellyse zurückzuführen sein.

Demnach dienen Nod1, Nod2 und TLR2 als Rezeptoren für Chlamydien in verschiedenen Kompartimenten der Zelle. Für die extrazelluläre Pathogenerkennung scheinen TLRs und für die Zellantwort auf internalisierte Chlamydien scheinen Nod1

und Nod2 verantwortlich zu sein, wobei hitzestabile Bestandteile der Chlamydien durch Nod1, Nod2 und TLR2 erkannt zu werden scheinen.



### 3.5 Signaltransduktion in HEK293-Zellen

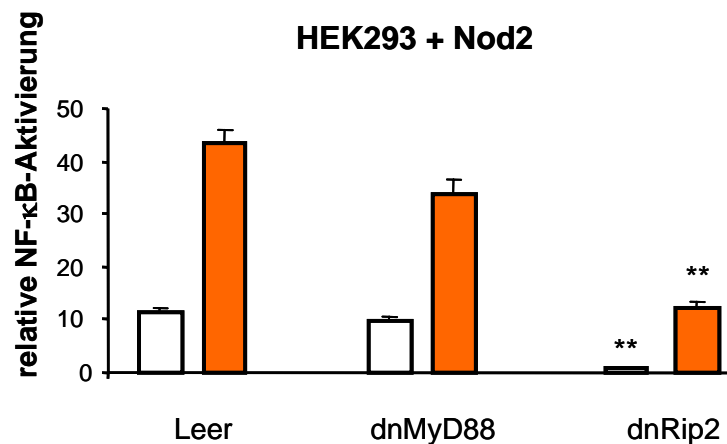
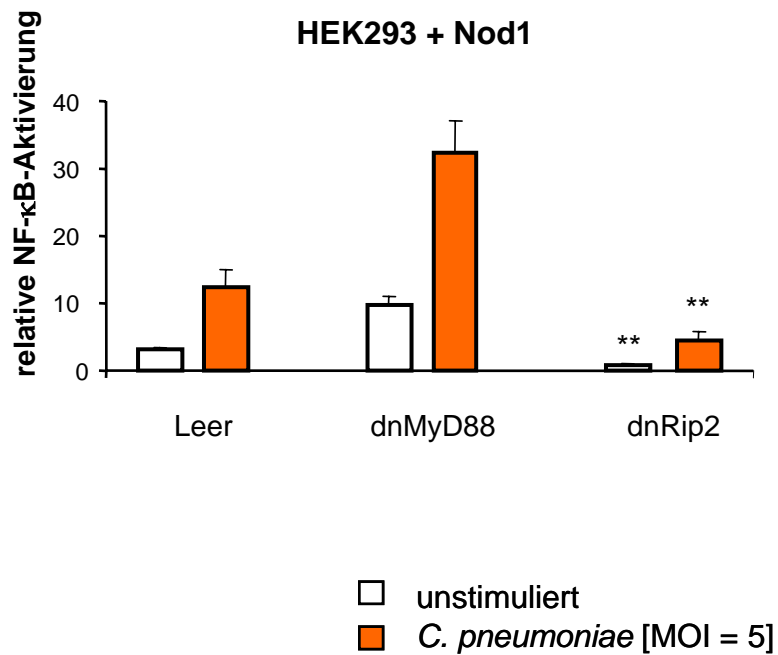
#### 3.5.1 Rip2 und MyD88

Der Signalweg von Nod1 bzw. Nod2 ist noch nicht vollständig verstanden. In der Literatur ist eine direkte Interaktion von Nod1 bzw. Nod2 mit dem Protein Rip2 beschrieben (Bertin et al., 1999; Ogura, 2001b). Im Gegensatz dazu übermittelt MyD88 in fast allen TLR-Signalwegen mit Ausnahme von TLR3 als Adaptermolekül die NF- $\kappa$ B-Aktivierung (Akira et al., 2006). Im Folgenden wurde die Rolle von MyD88 und Rip2 in der Nod1- bzw. Nod2-abhängigen NF- $\kappa$ B-Aktivierung durch Chlamydien untersucht. Hierfür wurden dominant-negative Mutanten (trunkierte Varianten) von MyD88 und Rip2 verwendet, welche endogene Proteine funktionell kompetitiv hemmen.

Es wurden HEK293-Zellen mit Nod1 oder Nod2 sowie einem NF- $\kappa$ B-abhängigen Reporter gen transfiziert. Zusätzlich wurden zum Teil dominant-negative Mutanten von Rip2 oder MyD88 kotransfiziert. Am nächsten Tag erfolgte die Stimulation der Zellen mit *C. pneumoniae* (MOI=5). Die NF- $\kappa$ B-Aktivierung wurde indirekt mittels eines Luziferase-Assay bestimmt.

Aus der Abbildung 15 kann man entnehmen, dass die Nod1- und Nod2-abhängige NF- $\kappa$ B-Aktivierung durch Chlamydien durch dominant-negatives Rip2 signifikant vermindert werden konnte. Hingegen wurde die NF- $\kappa$ B-Aktivierung durch die Kotransfektion von dominant-negativem MyD88 kaum beeinflusst. Dies macht erneut deutlich, dass Nod1 bzw. Nod2 und Rip2, nicht aber MyD88 und die TLRs eine NF- $\kappa$ B-Aktivierung in dem beschriebenen Assay vermitteln.

Nicht gezeigt sind die Versuche, bei denen auch TLR2 eingesetzt wurde. Dort zeigte sich eine signifikante Verminderung der NF- $\kappa$ B-Aktivierung durch dominant-negatives MyD88.



**Abbildung 15** Rip2, nicht aber Myd88 ist am Signalweg von Nod1 und Nod2 beteiligt

Ein NF-κB-abhängiges Reportergen sowie Nod1 oder Nod2 wurden in HEK293-Zellen transfiziert und dominant-negative Mutanten von MyD88 und Rip2 kotransfiziert. Am nächsten Tag wurden die Zellen mit *C. pneumoniae* (MOI=5) infiziert und die NF-κB-Aktivierung durch ein Luziferase-Assay ermittelt. Die Daten entsprechen den Mittelwerten ± SEM aus drei unabhängigen Versuchen (\*\* zeigt einen signifikanten Unterschied gegenüber der Kontrolle,  $p < 0,01$ ).

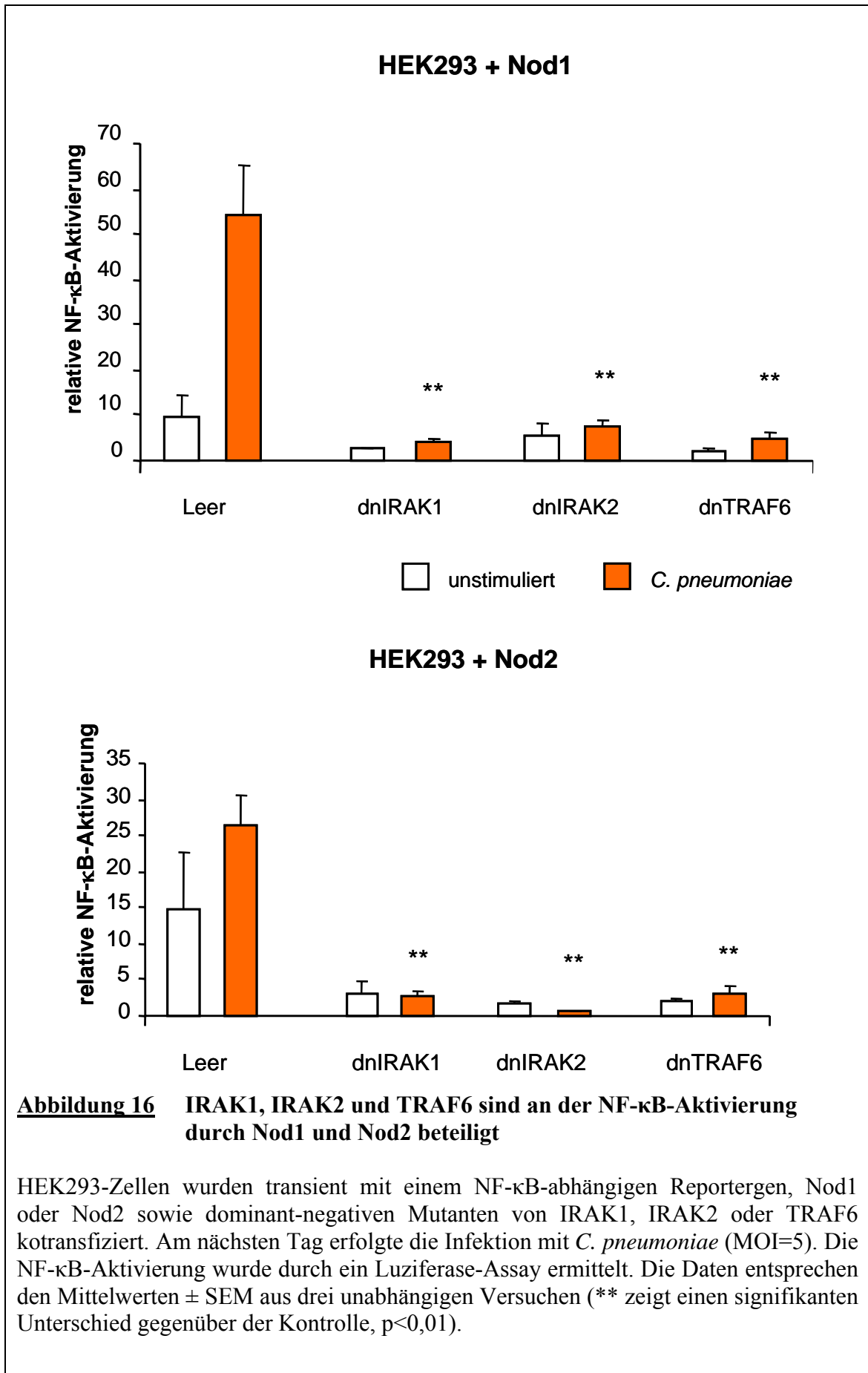


### 3.5.2 IRAK1, IRAK2 und TRAF6

Da nachgewiesen werden konnte, dass die Pathogenerkennung von Nod1 und Nod2 zu einer verstärkten NF- $\kappa$ B-Aktivierung in HEK293-Zellen führt, sollten nun weitere Proteine des Nod1- bzw. Nod2-abhängigen Signalwegs ausgemacht werden. Die Proteine IRAK1, IRAK2 und TRAF6 sind bisher als Aktivatoren von NF- $\kappa$ B in den gemeinsamen Signalweg von IL-1 und TLR bekannt (Akira et al., 2001). Deren mögliche Beteiligung in der Nod1- bzw. Nod2-Signalkette wurde im Folgendem mit Hilfe von dominant-negativer Mutanten dieser Proteine untersucht.

Die Transfektion von HEK293-Zellen erfolgte mit Nod1 oder Nod2 sowie einem NF- $\kappa$ B-abhängigen Reporter-gen. Zusätzlich wurden dominant-negative Mutanten von IRAK1, IRAK2 oder TRAF6 kotransfiziert. Am nächsten Tag wurden die Zellen mit *C. pneumoniae* (MOI=5) infiziert. Die NF- $\kappa$ B-Aktivierung wurde mittels eines Luziferase-Assay bestimmt.

Eine signifikante Hemmung der Nod1- und Nod2-abhängigen NF- $\kappa$ B-Aktivierung durch *C. pneumoniae* mittels dominant-negativer Mutanten von IRAK1, IRAK2 und TRAF6 ist zu erkennen (Abbildung 16). Dies deutet auf eine wichtige Rolle von IRAK1, IRAK2 und TRAF6 in der Nod1- und Nod2-abhängigen NF- $\kappa$ B-Aktivierung durch *C. pneumoniae* hin.



## 4 Diskussion

### 4.1 Die Rolle von Nod1, Nod2 und der TLRs bei der Erkennung von *C. pneumoniae* in Endothelzellen

#### 4.1.1 Epithel- und Endothelzellen in der angeborenen Immunabwehr

Bei der Erregerabwehr im Organismus ist die Beteiligung des angeborenen Immunsystems mit relativ unspezifischen Abwehrmechanismen als auch die des erworbenen Immunsystems mit relativ spezifischer Abwehr durch immunkompetente Zellen unerlässlich. Neben Makrophagen, dendritischen Zellen und Neutrophilen stellen Epithel- und Endothelzellen einen Teil des angeborenen Immunsystems die erste Instanz dar, welche direkt von einer Erregerinvasion betroffen sein kann. So sind beispielsweise die Lunge und der Darm vollständig mit Epithel ausgekleidet und stellen die erste Barriere für inhalierte bzw. inokulierte Pathogene dar. Endothelzellen als Oberflächenauskleidung von Gefäßen kommen insbesondere bei lokalen Entzündungsreaktionen und bei systemischen Infektionen eine wichtige Bedeutung zu. Effektive Abwehrmechanismen sind entscheidend für die Eindämmung oder Ausbreitung einer Infektion, jedoch sind wichtige Aspekte der angeborenen Immunität nur unzureichend verstanden.

Im Rahmen dieser Dissertation konnte in Versuchen mit verschiedenen Zelllinien gezeigt werden, dass sowohl venöse (HUVEC) als auch arterielle (HAEC) Endothelzellen durch *C. pneumoniae* invadiert werden können. Diese Infektion führt zu einer Zellaktivierung mit nachfolgender IL-8-Sekretion im Sinne einer Entzündungsreaktion. Bei dieser Wirtszellaktivierung spielen PRRs aller Wahrscheinlichkeit nach eine zentrale Rolle. Hierbei kommen grundsätzlich extrazelluläre sowie intrazelluläre Rezeptoren der angeborenen Immunabwehr für die Erkennung von *C. pneumoniae* in Frage.

#### 4.1.2 Extra- vs. intrazelluläre Rezeptoren in der Immunantwort von Endothelzellen

*C. pneumoniae* sind als obligat intrazelluläre Erreger durch viele humorale Mechanismen der Immunabwehr schlecht zugänglich. Zudem entgehen sie nach der Internalisierung der Erkennung durch extrazelluläre PRRs. Die im Rahmen dieser Dissertationsarbeit gemachte Beobachtung, dass hitzeinaktivierte *C. pneumoniae* im Gegensatz zu lebenden bzw. transfizierten toten Chlamydien kaum in der Lage waren Endothelzellen zu aktivieren (IL-8-Sekretion), deutet an, dass eine Invasion dieser Zellen für die Zellaktivierung eine wichtige Voraussetzung zu sein scheint. Ähnliche Beobachtungen konnten auch Eissenberg et al. machen (Eissenberg et al., 1983). Somit spielen extrazelluläre PRRs bei der Erkennung von *C. pneumoniae* in Endothelzellen möglicherweise eine untergeordnete Rolle.

Von den für Versuche verwendeten Endothelzellen (HUVEC) ist bekannt, dass sie als Rezeptoren der angeborenen Immunabwehr unter anderem TLR4 und in geringen Mengen TLR2 exprimieren (Faure et al., 2000). Diese Rezeptoren können grundsätzlich auch Chlamydien erkennen, jedoch ist nicht genau klar, welchen Stellenwert sie bei der Endothelzellaktivierung durch *C. pneumoniae* besitzen. Darüber hinaus wurde die Beteiligung zytosolischer PRRs in der Endothelzellaktivierung durch Chlamydien bisher nicht untersucht.

In den Versuchsreihen gelang mittels Reverse-Transkriptase-PCR der Nachweis einer deutlichen Expression von Nod1-mRNA in HUVEC und HAEC. Im Gegensatz dazu ist Nod2 nur in sehr kleinen Mengen konstitutiv in humanen Endothelzellen exprimiert. Ein spezifischer Proteinnachweis von Nod1 und Nod2 konnte bisher aufgrund nicht verfügbarer Antikörper nicht durchgeführt werden.

Die in dieser Dissertationsarbeit dargestellten Experimente lassen vermuten, dass Nod1 eine wichtige Rolle in der angeborenen Immunantwort in Endothelzellen spielt.

#### 4.1.3 Erkennung von *C. pneumoniae* durch Nod1 und Nod2

Im Rahmen dieser Dissertation konnte die herausragende Rolle von Nod1 in der Immunantwort auf *C. pneumoniae* in Endothelzellen gezeigt werden. Mit Hilfe von Nod1-spezifischer siRNA ließ sich die durch *C. pneumoniae*-induzierte IL-8-Sekretion in HUVEC und auch HAEC signifikant vermindern. Eine Beteiligung von TLRs in der *C. pneumoniae*-induzierten IL-8-Produktion in Endothelzellen scheint hingegen von untergeordneter Bedeutung zu sein. Die unvollständige Hemmung der IL-8-Sekretion durch Nod1-siRNA könnte auf eine nicht komplette Unterdrückung von endogenem Nod1 durch die spezifischen siRNAs als auch auf eine parallele Erkennung von *C. pneumoniae* durch weitere PRRs wie z.B. TLR2 oder TLR4 zurückgeführt werden. Durch Überexpressionsversuche in HEK293-Zellen konnte die Bedeutung von Nod1 in der Zellaktivierung durch *C. pneumoniae* in Form einer NF- $\kappa$ B-Aktivierung und auch einer IL-8-Ausschüttung bestätigt werden. Gleiche Ergebnisse wurden für Nod2 erzielt. So kann grundsätzlich von einer möglichen Erkennung von *C. pneumoniae* durch Nod1 und Nod2 in entsprechend exprimierenden Zellen ausgegangen werden. Da Endothelzellen vor allem Nod1 oder kaum Nod2 exprimieren, ist vor allem von einer wichtigen Bedeutung von Nod1 in der Endothelzellaktivierung durch *C. pneumoniae* auszugehen.

Eine kürzlich erschienene Publikation konnte ebenso die Bedeutung von Nod1 in Epithelzellen bei der Zellaktivierung durch *C. trachomatis* bzw. *C. muridarum* ausmachen (Welter-Stahl et al., 2006). Ebenso konnten TLR-unabhängige Effekte in der Chlamydieninfektion ausgemacht werden. Beispielsweise wurde nach Infektion von Mausmakrophagen mit *C. pneumoniae* eine NF- $\kappa$ B-Aktivierung sowie unverminderte Expression von TNF $\alpha$ , IL-1 und IL-6 in TLR4- und MyD88-defizienten Zellen beobachtet werden (Rothfuchs et al., 2004). Diese Effekte wurden möglicherweise durch NLR vermittelt.

Im Gegensatz zu diesen Beobachtungen besaßen Nod1 und Nod2 in epithelialen Genitaltraktzellen nur eine untergeordnete Rolle in der Infektion mit *C. trachomatis* und *C. muridarum*, da eine MyD88-Hemmung sich stark auf die Zytokinproduktion auswirkte (Derbigny et al., 2005). Demnach erfolgte eine Zellaktivierung vorrangig durch TLR2. Diese Zellen exprimieren größere Mengen TLR2 und die Erkennung von *C. trachomatis* und *C. muridarum* in Genitaltraktzellen scheint somit v.a. TLR2-abhängig zu sein.

#### 4.1.4 Zusammenspiel von NLR und TLRs

Bei Immunantworten auf bestimmte Erreger handelt es sich um ein komplexes Zusammenspiel verschiedener Mechanismen. Es ist wahrscheinlich, dass bei der Endothelzellaktivierung durch eine Infektion mit *C. pneumoniae* nicht nur ein bestimmter PRR für eine Zellantwort verantwortlich ist. Geht man von einer Erkennung der Chlamydien durch Nod1 sowie TLRs in Endothelzellen aus, ergibt sich die Frage eines möglichen Zusammenwirkens dieser Signalwege.

Die Datenlage zu einer möglichen gegenseitigen Beeinflussung von Nod-Rezeptoren und TLRs ist vielschichtig und zum Teil widersprüchlich. Bei der Stimulation von humanen Monozyten führte die Kostimulation mit den Nod1-Liganden M-TriDAP und LPS zu einer stärkeren IL-6-Antwort als die Summation der Effekte von LPS bzw. M-TriDAP allein (van Heel et al., 2005b). Dieses deutet auf ein synergistisches Zusammenspiel zwischen Nod1 und TLR4 in der Zellaktivierung hin. In einer anderen Publikation wurde ebenso über einen synergistischen Effekt durch Verwendung von mikromolaren Konzentrationen Nod1-spezifischer Muropeptide bei der TLR-induzierten IL-8-Produktion in Monozyten berichtet (Uehara et al., 2005). Dieser Effekt konnte durch Nod1-spezifische siRNA unterbunden werden. Ähnliche Ergebnisse wurden auch für Nod2 erzielt: Yang et al. zeigten synergistische Effekte von Nod2 und TLRs auf, indem synergistisch gesteigerte Antworten durch Stimulation mit dem Nod2-Liganden Muramyldipeptid und LPS nachgewiesen werden konnten (Yang et al., 2001). Auch induzierten synthetische Muropeptide, welche alleine nicht zur Zytokinfreisetzung im humanen Blut fähig waren, bei gleichzeitiger Gabe von LPS eine signifikante Freisetzung von unterschiedlichen Zytokinen (Traub et al., 2004). Darüber hinaus fehlte die synergistisch gesteigerte Zytokinausschüttung bei peripheren Monozyten, welche homozygot für die mit Morbus Crohn assoziierte Nod2-Mutation waren (van Heel et al., 2005a). Diese Daten sprechen für eine wichtige Funktion und gegenseitige Verstärkung von Nod1 bzw. Nod2 und TLRs in der Zellantwort auf bakterielle Infektionen.

Im Gegensatz zu den beschriebenen synergistischen Effekten von Nod1 bzw. Nod2 und TLRs, veröffentlichten Watanabe et al., dass Nod2 die TLR2-vermittelte Th1-Antwort negativ reguliert (Watanabe et al., 2004). Dabei wurde in Milzzellen aus Mäusen gezeigt, dass bei Fehlen von Nod2 bzw. Vorhandensein einer Morbus Crohn-assoziierten Mutation die Stimulation mit PGN zu einer gesteigerten Aktivierung von NF- $\kappa$ B-c-Rel und Ausschüttung von IL-12 mit nachfolgender verstärkter Th1-Antwort-

Zytokinproduktion führte. Diese Effekte wurden auf TLR2 zurückgeführt, wobei intaktes Nod2 einem antiinflammatorischen Signalweg vermitteln soll. Jedoch ist zu erwähnen, dass die PGN-Erkennung durch TLR2 umstritten ist (Travassos et al., 2004). Darüber hinaus zeigen Versuche anderer Arbeitsgruppen mit Nod2-negativen Mäusen bzw. mit Mäusen, welche eine Mutation im Nod2-Gen ähnlich der von Crohn-Patienten hatten, widersprüchliche Ergebnisse (Kobayashi et al., 2005; Maeda et al., 2005). Teilweise könnte diese Diskrepanz damit erklärt werden, dass die mit Morbus Crohn-assoziierte Nod2fs-Mutation in In-vitro-Studien mit humanen Zellen zwar einen "loss-of-function"-Phänotyp zeigte (Girardin et al., 2003b; Ogura et al., 2001a), eine homologe Mutation in Mäusen aber eher einen "gain-of-function"-Phänotyp aufweist (Maeda et al., 2005) und somit nicht mit Nod2-knock-out-Mäusen vergleichbar ist. Außerdem muss betont werden, dass unterschiedliche Parameter untersucht wurden und z.B. IL-12 und IL-8 sehr unterschiedlich reguliert werden und somit der Einfluss von Nod2 auf die Sekretion dieser Zytokine unterschiedlich ausfallen kann (Watanabe et al., 2004). Zusammenfassend lässt sich sagen, dass bezüglich einer Interaktion des Nod2- und des Nod1-Signalweges und der TLR-abhängigen Wirtszellaktivierung noch erheblicher Klärungsbedarf besteht.

Zusätzlich wurde über mögliche funktionelle Interaktionen zwischen Nod1 und Nod2 berichtet (Netea et al., 2005). Patienten, welche homozygot für die Nod2fs-Mutation waren, zeigten keine Zellantwort auf den spezifischen Nod1-Agonisten M-TriDAP. Dies könnte ein Hinweis auf den Zusammenhang zwischen dem Fehlen des Nod1/M-TriDAP-Signalweges und der Assoziation mit Morbus Crohn darstellen. Die Nod2fs-Mutation wirkte jedoch nicht direkt als dominant-negatives Molekül für den Nod1-Signalweg, was auf eine Blockade von zusätzlichen Faktoren in den Nod2fs exprimierenden Zellen hinweist. Bei Patienten mit der Nod2fs-Mutation war eine signifikant hohe Expression von PGRP-S auffällig. Eventuell spielt dieses Protein bei den Interaktionen der NLR eine Rolle.

Ein Zusammenwirken von NLR und TLRs scheint wahrscheinlich, jedoch sind verschiedene Aspekte der Interaktionen noch zu untersuchen.

## 4.2 PAMPs von *C. pneumoniae* in der Nod1- bzw. Nod2-vermittelten Immunantwort

### 4.2.1 Chlamydiale Moleküle, welche das angeborene Immunsystem aktivieren

Ein wichtiger, inflammatorisch wirksamer Bestandteil der gramnegativen Bakterien ist das LPS, dieses bewirkt eine Zellaktivierung über TLR4. Auch *C. pneumoniae* besitzt diese Molekülstruktur, jedoch lässt sich in den gezeigten Nod1-RNAi-Versuchen eine Prädominanz von Nod1-aktivierenden Molekülen vermuten, wobei eine Zellaktivierung durch chlamydiales LPS in den Hintergrund tritt. Weiterhin gelten als chlamydiale PAMPs Proteine des äußeren Membrankomplexes und Hitzeschockproteine.

Eine Beteiligung von Nod1 an der Erkennung von *C. pneumoniae* in Endothelzellen lassen jedoch PGN oder PGN-ähnlichen Strukturen als chlamydiale PAMPs wichtig erscheinen.

### 4.2.2 Peptidoglykan und *C. pneumoniae*

Bisher ist noch kein biochemischer Nachweis einer Peptidoglykansynthese in Chlamydien gelungen, jedoch scheinen in Chlamydien zumindest einige Enzyme des Peptidoglykanstoffwechsel funktionell zu sein (Hesse et al., 2003; Skipp et al., 2005). In einer älteren Publikation zeigen sich die Chlamydien sensitiv gegenüber Antibiotika, welche die Peptidoglykansynthese inhibieren (Moulder, 1993). Eine erst kürzlich erschienene Veröffentlichung beschrieb zudem die Genexpression einer L,L-Diaminopimelinsäuren-Aminotransferase (CT 390) in Chlamydien, welche m-DAP synthetisiert. M-DAP könnte ein direkter Vorläufer des Lysin als auch ein Bindeglied von PGN-Ketten sein (McCoy et al., 2006). In jedem Fall stellt m-DAP-enthaltendes Dipeptid die minimale Struktur dar, welche von Nod1 erkannt wird (Chamaillard et al., 2003a).

Das PGN oder PGN-Fragmente könnten nach Freisetzung oder Degradierung von Retikularkörperchen durch lysosomale Proteasen ins Zytosol gelangen. Es sind bei verschiedenen Bakterien einschließlich der Chlamydien Sekretionssysteme beschrieben worden, welche grundsätzlich die Einschleusung von PAMPs ins Zytosol ermöglichen könnten. So besitzt das vor allem extrazellulär vorkommende Bakterium *Helicobacter*



*pylori* ein durch ein „*H. pylori* cag pathogenicity island“ kodiertes TypIV-Sekretionssystem (Viala et al., 2004). Dieses Sekretionssystem scheint PGN in das Wirtszellzytosol zu translozieren, welches anschließend eine Nod1-abhängige Wirtszellantwort hervorruft. *C. pneumoniae* besitzt ein Typ-III-Sekretionssystem (Subtil et al., 2000). Dieses könnte möglicherweise dafür verantwortlich sein, dass PGN-ähnliche Strukturen in das Zytoplasma eingeschleust werden und somit zu einer Zellaktivierung führen. Eine alternativer Erklärungsansatz wäre, dass eine Präsenz von PGN bzw. PGN-Fragmenten im Zytoplasma nicht unbedingt notwendig ist, sondern eine Rekrutierung von Nod1 bzw. Nod2 an die vakuoläre Membran erfolgt. In potentieller Übereinstimmung mit dieser Hypothese ist die Beobachtung einer Rekrutierung von Nod2 an die Plasmamembran (Barnich et al., 2005a).

Es muss jedoch betont werden, dass es keinen Beweis für die direkte Bindung von PGN oder PGN-Fragmenten an Nod1 bzw. Nod2 gibt. Die Aktivierung der NLR erfolgt somit entweder durch direkte Interaktion mit ihren PAMPs oder möglicherweise auch indirekt über vorgeschaltete Moleküle.

### 4.2.3 Nod-like-Rezeptoren als antibakteriell wirkende Elemente in der Erregerabwehr

Nod2 ist nicht nur an der Aktivierung von Zellsignalwegen beteiligt, sondern konnte auch als antibakteriell wirkender Faktor identifiziert werden (Hisamatsu et al., 2003). Es konnte gezeigt werden, dass Nod2 in humanen Darmepithelzellen eine intrazelluläre Vermehrung von *Salmonella typhimurium* kontrollierten. Dabei wurden nicht Nod2-exprimierende intestinale Epithelzellen stabil mit Nod2, einem nichtkodierendem Vektor oder einer mit Morbus-Crohn-assoziierten Nod2-Mutation transfiziert und anschließend die Internalisierung von *Salmonella typhimurium* gemessen. Bei den Nod2-transfizierten Zellen fiel im Gegensatz zu den nicht Nod2-exprimierenden Zellen eine deutlich verminderte Internalisierung von *Salmonella typhimurium* auf. Wurde eine mit Morbus Crohn-assoziierte Nod2-Mutation transfiziert, war die Erregeranzahl im Vergleich zur Kontrolle unverändert. Dies deutet auf eine Hemmung der intrazellulären Erregervermehrung in Nod2-exprimierenden Epithelzellen hin, wobei dieser Effekt bei Vorliegen einer Nod2-Mutation aufgehoben ist.

In diesem Zusammenhang konnte eine GRIM-19-abhängige antibakterielle Funktion von Nod2 gezeigt werden (Barnich et al., 2005b). So wurde eine verstärkte Vermehrung

der Bakterien in GRIM-19-defizienten Zellen sowie eine verminderte Bakterienreplikation in GRIM-19-überexprimierenden Zellen beobachtet.

Travassos et al. beschrieben eine Erkennung von *Pseudomonas aeruginosa* über Nod1 (Travassos et al., 2005). Zwar gelten Pseudomonaden als v.a. extrazelluläre Bakterien, eine Internalisierung in bestimmte Zellarten, vor allem respiratorische Epithelzellen, konnte jedoch gezeigt und Nod1 als intrazellulärer Rezeptor in der Erkennung von *Pseudomonas aeruginosa* ausgemacht werden. Weiterhin wurde in Nod1-knockout-Mäusen eine abgeschwächte antibakterielle Abwehr nach Infektion mit *Pseudomonas aeruginosa* beobachtet. Diese Ergebnisse sind vermutlich auf das Fehlen von Nod1 als antibakteriell wirkendes Element zurückzuführen.

Diese Beobachtungen lassen an eine ähnliche Funktion von Nod1 in Endothelzellen bei der Chlamydieninfektion denken. Der Effekt einer vermehrten Chlamydienreplikation in Nod1-gesilenceten Zellen (durch RNAi) im Sinne einer antibakteriellen Wirkung von Nod1 ist eher unwahrscheinlich, da bei größerer Chlamydienvermehrung eine verstärkte IL-8-Produktion zu erwarten wäre. Dies konnte im Rahmen dieser Dissertationsarbeit nicht beobachtet werden, jedoch sollte dieser Aspekt in Zukunft genauer untersucht werden.

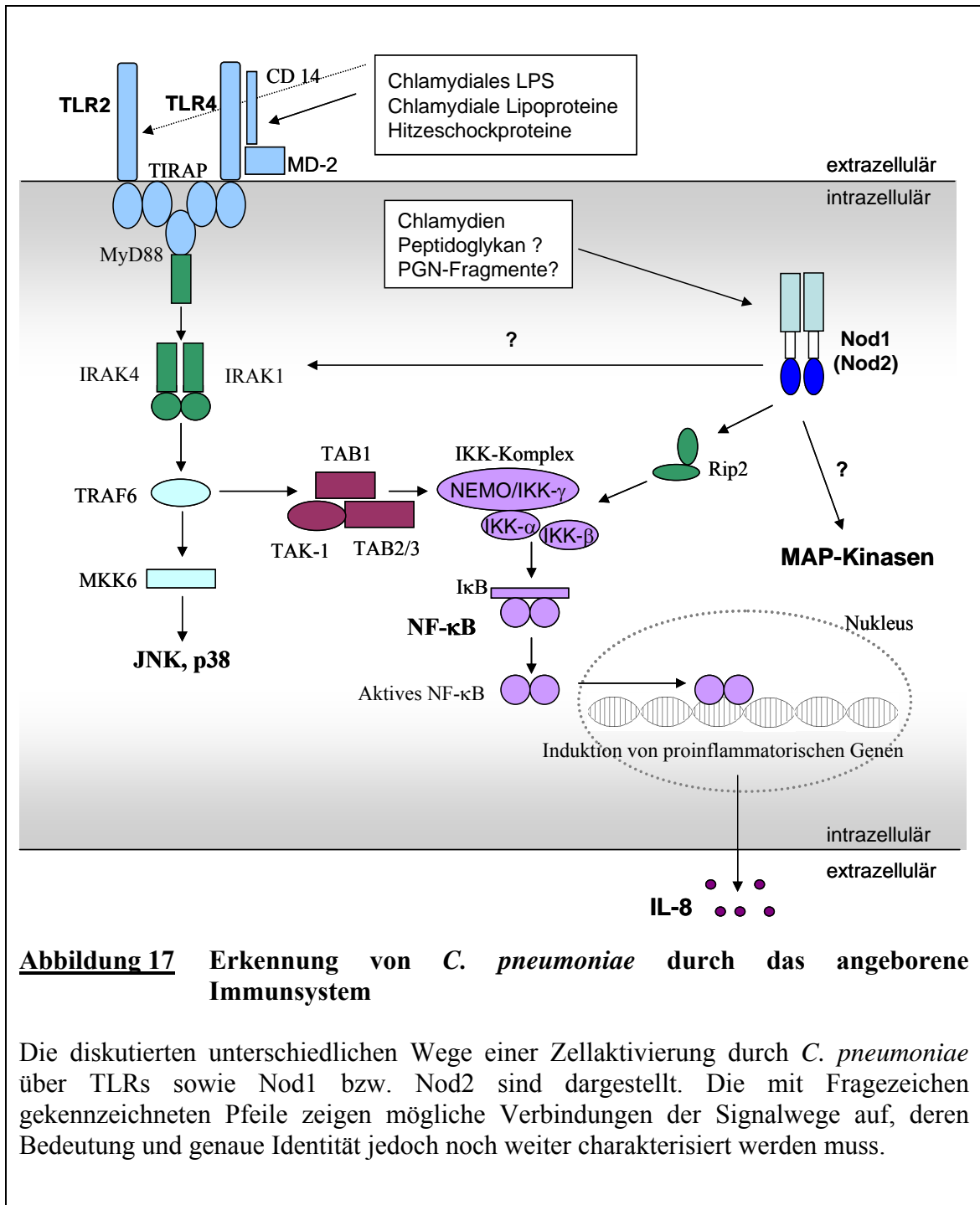
### **4.3 Signaltransduktion und Aktivierung proinflammatorischer Mediatoren über Nod1 und Nod2**

#### 4.3.1 Die intrazelluläre Nod1- bzw. Nod2-aktivierende Signalkaskade

Die Aktivierung von Nod1 bzw. Nod2 führt nach Infektion mit *C. pneumoniae* zu einer NF- $\kappa$ B-Aktivierung (siehe auch Kapitel 1.1.4.). Die dazwischen liegenden Moleküle der Signaltransduktion sind bisher nur unzureichend charakterisiert.

Zur Identifizierung von Signalmolekülen im Nod1- bzw. Nod2-abhängigem Signalweg wurden im Rahmen dieser Dissertationsarbeit Überexpressionsversuche mit dominant-negativen Mutanten durchgeführt. Wie in der Literatur angegeben konnte die Involvierung von Rip2 bestätigt werden. Dabei vermittelte Rip2, jedoch nicht MyD88, die Chlamydien-induzierte NF- $\kappa$ B-Aktivierung über Nod1 und Nod2. Rip2 nimmt somit in der Nod1/Nod2-aktivierten Signaltransduktion eine ähnliche Rolle ein wie das Adaptermolekül MyD88 in der TLR-abhängigen Signalkaskade. Sowohl Rip2 als auch MyD88 vermitteln eine NF- $\kappa$ B-Aktivierung.

Eine zusammenfassende Darstellung der Ergebnisse dieser Dissertationsarbeit im Kontext bekannter Teilschritte des Nod-Signalweges bietet die Abbildung 17.



#### 4.3.2 Bedeutung von Rip2

Rip2 spielt in verschiedenen Signalwegen eine wichtige Rolle. In der Publikation von Kobayashi et al. wurde die Bedeutung von Rip2 bei den Signalwegen von Nod1 und Nod2 sowie von TLR2, TLR3 und TLR4 beschrieben (Kobayashi et al., 2002). Es wurde gezeigt, dass Makrophagen, welche Rip2-defizient waren, eine verminderte Zellaktivierung durch bestimmte TLR-Liganden wie zum Beispiel LPS zeigten. Jedoch ist zu bedenken, dass eine Kontamination der eingesetzten TLR-Agonisten mit Nod1- und Nod2-stimulierenden Molekülen die verminderte Aktivierung der Rip2-defizienten Makrophagen erklären könnte. Daher sind weitere Untersuchungen zur Rolle von Rip2 in den TLR-Signalwegen notwendig. Im Gegensatz zur noch unklaren Bedeutung von Rip2 für die TLR-Signalkaskade gilt die Beteiligung von Rip2 an der Nod1- bzw. Nod2-abhängigen NF- $\kappa$ B-Aktivierung als gesichert (Chin et al., 2002; Kobayashi et al., 2002).

#### 4.3.3 Funktionen der IRAKs

Mitglieder der IRAK-Kinasen-Familie weit verbreitet und an unterschiedlichen Signalwegen beteiligt. Bei Menschen und Mäusen wurden bisher IRAK1, IRAK2, IRAK4 und IRAK-M beschrieben (Wesche et al., 1999).

IRAK1, welches eine Assoziation mit dem IL-1-TypI-Rezeptor zeigt, wird durch eine Vielzahl von TLR-Liganden über MyD88 aktiviert. Nach Autophosphorylierung bewirkt IRAK1 eine NF- $\kappa$ B-Aktivierung über TRAF6 (Qian et al., 2001). IRAK2 scheint sowohl eine Verbindung mit MyD88 und TRAF6 als auch mit TIRAP/Mal einzugehen. Die genaue Funktion von IRAK2 in TLR- und IL-1-Rezeptor-aktivierten Signalwegen ist jedoch noch unklar (Huang et al., 2005).

Eine mögliche Beteiligung der IRAKs in Nod1- bzw. Nod2-vermittelten Signalwegen wurde hierbei mit Hilfe von Überexpression dominant-negativer Mutanten von IRAK1 und IRAK2 aufgezeigt. Dabei könnten die IRAKs als direkte Elemente des Nod1- bzw. Nod2-Signalweges nach Aktivierung durch *C. pneumoniae* beteiligt sein oder aber einen Nebenweg in der Nod1- bzw. Nod2-Signalkaskade darstellen, welcher Nod1 bzw. Nod2 mit der TLR-Kaskade verknüpft. Es ist jedoch zu erwähnen, dass Experimente mit dominant-negativen Mutanten relativ artifizielle Systeme darstellen und nicht immer zu Ergebnissen führen, welche die physiologische Funktion der endogenen

Proteine widerspiegeln. Eine Bestätigung dieser Resultate unter Verwendung von Knock-out-Zellen oder siRNA ist daher in der Zukunft notwendig.

### 4.3.4 Weitere regulatorische Moleküle im Nod1/2-Signalweg

Im Rahmen dieser Dissertationsarbeit erbrachten Überexpressionsversuche mit dominant-negativen Mutanten in HEK293-Zellen außerdem Hinweise auf eine Beteiligung von TRAF6 bei der Nod1- bzw. Nod2-abhängigen NF- $\kappa$ B-Aktivierung durch *C. pneumoniae*. Inohara et al. konnten allerdings die NF- $\kappa$ B-Aktivierung nicht durch dominant-negative Formen von TRAF6 blockieren (Inohara, 1999). Die Frage zur Involvierung von TRAF6 im Nod1- bzw. Nod2-Signalweg könnte durch andere Methoden wie beispielsweise die Verwendung spezifischer siRNA weiter aufgeklärt werden.

Darüber hinaus wurde eine Interaktion von Nod2 mit TAK-1 beschrieben (Chen et al., 2004). Dieses Protein besitzt eine wichtige Bedeutung in der TLR-, IL-1 $\beta$ - und TNF $\alpha$ -induzierten Aktivierung von IKK und NF- $\kappa$ B. Möglicherweise stellt dieses Protein einen Knotenpunkt des Nod1/2- und des TLR-Signalweges dar.

### 4.3.5 Folgen der NF- $\kappa$ B-Aktivierung

NF- $\kappa$ B gehört zu den wichtigen Transkriptionsfaktoren in der Entzündungsreaktion, dessen Aktivierung die Expression einer Vielzahl von inflammatorischen Mediatoren bewirkt (siehe Kapitel 1.1.5.1).

Bei Chlamydien-Infektionsversuchen in Endothelzellen (siehe Kapitel 3.1.2) sowie Nod1-/Nod2-Überexpressionsversuchen in HEK293-Zellen (nicht gezeigt) konnte eine gesteigerte IL-8-Produktion beobachtet werden. IL-8 stellt ein v.a. NF- $\kappa$ B-reguliertes Gen dar. Zudem zeigten Transfektionsversuche in HEK293-Zellen eine *C. pneumoniae*-induzierte Nod1- bzw. Nod2-abhängige NF- $\kappa$ B-Aktivierung. Zusammengenommen sprechen diese Ergebnisse für eine Nod1- bzw. Nod2-abhängige NF- $\kappa$ B-Aktivierung mit konsekutiver IL-8-Ausschüttung in Endothelzellen bzw. HEK293-Zellen nach Chlamydieninfektion.

#### 4.3.6 Bedeutung von MAP-Kinasen im Nod1- bzw. Nod2-aktivierenden Signalweg

Abgesehen von den vielfältigen Folgen einer NF- $\kappa$ B-Aktivierung wurde eine Beteiligung weiterer Signalwege bei der Zellaktivierung durch *C. pneumoniae* beschrieben, dabei wurde auch eine pro- als auch antiapoptotische Aktivität diskutiert. Mitglieder der MAPK-Familie wie ERK, p38 und JNK werden durch u.a. Zellstress, Hormone, Zytokine sowie auch durch eine Chlamydieninfektion aktiviert und dienen der Regulation der zellulären Genexpression (Airenne et al., 2002; Gibellini et al., 1998; Krull et al., 1999). Nach Stimulation von Wildtyp-Makrophagen mit Nod2-Agonisten konnte eine Aktivierung der MAP-Kinasen p38 MAPK und ERK beobachtet werden (Kobayashi et al., 2005). Weiterhin wurde ein Zusammenhang zwischen Nod1 und JNK, welches als Stresskinase an der Apoptose beteiligt ist, in der Literatur aufgezeigt (Girardin et al., 2001).

Es stellt sich somit die Frage, ob es bei der *C. pneumoniae*-vermittelten Zellaktivierung auch zu einer Nod1- oder Nod2-vermittelten MAP-Kinasen-Aktivierung kommt. Bei nicht gezeigten Versuchen mit den p38-Inhibitor (SB202190) bzw. ERK-Inhibitor (U0126) sollten die Involvierung von p38 und ERK untersucht werden. SB202190 konnte die Nod-abhängige IL-8-Sekretion hemmen. Somit ist eine p38 MAPK-Aktivierung möglich. Allerdings führte U0126 zu keiner Verminderung der Zellsignale, daher scheinen ERK-1 und ERK-2 nicht im Nod-Signalweg involviert zu sein. Diese Ergebnisse geben Hinweise auf weitere Signalwege, die durch Nod1 und Nod2 aktiviert werden und bisher nur in Ansätzen verstanden werden.

#### 4.4 *C. pneumoniae* und Arteriosklerose

Das komplexe Zusammenspiel verschiedener Faktoren, die zur Entstehung von Arteriosklerose führen, ist nur in Ansätzen verstanden. Es ist jedoch anerkannt, dass inflammatorische Prozesse eine wichtige Bedeutung in der Arterioskleroseentstehung einnehmen.

Kurz zusammengefasst laufen folgende Schritte bei der Arterioskleroseentstehung ab: Zunächst werden Apolipoprotein B-enthaltende Lipoproteine aufgrund von Läsionen in der arteriellen Gefäßwand unterhalb der endothelialen Zellschicht eingeschlossen. Es folgt danach eine oxidative Modifikation dieser Moleküle sowie eine lokale Entzündungsreaktion. Konsekutiv wandern Lymphozyten in die Läsion ein, was wiederum zu einer Exazerbation der Entzündungsreaktion und einer Plaqueruptur mit möglicher Okklusion des Blutflusses führt (Doherty et al., 2006).

Eine Involvierung von Mikroorganismen in der Arterioskleroseentstehung wird diskutiert. Hierzu gehören Erregern wie z.B. *Helicobacter pylori*, CMV, EBV, HIV, HSV sowie Hepatitis-B-Viren, wobei es sich vermutlich eher um eine unspezifische Immunreaktion ausgelöst durch die Erreger als um die spezifische Bedeutung des einzelnen Erregers handelt. Demgegenüber wird eine spezifische Assoziation von *C. pneumoniae*-Infektionen mit der Pathogenese der Arteriosklerose in der Literatur diskutiert (siehe Kapitel 1.1.6.2). In-vivo sind jedoch die Chlamydieneffekte nur schwer von unkontrollierten Faktoren wie zum Beispiel dem Rauchen zu unterscheiden, da diese Bakterien über Jahrzehnte in den Zellen persistieren können. Studien mit Verwendung von Antibiotika sowie Impfungen sollten eine genauere Aussage über die Bedeutung von *C. pneumoniae* in der Pathogenese der Arteriosklerose in-vivo erzielen. Es wurden drei Placebo-kontrollierte Studien über die sekundäre Prävention von kardialen Ereignissen publiziert, welche sehr unterschiedliche, teils widersprüchliche Ergebnisse erbrachten (Gurfinkel et al., 1999; Muhlestein, 2002; Wells et al., 2004). Es ist jedoch zu bedenken, dass intrazellulär persistierende Chlamydien kaum von den bekannten Chlamydien-wirksamen Antibiotika (Makrolide, Tetracykline) erreicht werden (Gieffers et al., 2001). Daher führen Studien wie WIZARD oder PROVE-IT, welche die Bedeutung einer chlamydialen Infektion in der Arterioskleroseentstehung untersuchten, zu schwierig zu interpretierenden Ergebnissen (Muhlestein, 2002).

Insgesamt ist eine Beteiligung von Erregern in der Plaqueeentstehung jedoch schwierig zu untersuchen. In Tierexperimenten konnte gezeigt werden, dass Mäuse in keimfreier



Umgebung bezüglich der Arteriosklerose keine Unterschiede zu Mäusen in normaler Umwelt besitzen (Wright et al., 2000). Es wurde gezeigt, dass Apolipoprotein E-defiziente Mäuse hohe Spiegel an Plasmacholesterol besaßen und häufiger Arteriosklerose entwickelten, jedoch fehlte diesen Mäusen die Fähigkeit auf bakterielles LPS zu reagieren. Dies zeigt die Unabhängigkeit der bakteriellen Infektion in der Pathogenese der Arteriosklerose auf. Allerdings ist zu berücksichtigen, dass es sich um ein Tiermodell handelt und somit nicht der in-vivo-Situation im Menschen entsprechen muss.

Zusammengefasst ist es wahrscheinlich, dass in der initialen Entstehung einer Arteriosklerose Chlamydieninfektion eine wichtige Rolle spielt oder zumindest zu einer Exazerbation der Arteriosklerose beiträgt. Daher sind weitere Untersuchungen dieses Aspektes unbedingt erforderlich.

Zusätzlich zu den Infektionskrankheiten geben neue Veröffentlichungen Hinweise auf eine Beteiligung von angeborenen Abwehrmechanismen wie z.B. die TLRs in der Exazerbation oder möglicherweise auch Initiierung der Arteriosklerose. Dabei schien in ApoE- oder LDL-defizienten Mäusen die Bildung arteriosklerotischer Läsionen von funktionellem TLR4, TLR2 und MyD88 abhängig zu sein (Bjorkbacka, 2006; Michelsen et al., 2004; Mullick et al., 2005). Diese Ergebnisse unterstützen frühere Publikationen, welche eine vermehrte Expression einiger TLRs in arteriosklerotischen Läsionen nachwies (Edfeldt et al., 2002) und eine Assoziation von Polymorphismen in TLR-kodierenden Genen mit der Arteriosklerose beschrieben (Kiechl et al., 2002; Michelsen et al., 2004). Interessanterweise zeigte eine andere Studie eine verstärkte TLR2-Expression und -Aktivierung in Endothelzellen in Bereichen des gestörten Blutflusses, welche die typischen Prädilektionstellen arteriosklerotischer Läsionen darstellen (Dunzendorfer et al., 2004).

Insgesamt gibt es eindeutige Hinweise auf eine Beteiligung der TLRs in der Entwicklung der Arteriosklerose. Jedoch ist der exakte Ablauf und die Beteiligung von endogenen proarteriosklerotischen TLR-stimulierenden Faktoren, die Involvierung weiterer Rezeptoren, die Rolle von Erregern wie z.B. *Chlamydomphila pneumoniae* sowie die Beteiligung unterschiedlicher Zelltypen wie Endothelzellen, klassische Immunzellen oder Thrombozyten nicht ganz verstanden.

Eine Involvierung von Nod1 oder Nod2 als intrazelluläre, funktionell den TLRs verwandte Proteine wäre in der Pathogenese der Arteriosklerose ebenso denkbar. Da C.

*pneumoniae* inflammatorische Reaktionen in Endothelzellen über Nod1 verursacht, könnte eine Nod1-Aktivierung zur Pathogenese der Arteriosklerose beitragen.

Jedoch bleibt die Frage, ob eine Nod1- bzw. Nod2-Aktivierung durch *C. pneumoniae* möglicherweise direkt in der Pathogenese der Arteriosklerose eine Rolle spielt oder dieser Erreger nur einen unbeteiligten "Zuschauer" darstellt, weiter zu klären.

#### 4.5 Schlussfolgerung und Ausblick

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass grundsätzlich sowohl Nod1 als auch Nod2 an der Erkennung von Chlamydien durch das angeborene Immunsystem beteiligt sein können. Da in Endothelzellen vorrangig Nod1, nicht aber Nod2 exprimiert wird, scheint in diesen Zellen insbesondere Nod1 wichtig für die intrazelluläre Erkennung von *C. pneumoniae* und der nachfolgenden IL-8-Produktion zu sein. In anderen Zelltypen sind möglicherweise sowohl Nod1 als auch Nod2 an der Detektion von Chlamydien beteiligt. Diese Hypothese sollte zukünftig in vitro in weiteren Zellarten geprüft werden. Zusätzlich wären Chlamydieninfektionsversuche in Nod1- und Nod2-knockout-Mäusen wünschenswert, um die Bedeutung dieser intrazellulären PRRs in der Infektion in vivo zu testen.

Die in dieser Dissertationsarbeit gezeigte Involvierung von IRAK1, IRAK2 und TRAF6 im Nod1- bzw. Nod2-Signalweg könnte auf eine mögliche Verbindung zwischen dem NLR- und dem TLR-Signalweg hinweisen. Dabei spielen eventuell TAK-1 und MKK6 als Kinasen "downstream" von TRAF6 im TLR- und Nod1/Nod2-Signalweg eventuell eine Rolle. Diese Verbindung könnte möglicherweise auch eine Erklärung für die kürzlich gezeigten synergistischen Zellaktivierungen durch Nod1/2- und TLR-Stimulationen liefern. Bedenkt man die inzwischen nahezu zweifelsfrei belegte Beteiligung der TLRs an der Pathogenese der Arteriosklerose sowie die mögliche Bedeutung von *C. pneumoniae* für die Arterioskleroseentstehung, ist auch eine Involvierung von Nod1 bzw. Nod2 hierbei denkbar. Diese Überlegungen könnten möglicherweise zum Einen vor dem Hintergrund der vielfältigen Polymorphismen in NLR-Genen und deren Bedeutung für verschiedenste (inflammatorische) Erkrankungen und zum Anderen langfristig für die Etablierung neuer Therapiestrategien zur Verhinderung oder Sekundärprävention kardiovaskulärer Erkrankungen von Interesse sein.

## 5 Literaturverzeichnis

- Adachi, O., et al. (1998): Targeted disruption of the MyD88 gene results in loss of IL-1- and IL-18-mediated function, *Immunity* (Band 9), Nr. 1, Seite 143-50. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=9697844](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9697844)
- Airenne, S., et al. (2002): Chlamydia pneumoniae inhibits apoptosis in human epithelial and monocyte cell lines, *Scand J Immunol* (Band 55), Nr. 4, Seite 390-8. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=11967121](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11967121)
- Akira, S., et al. (2001): Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity, *Nat Immunol* (Band 2), Nr. 8, Seite 675-80. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=11477402](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11477402)
- Akira, S., et al. (2006): Pathogen recognition and innate immunity, *Cell* (Band 124), Nr. 4, Seite 783-801. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=16497588](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16497588)
- Aldous, M. B., et al. (1992): Seroepidemiology of Chlamydia pneumoniae TWAR infection in Seattle families, 1966-1979, *J Infect Dis* (Band 166), Nr. 3, Seite 646-9. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=1500751](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=1500751)
- Alexopoulou, L., et al. (2001): Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-kappaB by Toll-like receptor 3, *Nature* (Band 413), Nr. 6857, Seite 732-8. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=11607032](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11607032)
- Anderson, K. V., et al. (1985): Establishment of dorsal-ventral polarity in the Drosophila embryo: the induction of polarity by the Toll gene product, *Cell* (Band 42), Nr. 3, Seite 791-8. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=3931919](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=3931919)
- Andrejeva, J., et al. (2004): The V proteins of paramyxoviruses bind the IFN-inducible RNA helicase, mda-5, and inhibit its activation of the IFN-beta promoter, *Proc Natl Acad Sci U S A* (Band 101), Nr. 49, Seite 17264-9. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=15563593](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15563593)
- Baldwin, A. S., Jr. (2001): Series introduction: the transcription factor NF-kappaB and human disease, *J Clin Invest* (Band 107), Nr. 1, Seite 3-6. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=11134170](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11134170)
- Barnich, N., et al. (2005a): Membrane recruitment of NOD2 in intestinal epithelial cells is essential for nuclear factor- $\kappa$ B activation in muramyl dipeptide recognition, *J Cell Biol* (Band 170), Nr. 1, Seite 21-6. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=15998797](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15998797)
- Barnich, N., et al. (2005b): GRIM-19 interacts with nucleotide oligomerization domain 2 and serves as downstream effector of anti-bacterial function in intestinal epithelial cells, *J Biol Chem* (Band 280), Nr. 19, Seite 19021-6. URL:

- [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=15753091](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15753091)
- Basset, C., et al. (2003): Innate immunity and pathogen-host interaction, *Vaccine* (Band 21 Suppl 2), Seite S12-23. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=12763678](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12763678)
- Bertin, J., et al. (1999): Human CARD4 protein is a novel CED-4/Apaf-1 cell death family member that activates NF-kappaB, *J Biol Chem* (Band 274), Nr. 19, Seite 12955-8. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=10224040](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10224040)
- Bertin, J., et al. (2000): The PYRIN domain: a novel motif found in apoptosis and inflammation proteins, *Cell Death Differ* (Band 7), Nr. 12, Seite 1273-4. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=11270363](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11270363)
- Bjorkbacka, H. (2006): Multiple roles of Toll-like receptor signaling in atherosclerosis, *Curr Opin Lipidol* (Band 17), Nr. 5, Seite 527-33. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=16960501](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16960501)
- Blasi, F., et al. (2002): Chlamydia pneumoniae and chronic bronchitis: association with severity and bacterial clearance following treatment, *Thorax* (Band 57), Nr. 8, Seite 672-6. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=12149525](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12149525)
- Boneca, I. G. (2005): The role of peptidoglycan in pathogenesis, *Curr Opin Microbiol* (Band 8), Nr. 1, Seite 46-53. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=15694856](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15694856)
- Bonen, D. K., et al. (2003): Crohn's disease-associated NOD2 variants share a signaling defect in response to lipopolysaccharide and peptidoglycan, *Gastroenterology* (Band 124), Nr. 1, Seite 140-6. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=12512038](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12512038)
- Bouis, D., et al. (2001): Endothelium in vitro: a review of human vascular endothelial cell lines for blood vessel-related research, *Angiogenesis* (Band 4), Nr. 2, Seite 91-102. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=11806248](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11806248)
- Chamaillard, M., et al. (2003a): An essential role for NOD1 in host recognition of bacterial peptidoglycan containing diaminopimelic acid, *Nat Immunol* (Band 4), Nr. 7, Seite 702-7. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=12796777](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12796777)
- Chamaillard, M., et al. (2003b): Gene-environment interaction modulated by allelic heterogeneity in inflammatory diseases, *Proc Natl Acad Sci U S A* (Band 100), Nr. 6, Seite 3455-60. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=12626759](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12626759)
- Chen, C. M., et al. (2004): Reciprocal cross-talk between Nod2 and TAK1 signaling pathways, *J Biol Chem* (Band 279), Nr. 24, Seite 25876-82. URL:

- [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=15075345](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15075345)
- Chin, A. I., et al. (2002): Involvement of receptor-interacting protein 2 in innate and adaptive immune responses, *Nature* (Band 416), Nr. 6877, Seite 190-4. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=11894097](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11894097)
- Clements, P., et al. (2002): Chlamydia pneumoniae infection and its role in asthma and chronic obstructive pulmonary disease, *J Invest Allergol Clin Immunol* (Band 12), Nr. 2, Seite 73-9. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=12371533](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12371533)
- Clifton, D. R., et al. (2004): A chlamydial type III translocated protein is tyrosine-phosphorylated at the site of entry and associated with recruitment of actin, *Proc Natl Acad Sci U S A* (Band 101), Nr. 27, Seite 10166-71. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=15199184](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15199184)
- Cunningham, A. F., et al. (2003): Characterization of human humoral responses to the major outer membrane protein and OMP2 of Chlamydia pneumoniae, *FEMS Microbiol Lett* (Band 227), Nr. 1, Seite 73-9. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=14568150](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=14568150)
- Dangl, J. L., et al. (2001): Plant pathogens and integrated defence responses to infection, *Nature* (Band 411), Nr. 6839, Seite 826-33. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=11459065](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11459065)
- Dautry-Varsat, A., et al. (2005): Recent insights into the mechanisms of Chlamydia entry, *Cell Microbiol* (Band 7), Nr. 12, Seite 1714-22. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=16309458](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16309458)
- Derbigny, W. A., et al. (2005): Pattern recognition molecules activated by Chlamydia muridarum infection of cloned murine oviduct epithelial cell lines, *J Immunol* (Band 175), Nr. 9, Seite 6065-75. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=16237102](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16237102)
- Doherty, T. M., et al. (2006): TLR signaling and trapped vascular dendritic cells in the development of atherosclerosis, *Trends Immunol* (Band 27), Nr. 5, Seite 222-7. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=16580258](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16580258)
- Dunzendorfer, S., et al. (2004): Flow-dependent regulation of endothelial Toll-like receptor 2 expression through inhibition of SP1 activity, *Circ Res* (Band 95), Nr. 7, Seite 684-91. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=15345653](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15345653)
- Edfeldt, K., et al. (2002): Expression of toll-like receptors in human atherosclerotic lesions: a possible pathway for plaque activation, *Circulation* (Band 105), Nr. 10, Seite 1158-61. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=11889007](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11889007)
- Eisenberg, L. G., et al. (1983): Chlamydia psittaci elementary body envelopes: ingestion and inhibition of phagolysosome fusion, *Infect Immun* (Band 40), Nr.

- 2, Seite 741-51. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=6840860](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=6840860)
- Esper, R. J., et al. (2006): Endothelial dysfunction: a comprehensive appraisal, *Cardiovasc Diabetol* (Band 5), Seite 4. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=16504104](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16504104)
- Faure, E., et al. (2000): Bacterial lipopolysaccharide activates NF-kappaB through toll-like receptor 4 (TLR-4) in cultured human dermal endothelial cells. Differential expression of TLR-4 and TLR-2 in endothelial cells, *J Biol Chem* (Band 275), Nr. 15, Seite 11058-63. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=10753909](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10753909)
- Fitzgerald, K. A., et al. (2001): Mal (MyD88-adaptor-like) is required for Toll-like receptor-4 signal transduction, *Nature* (Band 413), Nr. 6851, Seite 78-83. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=11544529](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11544529)
- Gay, N. J., et al. (1991): Drosophila Toll and IL-1 receptor, *Nature* (Band 351), Nr. 6325, Seite 355-6. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=1851964](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=1851964)
- Gibellini, D., et al. (1998): Induction of apoptosis by Chlamydia psittaci and Chlamydia trachomatis infection in tissue culture cells, *Zentralbl Bakteriol* (Band 288), Nr. 1, Seite 35-43. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=9728403](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9728403)
- Gieffers, J., et al. (2001): Chlamydia pneumoniae infection in circulating human monocytes is refractory to antibiotic treatment, *Circulation* (Band 103), Nr. 3, Seite 351-6. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=11157684](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11157684)
- Girardin, S. E., et al. (2001): CARD4/Nod1 mediates NF-kappaB and JNK activation by invasive Shigella flexneri, *EMBO Rep* (Band 2), Nr. 8, Seite 736-42. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=11463746](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11463746)
- Girardin, S. E., et al. (2003a): Nod1 detects a unique muropeptide from gram-negative bacterial peptidoglycan, *Science* (Band 300), Nr. 5625, Seite 1584-7. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=12791997](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12791997)
- Girardin, S. E., et al. (2003b): Nod2 is a general sensor of peptidoglycan through muramyl dipeptide (MDP) detection, *J Biol Chem* (Band 278), Nr. 11, Seite 8869-72. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=12527755](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12527755)
- Grayston, J. T., et al. (1986): A new Chlamydia psittaci strain, TWAR, isolated in acute respiratory tract infections, *N Engl J Med* (Band 315), Nr. 3, Seite 161-8. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=3724806](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=3724806)
- Gurfinkel, E., et al. (1999): Treatment with the antibiotic roxithromycin in patients with acute non-Q-wave coronary syndromes. The final report of the ROXIS Study, *Eur Heart J* (Band 20), Nr. 2, Seite 121-7. URL:

- [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=10099908](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10099908)
- Gutierrez, O., et al. (2002): Induction of Nod2 in myelomonocytic and intestinal epithelial cells via nuclear factor-kappa B activation, *J Biol Chem* (Band 277), Nr. 44, Seite 41701-5. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=12194982](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12194982)
- Harton, J. A., et al. (2002): Cutting edge: CATERPILLER: a large family of mammalian genes containing CARD, pyrin, nucleotide-binding, and leucine-rich repeat domains, *J Immunol* (Band 169), Nr. 8, Seite 4088-93. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=12370334](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12370334)
- Hayashi, F., et al. (2001): The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll-like receptor 5, *Nature* (Band 410), Nr. 6832, Seite 1099-103. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=11323673](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11323673)
- Hemmi, H., et al. (2000): A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA, *Nature* (Band 408), Nr. 6813, Seite 740-5. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=11130078](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11130078)
- Hemmi, H., et al. (2002): Small anti-viral compounds activate immune cells via the TLR7 MyD88-dependent signaling pathway, *Nat Immunol* (Band 3), Nr. 2, Seite 196-200. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=11812998](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11812998)
- Hesse, L., et al. (2003): Functional and biochemical analysis of Chlamydia trachomatis MurC, an enzyme displaying UDP-N-acetylmuramate:amino acid ligase activity, *J Bacteriol* (Band 185), Nr. 22, Seite 6507-12. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=14594822](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=14594822)
- Hisamatsu, T., et al. (2003): CARD15/NOD2 functions as an antibacterial factor in human intestinal epithelial cells, *Gastroenterology* (Band 124), Nr. 4, Seite 993-1000. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=12671896](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12671896)
- Hofmann, K., et al. (1997): The CARD domain: a new apoptotic signalling motif, *Trends Biochem Sci* (Band 22), Nr. 5, Seite 155-6. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=9175472](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9175472)
- Hornig, T., et al. (2001): TIRAP: an adapter molecule in the Toll signaling pathway, *Nat Immunol* (Band 2), Nr. 9, Seite 835-41. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=11526399](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11526399)
- Huang, Y. S., et al. (2005): Novel role and regulation of the interleukin-1 receptor associated kinase (IRAK) family proteins, *Cell Mol Immunol* (Band 2), Nr. 1, Seite 36-9. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=16212909](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16212909)
- Hugot, J. P., et al. (2001): Association of NOD2 leucine-rich repeat variants with susceptibility to Crohn's disease, *Nature* (Band 411), Nr. 6837, Seite 599-603. URL:



- [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=11385576](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11385576)
- Hysi, P., et al. (2005): NOD1 variation, immunoglobulin E and asthma, *Hum Mol Genet* (Band 14), Nr. 7, Seite 935-41. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=15718249](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15718249)
- Inohara, N., et al. (1999): Nod1, an Apaf-1-like activator of caspase-9 and nuclear factor-kappaB, *J Biol Chem* (Band 274), Nr. 21, Seite 14560-7. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=10329646](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10329646)
- Inohara, N., et al. (2000): An induced proximity model for NF-kappa B activation in the Nod1/RICK and RIP signaling pathways, *J Biol Chem* (Band 275), Nr. 36, Seite 27823-31. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=10880512](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10880512)
- Inohara, N., et al. (2001): Human Nod1 confers responsiveness to bacterial lipopolysaccharides, *J Biol Chem* (Band 276), Nr. 4, Seite 2551-4. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=11058605](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11058605)
- Inohara, N., et al. (2003a): NODs: intracellular proteins involved in inflammation and apoptosis, *Nat Rev Immunol* (Band 3), Nr. 5, Seite 371-82. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=12766759](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12766759)
- Inohara, N., et al. (2003b): Host recognition of bacterial muramyl dipeptide mediated through NOD2. Implications for Crohn's disease, *J Biol Chem* (Band 278), Nr. 8, Seite 5509-12. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=12514169](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12514169)
- Inohara, N., et al. (2004): NOD-LRR Proteins: Role in Host-Microbial Interactions and Inflammatory Disease, *Annu Rev Biochem*. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=15725060](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15725060)
- Jaffe, E. A., et al. (1973): Culture of human endothelial cells derived from umbilical veins. Identification by morphologic and immunologic criteria, *J Clin Invest* (Band 52), Nr. 11, Seite 2745-56. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=4355998](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=4355998)
- Janeway, C. A., Jr., et al. (2002): Innate immune recognition, *Annu Rev Immunol* (Band 20), Seite 197-216. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=11861602](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11861602)
- Janeway, Charles A., et al. (2004): *Immunobiology. The Immune System*, Elsevier.
- Johannsen, L., et al. (1991): Macrophages produce somnogenic and pyrogenic muramyl peptides during digestion of staphylococci, *Am J Physiol* (Band 260), Nr. 1 Pt 2, Seite R126-33. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=1992813](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=1992813)
- Kalman, S., et al. (1999): Comparative genomes of *Chlamydia pneumoniae* and *C. trachomatis*, *Nat Genet* (Band 21), Nr. 4, Seite 385-9. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=10192388](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10192388)

- Kaukoranta-Tolvanen, S. S., et al. (1996): Expression of adhesion molecules on endothelial cells stimulated by Chlamydia pneumoniae, Microb Pathog (Band 21), Nr. 5, Seite 407-11. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=8938646](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8938646)
- Khush, R. S., et al. (2001): Drosophila immunity: two paths to NF-kappaB, Trends Immunol (Band 22), Nr. 5, Seite 260-4. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=11323284](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11323284)
- Kiechl, S., et al. (2002): Toll-like receptor 4 polymorphisms and atherogenesis, N Engl J Med (Band 347), Nr. 3, Seite 185-92. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=12124407](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12124407)
- Kirschning, C. J., et al. (1998): Human toll-like receptor 2 confers responsiveness to bacterial lipopolysaccharide, J Exp Med (Band 188), Nr. 11, Seite 2091-7. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=9841923](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9841923)
- Kobayashi, K., et al. (2002): RICK/Rip2/CARDIAK mediates signalling for receptors of the innate and adaptive immune systems, Nature (Band 416), Nr. 6877, Seite 194-9. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=11894098](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11894098)
- Kobayashi, K. S., et al. (2005): Nod2-dependent regulation of innate and adaptive immunity in the intestinal tract, Science (Band 307), Nr. 5710, Seite 731-4. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=15692051](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15692051)
- Kobe, B., et al. (2001): The leucine-rich repeat as a protein recognition motif, Curr Opin Struct Biol (Band 11), Nr. 6, Seite 725-32. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=11751054](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11751054)
- Kol, A., et al. (1998): Chlamydial heat shock protein 60 localizes in human atheroma and regulates macrophage tumor necrosis factor-alpha and matrix metalloproteinase expression, Circulation (Band 98), Nr. 4, Seite 300-7. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=9711934](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9711934)
- Kol, A., et al. (1999): Chlamydial and human heat shock protein 60s activate human vascular endothelium, smooth muscle cells, and macrophages, J Clin Invest (Band 103), Nr. 4, Seite 571-7. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=10021466](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10021466)
- Krull, M., et al. (1999): Signal transduction pathways activated in endothelial cells following infection with Chlamydia pneumoniae, J Immunol (Band 162), Nr. 8, Seite 4834-41. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=10202027](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10202027)
- Krull, M., et al. (2004): Differences in cell activation by Chlamydia pneumoniae and Chlamydia trachomatis infection in human endothelial cells, Infect Immun (Band 72), Nr. 11, Seite 6615-21. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=15501794](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15501794)

- Krull, M., et al. (2005): Chlamydomydia pneumoniae. Mechanisms of target cell infection and activation, Thromb Haemost (Band 94), Nr. 2, Seite 319-26. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=16113821](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16113821)
- Kuo, C. C., et al. (1993): Demonstration of Chlamydia pneumoniae in atherosclerotic lesions of coronary arteries, J Infect Dis (Band 167), Nr. 4, Seite 841-9. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=8450249](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8450249)
- Kuo, C. C., et al. (1995): Chlamydia pneumoniae (TWAR), Clin Microbiol Rev (Band 8), Nr. 4, Seite 451-61. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=8665464](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8665464)
- Laurila, A. L., et al. (1997): Chlamydia pneumoniae and chronic lung diseases, Scand J Infect Dis Suppl (Band 104), Seite 34-6. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=9259079](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9259079)
- Lemaitre, B., et al. (1996): The dorsoventral regulatory gene cassette spatzle/Toll/cactus controls the potent antifungal response in Drosophila adults, Cell (Band 86), Nr. 6, Seite 973-83. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=8808632](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8808632)
- Li, J., et al. (2004): Regulation of IL-8 and IL-1beta expression in Crohn's disease associated NOD2/CARD15 mutations, Hum Mol Genet (Band 13), Nr. 16, Seite 1715-25. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=15198989](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15198989)
- Li, P., et al. (1997): Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade, Cell (Band 91), Nr. 4, Seite 479-89. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=9390557](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9390557)
- Libby, P. (1995): Molecular bases of the acute coronary syndromes, Circulation (Band 91), Nr. 11, Seite 2844-50. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=7758192](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=7758192)
- Libby, P., et al. (1997): Roles of infectious agents in atherosclerosis and restenosis: an assessment of the evidence and need for future research, Circulation (Band 96), Nr. 11, Seite 4095-103. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=9403635](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9403635)
- Liu, C., et al. (2001): Peptidoglycan recognition proteins: a novel family of four human innate immunity pattern recognition molecules, J Biol Chem (Band 276), Nr. 37, Seite 34686-94. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=11461926](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11461926)
- Maass, M., et al. (1993): Growth in serum-free medium improves isolation of Chlamydia pneumoniae, J Clin Microbiol (Band 31), Nr. 11, Seite 3050-2. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=8263198](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8263198)
- Maeda, S., et al. (2005): Nod2 mutation in Crohn's disease potentiates NF-kappaB activity and IL-1beta processing, Science (Band 307), Nr. 5710, Seite 734-8.

- URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=15692052](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15692052)
- McCarthy, J. V., et al. (1998): RIP2 is a novel NF-kappaB-activating and cell death-inducing kinase, *J Biol Chem* (Band 273), Nr. 27, Seite 16968-75. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=9642260](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9642260)
- McCoy, A. J., et al. (2006): L,L-diaminopimelate aminotransferase, a trans-kingdom enzyme shared by Chlamydia and plants for synthesis of diaminopimelate/lysine, *Proc Natl Acad Sci U S A* (Band 103), Nr. 47, Seite 17909-14. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=17093042](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17093042)
- McGovern, D. P., et al. (2005): Association between a complex insertion/deletion polymorphism in NOD1 (CARD4) and susceptibility to inflammatory bowel disease, *Hum Mol Genet* (Band 14), Nr. 10, Seite 1245-50. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=15790594](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15790594)
- Medzhitov, R., et al. (2000): The Toll receptor family and microbial recognition, *Trends Microbiol* (Band 8), Nr. 10, Seite 452-6. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=11044679](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11044679)
- Medzhitov, R. (2001): Toll-like receptors and innate immunity, *Nat Rev Immunol* (Band 1), Nr. 2, Seite 135-45. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=11905821](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11905821)
- Meylan, E., et al. (2006): Intracellular pattern recognition receptors in the host response, *Nature* (Band 442), Nr. 7098, Seite 39-44. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=16823444](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16823444)
- Michelsen, K. S., et al. (2004): Lack of Toll-like receptor 4 or myeloid differentiation factor 88 reduces atherosclerosis and alters plaque phenotype in mice deficient in apolipoprotein E, *Proc Natl Acad Sci U S A* (Band 101), Nr. 29, Seite 10679-84. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=15249654](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15249654)
- Moulder, J. W. (1993): Why is Chlamydia sensitive to penicillin in the absence of peptidoglycan?, *Infect Agents Dis* (Band 2), Nr. 2, Seite 87-99. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=8162358](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8162358)
- Muhlestein, J. B., et al. (1998): Infection with Chlamydia pneumoniae accelerates the development of atherosclerosis and treatment with azithromycin prevents it in a rabbit model, *Circulation* (Band 97), Nr. 7, Seite 633-6. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=9495296](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9495296)
- Muhlestein, J. B. (2002): Secondary prevention of coronary artery disease with antimicrobials: current status and future directions, *Am J Cardiovasc Drugs* (Band 2), Nr. 2, Seite 107-18. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=14727986](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=14727986)

- Mullick, A. E., et al. (2005): Modulation of atherosclerosis in mice by Toll-like receptor 2, *J Clin Invest* (Band 115), Nr. 11, Seite 3149-56. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=16211093](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16211093)
- Muzio, M., et al. (1997): IRAK (Pelle) family member IRAK-2 and MyD88 as proximal mediators of IL-1 signaling, *Science* (Band 278), Nr. 5343, Seite 1612-5. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=9374458](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9374458)
- Netea, M. G., et al. (2002): Non-LPS components of *Chlamydia pneumoniae* stimulate cytokine production through Toll-like receptor 2-dependent pathways, *Eur J Immunol* (Band 32), Nr. 4, Seite 1188-95. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=11932927](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11932927)
- Netea, M. G., et al. (2004): NOD2 mediates anti-inflammatory signals induced by TLR2 ligands: implications for Crohn's disease, *Eur J Immunol* (Band 34), Nr. 7, Seite 2052-9. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=15214053](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15214053)
- Netea, M. G., et al. (2005): The frameshift mutation in Nod2 results in unresponsiveness not only to Nod2- but also Nod1-activating peptidoglycan agonists, *J Biol Chem*. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=16115863](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16115863)
- Ogura, Y. (2001): Nod2, a Nod1/Apaf-1 family member that is restricted to monocytes and activates NF-kappaB, *J Biol Chem* (Band 276), Nr. 7, Seite 4812-8. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=11087742](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11087742)
- Ogura, Y., et al. (2001a): A frameshift mutation in NOD2 associated with susceptibility to Crohn's disease, *Nature* (Band 411), Nr. 6837, Seite 603-6. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=11385577](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11385577)
- Ogura, Y., et al. (2001b): Nod2, a Nod1/Apaf-1 family member that is restricted to monocytes and activates NF-kappaB, *J Biol Chem* (Band 276), Nr. 7, Seite 4812-8. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=11087742](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11087742)
- O'Neill, L. A., et al. (2007): The family of five: TIR-domain-containing adaptors in Toll-like receptor signalling, *Nat Rev Immunol* (Band 7), Nr. 5, Seite 353-64. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=17457343](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17457343)
- Opitz, B., et al. (2001): Toll-like receptor-2 mediates *Treponema glycolipid* and lipoteichoic acid-induced NF-kappaB translocation, *J Biol Chem* (Band 276), Nr. 25, Seite 22041-7. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=11285258](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11285258)
- Pahl, H. L. (1999): Activators and target genes of Rel/NF-kappaB transcription factors, *Oncogene* (Band 18), Nr. 49, Seite 6853-66. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=10602461](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10602461)



- Pande, V., et al. (2005): NF-kappaB in human disease: current inhibitors and prospects for de novo structure based design of inhibitors, *Curr Med Chem* (Band 12), Nr. 3, Seite 357-74. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=15723624](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15723624)
- Perfettini, J. L., et al. (2003): Cell death and inflammation during infection with the obligate intracellular pathogen, *Chlamydia*, *Biochimie* (Band 85), Nr. 8, Seite 763-9. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=14585543](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=14585543)
- Philpott, D. J., et al. (2004): The role of Toll-like receptors and Nod proteins in bacterial infection, *Mol Immunol* (Band 41), Nr. 11, Seite 1099-108. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=15476921](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15476921)
- Poltorak, A., et al. (1998): Genetic and physical mapping of the Lps locus: identification of the toll-4 receptor as a candidate gene in the critical region, *Blood Cells Mol Dis* (Band 24), Nr. 3, Seite 340-55. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=10087992](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10087992)
- Prebeck, S., et al. (2001): Predominant role of toll-like receptor 2 versus 4 in *Chlamydia pneumoniae*-induced activation of dendritic cells, *J Immunol* (Band 167), Nr. 6, Seite 3316-23. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=11544320](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11544320)
- Puolakkainen, M., et al. (2005): *Chlamydia pneumoniae* uses the mannose 6-phosphate/insulin-like growth factor 2 receptor for infection of endothelial cells, *Infect Immun* (Band 73), Nr. 8, Seite 4620-5. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=16040974](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16040974)
- Qian, Y., et al. (2001): IRAK-mediated translocation of TRAF6 and TAB2 in the interleukin-1-induced activation of NFkappa B, *J Biol Chem* (Band 276), Nr. 45, Seite 41661-7. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=11518704](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11518704)
- Rasmussen, S. J., et al. (1997): Secretion of proinflammatory cytokines by epithelial cells in response to *Chlamydia* infection suggests a central role for epithelial cells in chlamydial pathogenesis, *J Clin Invest* (Band 99), Nr. 1, Seite 77-87. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=9011579](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9011579)
- Rothfuchs, A. G., et al. (2004): Intracellular bacterial infection-induced IFN-gamma is critically but not solely dependent on Toll-like receptor 4-myeloid differentiation factor 88-IFN-alpha beta-STAT1 signaling, *J Immunol* (Band 172), Nr. 10, Seite 6345-53. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=15128825](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15128825)
- Sasu, S., et al. (2001): *Chlamydia pneumoniae* and chlamydial heat shock protein 60 stimulate proliferation of human vascular smooth muscle cells via toll-like receptor 4 and p44/p42 mitogen-activated protein kinase activation, *Circ Res* (Band 89), Nr. 3, Seite 244-50. URL:

- [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=11485974](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11485974)
- Schumann, R. R., et al. (1990): Structure and function of lipopolysaccharide binding protein, *Science* (Band 249), Nr. 4975, Seite 1429-31. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=2402637](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=2402637)
- Skipp, P., et al. (2005): Shotgun proteomic analysis of *Chlamydia trachomatis*, *Proteomics* (Band 5), Nr. 6, Seite 1558-73. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=15838905](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15838905)
- Strober, W., et al. (2006): Signalling pathways and molecular interactions of NOD1 and NOD2, *Nat Rev Immunol* (Band 6), Nr. 1, Seite 9-20. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=16493424](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16493424)
- Subtil, A., et al. (2000): Type III secretion system in *Chlamydia* species: identified members and candidates, *Microbes Infect* (Band 2), Nr. 4, Seite 367-9. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=10817638](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10817638)
- Swanson, A. F., et al. (1998): Human mannose-binding protein inhibits infection of HeLa cells by *Chlamydia trachomatis*, *Infect Immun* (Band 66), Nr. 4, Seite 1607-12. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=9529088](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9529088)
- Takeda, K., et al. (2003): Toll-like receptors, *Annu Rev Immunol* (Band 21), Seite 335-76. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=12524386](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12524386)
- Takeda, K., et al. (2004): TLR signaling pathways, *Semin Immunol* (Band 16), Nr. 1, Seite 3-9. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=14751757](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=14751757)
- Takeuchi, O., et al. (2001): Discrimination of bacterial lipoproteins by Toll-like receptor 6, *Int Immunol* (Band 13), Nr. 7, Seite 933-40. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=11431423](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11431423)
- Takeuchi, O., et al. (2002): Cutting edge: role of Toll-like receptor 1 in mediating immune response to microbial lipoproteins, *J Immunol* (Band 169), Nr. 1, Seite 10-4. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=12077222](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12077222)
- Thome, M., et al. (1998): Identification of CARDIAK, a RIP-like kinase that associates with caspase-1, *Curr Biol* (Band 8), Nr. 15, Seite 885-8. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=9705938](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9705938)
- Ting, J. P., et al. (2005): CATERPILLER: a novel gene family important in immunity, cell death, and diseases, *Annu Rev Immunol* (Band 23), Seite 387-414. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=15771576](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15771576)
- Traub, S., et al. (2004): Structural requirements of synthetic mucopeptides to synergize with lipopolysaccharide in cytokine induction, *J Biol Chem* (Band 279), Nr. 10, Seite 8694-700. URL:

- [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=14668350](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=14668350)
- Travassos, L. H., et al. (2004): Toll-like receptor 2-dependent bacterial sensing does not occur via peptidoglycan recognition, *EMBO Rep* (Band 5), Nr. 10, Seite 1000-6. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=15359270](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15359270)
- Travassos, L. H., et al. (2005): Nod1 participates in the innate immune response to *Pseudomonas aeruginosa*, *J Biol Chem*. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=16150702](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16150702)
- Tschopp, J., et al. (2003): NALPs: a novel protein family involved in inflammation, *Nat Rev Mol Cell Biol* (Band 4), Nr. 2, Seite 95-104. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=12563287](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12563287)
- Tuschl, T., et al. (2002): Small interfering RNAs: a revolutionary tool for the analysis of gene function and gene therapy, *Mol Interv* (Band 2), Nr. 3, Seite 158-67. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=14993376](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=14993376)
- Uehara, A., et al. (2005): Muramyl dipeptide and diaminopimelic acid-containing desmuramylpeptides in combination with chemically synthesized Toll-like receptor agonists synergistically induced production of interleukin-8 in a NOD2- and NOD1-dependent manner, respectively, in human monocytic cells in culture, *Cell Microbiol* (Band 7), Nr. 1, Seite 53-61. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=15617523](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15617523)
- van Heel, D. A., et al. (2003): The IBD6 Crohn's disease locus demonstrates complex interactions with CARD15 and IBD5 disease-associated variants, *Hum Mol Genet* (Band 12), Nr. 20, Seite 2569-75. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=12928481](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12928481)
- van Heel, D. A., et al. (2005a): Muramyl dipeptide and toll-like receptor sensitivity in NOD2-associated Crohn's disease, *Lancet* (Band 365), Nr. 9473, Seite 1794-6. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=15910952](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15910952)
- van Heel, D. A., et al. (2005b): Synergistic enhancement of Toll-like receptor responses by NOD1 activation, *Eur J Immunol* (Band 35), Nr. 8, Seite 2471-6. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=16021603](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16021603)
- Viala, J., et al. (2004): Nod1 responds to peptidoglycan delivered by the *Helicobacter pylori* cag pathogenicity island, *Nat Immunol* (Band 5), Nr. 11, Seite 1166-74. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=15489856](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15489856)
- Watanabe, T., et al. (2004): NOD2 is a negative regulator of Toll-like receptor 2-mediated T helper type 1 responses, *Nat Immunol* (Band 5), Nr. 8, Seite 800-8. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=15220916](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15220916)



- Weidinger, S., et al. (2005): Association of NOD1 polymorphisms with atopic eczema and related phenotypes, *J Allergy Clin Immunol* (Band 116), Nr. 1, Seite 177-84. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=15990792](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15990792)
- Wellinghausen, N., et al. (2006): Low prevalence of Chlamydia pneumoniae in adults with community-acquired pneumonia, *Int J Med Microbiol* (Band 296), Nr. 7, Seite 485-91. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=16890487](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16890487)
- Wells, B. J., et al. (2004): Antibiotics for the secondary prevention of ischemic heart disease: a meta-analysis of randomized controlled trials, *Arch Intern Med* (Band 164), Nr. 19, Seite 2156-61. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=15505130](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15505130)
- Welte, T., et al. (2006): [What is new in the treatment of community-acquired pneumonia?], *Med Klin (Munich)* (Band 101), Nr. 4, Seite 313-20. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=16607488](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16607488)
- Welter-Stahl, L., et al. (2006): Stimulation of the cytosolic receptor for peptidoglycan, Nod1, by infection with Chlamydia trachomatis or Chlamydia muridarum, *Cell Microbiol* (Band 8), Nr. 6, Seite 1047-57. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=16681844](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16681844)
- Wesche, H., et al. (1997): MyD88: an adapter that recruits IRAK to the IL-1 receptor complex, *Immunity* (Band 7), Nr. 6, Seite 837-47. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=9430229](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9430229)
- Wesche, H., et al. (1999): IRAK-M is a novel member of the Pelle/interleukin-1 receptor-associated kinase (IRAK) family, *J Biol Chem* (Band 274), Nr. 27, Seite 19403-10. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=10383454](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10383454)
- Wright, S. D., et al. (2000): Infectious agents are not necessary for murine atherogenesis, *J Exp Med* (Band 191), Nr. 8, Seite 1437-42. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=10770809](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10770809)
- Wuppermann, F. N., et al. (2001): Heparan sulfate-like glycosaminoglycan is a cellular receptor for Chlamydia pneumoniae, *J Infect Dis* (Band 184), Nr. 2, Seite 181-7. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=11424015](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11424015)
- Yang, S., et al. (2001): Synergistic effect of muramyl dipeptide with lipopolysaccharide or lipoteichoic acid to induce inflammatory cytokines in human monocytic cells in culture, *Infect Immun* (Band 69), Nr. 4, Seite 2045-53. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=11254557](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11254557)
- Yoo, N. J., et al. (2002): Nod1, a CARD protein, enhances pro-interleukin-1 $\beta$  processing through the interaction with pro-caspase-1, *Biochem Biophys Res Commun* (Band 299), Nr. 4, Seite 652-8. URL:

[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=12459189](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12459189)

## 6 Anhang

### 6.1 Veröffentlichungen

#### 6.1.1 Originalarbeiten

Opitz B., Förster S., Hocke A.C., Maass M., Schmeck B., Hippenstiel S., Suttorp N., Krüll M. (2005): Nod1-Mediated Endothelial Cell Activation by *Chlamydomphila pneumoniae*, *Circ Res.* (96), 319-326

Opitz B., Püschel A., Beermann W., Hocke A.C., Förster S., Schmeck B., van Laak V., Chakraborty T., Suttorp N., Hippenstiel S. (2006): *Listeria monocytogenes* Activated p38 MAPK and Induced IL-8 Secretion in a Nucleotide-Binding Oligomerization Domain 1-Dependent Manner in Endothelial Cells, *The Journal of Immunology* (176), 484-490

#### 6.1.2 Kongressbeiträge

Förster S., Opitz B., Hocke A.C., Maass M., Kuipers J.G., Suttorp N., Krüll M. (2004): Nod1 and -2 Mediated NF- $\kappa$ B Activation by Chlamydiae, Fifth Meeting of the European Society for Chlamydial Research, Budapest

Kramp J., Opitz B., Förster S., Maass M., Suttorp N., Krüll M. (2004): Importance of MAPkinases and Rho-Proteins for *C. pneumoniae*-mediated Activation of Endothelial Cells, Fifth Meeting of the European Society for Chlamydial Research, Budapest

Förster S. (2004): Nod1 and -2 Mediated NF- $\kappa$ B Activation by Chlamydiae, 15<sup>th</sup> European Students' Conference, Berlin

Förster S., Opitz B., Hocke A.C., Maass M., Suttorp N., Krüll M. (2005): Zellaktivierung durch *Chlamydomphila pneumoniae* über zytoplasmatische Rezeptoren der "innate immunity", 46. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Pneumologie, Berlin

Püschel A., Opitz B., Förster S., Beermann W., van Laak V., Schmeck B., Chakraborty T., Suttorp N., Hippenstiel S. (2005): Intrazelluläre Bakterien aktivieren p38- und p42/44-MAPK sowie die IL-8 Sekretion über Nod1, 46. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Pneumologie, Berlin

## 6.2 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. med. Bastian Opitz für die konstruktive Beratung bei der Themenfindung und die kompetente Unterstützung während meiner ganzen Promotionszeit. Seine zahlreichen Anregungen flossen direkt in die Forschungsarbeit ein und sorgten stetig für Verbesserungen und Ergänzungen. Sein Engagement weckte bei mir die Begeisterung für das wissenschaftliche Arbeiten.

Gedankt sei auch Herrn Professor Dr. med. Suttorp, dem Direktor der Klinik, für die Möglichkeit, dass ich die vorliegende Dissertationsarbeit in seiner Klinik erstellen konnte. Außerdem danke ich ihm für die Bereitstellung der für die Laborarbeit benötigten Mittel sowie für die Gelegenheiten, meine Ergebnisse auf Fachkongressen zu präsentieren.

Natürlich auch ein Dankeschön an die vielen hier nicht namentlich aufgeführten Mitarbeiter des Labors der Medizinischen Klinik für Infektiologie der Charité Berlin für das sehr freundliche und angenehme Arbeitsklima.

Dank auch an Viola Beil und Matthias Krüll für die konstruktiven Korrekturvorschläge.

Mein ganz besonderer Dank gilt meiner Familie, die mir immer zur Seite gestanden hat. Außerdem danke ich meinem Lebenspartner Alexander für die Geduld und Unterstützung in jeglicher Hinsicht.

### **6.3 Lebenslauf**

Mein Lebenslauf wird aus Datenschutzgründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht mit veröffentlicht.

#### **6.4 Eidesstattliche Erklärung**

Hiermit erkläre ich, Stefanie Förster, an Eides statt, dass die vorliegende Dissertationsarbeit von mir selbst und ohne die unzulässige Hilfe Dritter verfasst wurde. Sie stellt auch in Teilen keine Kopie anderer Arbeiten dar. Die benutzten Hilfsmittel sowie die verwendete Literatur sind vollständig angegeben.