

Aus dem Universitätsklinikum Münster
Klinik und Poliklinik für Innere Medizin D
-Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Hermann-Joseph Pavenstädt-

Regulation von mitogen-aktivierten Proteinkinasen in Monozyten durch Urämie und Hämodialyse

INAUGURAL-DISSERTATION

zur

Erlangung des doctor medicinae

der Medizinischen Fakultät

der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

vorgelegt von
Kampen, Heike
aus Thuine

2007

gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. Volker Arolt

1. Berichterstatter: Priv-Doz. Dr. med. D. Lang

2. Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. med. E. Brand

Tag der mündlichen Prüfung: 23.10.2007

Aus dem Universitätsklinikum Münster
Klinik und Poliklinik für Innere Medizin D
Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. H.-J. Pavenstädt
Referent: Priv.-Doz. Dr. med. D. Lang
Koreferent: Univ.-Prof. Dr. med. E. Brand

ZUSAMMENFASSUNG

-Regulation von mitogen-aktivierten Proteinkinasen (MAPK) in Monozyten durch Urämie und Hämodialyse-

Heike Kampen

Einleitung: Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz leiden unter einer erhöhten Infektanfälligkeit und einem massiv erhöhten Arterioskleroserisiko. Hierfür verantwortlich könnte eine Monozytenfehlfunktion unter Urämie sein. MAPK transferieren extra- in intrazelluläre Signale. Sie spielen eine Rolle bei der Proliferation, Apoptose und Zytokinproduktion von Monozyten. Es gibt drei Subfamilien. Diese Arbeit beschäftigt sich mit Veränderungen der Expression von extrazellulär signal-regulierter Kinase 2 (ERK 2) und p38 MAPK bei terminal niereninsuffizienten Patienten.

Methoden: Frisch isolierte Monozyten von dialysepflichtigen Patienten wurden isoliert und mittels Western Blot und Durchflusszytometrie auf die Expression von MAPK und Tissue factor (TF) im Vergleich zu gesunden Probanden untersucht.

Ergebnisse: Eine Regulation der MAPK unter Urämie konnte nicht festgestellt werden. Unter zusätzlichem Stress, nach Hitzeschock, konnte eine Reduktion des ERK-Levels gegenüber Kontrollen nachgewiesen werden. Urämie induzierte die MAPK nicht, also dürfte auch eine Inhibition derselben als therapeutisches Eingreifen nicht in Frage kommen. Nach der Hämodialyse (HD) war das ERK-Defizit bei den Patientenmonozyten, die zusätzlichen Stressfaktoren ausgesetzt waren, aufgehoben. Die Behandlung der Urämie mittels HD reduzierte somit die Fehlfunktion der Kinasen. Eine ERK-Inhibition in Monozyten führte zu einer vermehrten Proliferation der Zellen. Die TF-Aktivität war nach der HD signifikant erniedrigt, so dass andere Faktoren für die hohe Rate an arteriosklerotischen Komplikationen wesentlicher sein müssen.

Schlussfolgerung: Eine Reduktion der ERK wie sie unter Urämie und Stress auftritt, könnte für vermehrte Proliferation von Monozyten verantwortlich sein, die auf Kosten einer Zytokinproduktion und Differenzierung stattfindet. Die Immunschwäche der Patienten wäre durch weniger funktionsfähige Monozyten erklärbar.

Tag der mündlichen Prüfung: 23.10.2007

Inhaltsverzeichnis

1. <u>Einleitung</u>	1
1.1. Niereninsuffizienz (NI)	1
1.1.1. Ursachen und Epidemiologie	1
1.1.2. Einteilung und Klinik	2
1.1.3. Therapiemöglichkeiten	4
1.2. Hämodialyse (HD)	5
1.2.1. Prinzip	5
1.2.2. Aufbau	6
1.2.3. Probleme der Dialysebehandlung	8
1.3. Monozyten	10
1.3.1. Morphologie und Funktion	10
1.3.2. Schicksal und Differenzierung	11
1.3.3. Monozyten unter Urämie und HD-Behandlung	12
1.4. MAPK	14
1.4.1. p38	15
1.4.2. ERK 2	16
1.5. Tissue factor (TF)	17
1.6. Zielsetzung	18
2. <u>Material und Methoden</u>	20
2.1. Patienten und Kontrollen	20
2.2. Materialien	20
2.2.1. Geräte	20
2.2.2. Arbeitsmaterialien	21
2.2.3. Reagenzien	22
2.3. Monozytenseparation	25
2.4. Kultur und Stimulation	26
2.5. Proteingewinnung und –bestimmung	27
2.5.1. Proteingewinnung	27

Inhaltsverzeichnis

2.5.2. Proteinbestimmung	27
2.6. Western Blot	28
2.6.1. Prinzip	28
2.6.2. Methode	28
2.6.2.1. Probenvorbereitung	28
2.6.2.2. Gelelektrophorese	29
2.6.2.3. Blot	29
2.6.2.4. Proteinmarkierung und Antigendetektion	30
2.7. Durchflusszytometrie	31
2.7.1. Prinzip	31
2.7.2. Methode	32
2.8. Aktivitätsmessung Tissue factor	33
2.9. Statistische Methoden	33
3. Ergebnisse	35
3.1. Expressions-Zeitkinetik der p38 MAPK	35
3.2. Regulation der MAPK durch Niereninsuffizienz	35
3.2.1. Regulation der p38/pp38	35
3.2.2. Regulation der ERK	37
3.3. Expression der MAPK unter Stress	38
3.3.1. p38/pp38	39
3.3.2. ERK	40
3.4. Einfluss der HD auf die ERK-Expression	41
3.4.1. Expression unter Stress bei Patienten vor/nach HD	41
3.4.2. Basale Expression bei Patienten vor/nach HD	42
3.5. Welche Rolle spielt ERK bei der Proliferation?	44
3.6. Tissue factor-Aktivität	46
4. Diskussion	48
4.1. Keine Regulation der MAPK durch Urämie	48
4.1.1. Monozyten unter Urämie	48
4.1.2. Apoptoseregulation durch MAPK	49
4.1.3. Regulation der Proliferation durch ERK	49

Inhaltsverzeichnis

4.1.4. Regulation der Zytokinproduktion durch MAPK	50
4.1.5. Fehlende Regulation der MAPK durch Urämie	52
4.2. Einfluss von Urämie und Stress auf MAPK	52
4.2.1. Kein Einfluss von Urämie und Stress auf die p38	52
4.2.2. Herabregulation der ERK durch Urämie und Stress	53
4.3. ERK-Expression nach HD	54
4.4. ERK hemmt die Proliferation in Monozyten	55
4.5. HD senkt TF-Aktivität	56
4.6. Fazit	58
5. Literaturverzeichnis	59
6. Lebenslauf	72
ANHANG	I
Abkürzungsverzeichnis	I
Abbildungsverzeichnis	IV
Tabellenverzeichnis	VI

1. EINLEITUNG

1.1. Niereninsuffizienz (NI)

1.1.1. Ursachen und Epidemiologie

Die NI ist die Folge der irreversiblen Verminderung der glomerulären, tubulären und endokrinen Funktionen beider Nieren durch den zunehmenden Verlust funktionsfähiger Nephrone. Ursachen für eine chronische Niereninsuffizienz können primäre parenchymatöse Störungen sein oder sekundäre Schäden durch Stoffwechselstörungen, Erkrankungen der Gefäße oder der Harnwege. Die häufigsten Ursachen sind in Deutschland mit 30% Diabetes mellitus, gefolgt von Glomerulonephritiden mit 25% und hypertoniebedingten Nierenschäden mit 13% [Rayner et al., 2004]. Die Progredienz bis zur Entwicklung einer terminalen Niereninsuffizienz ist zeitlich sehr individuell und variiert zwischen Wochen und Jahren.

Die chronische NI ist ein weltweites, medizinisches Problem, dessen Prävalenz in den letzten Jahrzehnten zunimmt. Erklärungen für die zunehmende Zahl der Patienten sind die steigende Inzidenz an Diabetes mellitus, die Alterung der Bevölkerung, die steigende Anzahl an Umwelttoxinen und die vermehrte Nutzung von Analgetika. Die Anzahl dialysepflichtiger Patienten steigt wegen des früheren Beginns einer Nierenersatztherapie aufgrund verbesserter Therapien von Risikofaktoren und Komplikationen der Dialyse [Hsu et al., 2004]. Die Inzidenz der terminalen NI beträgt in Deutschland aktuell 163/Mio Einwohner pro Jahr (USA 262), die Prävalenz 760/Mio Einwohner (USA 1013) [Berthoux et al., 1999]. Es wird angenommen, dass die Anzahl nicht erkannter Nierenerkrankungen höher liegt. Eine rechtzeitige Diagnosestellung könnte die Komplikations- und Progressionsrate verringern. [Levey et al., 2003]. Der häufigste Grund für eine Hospitalisierung von hämodialysepflichtigen Patienten ist mit 37,4% durch kardiovaskuläre Probleme bedingt, gefolgt von gefäßzugangsbedingten Komplikationen (21,7%) und Infektionen (12,4%) [Rayner et

al., 2004]. Die häufigsten Todesursachen sind infektiöse Komplikationen mit einer Mortalität von 16%. Bei Patienten, die sich länger als fünf Jahre der Hämodialyse (HD) unterziehen, stehen kardiovaskuläre Komplikationen an erster Stelle [Frei et al., 2001]. Mit zunehmendem Schweregrad der Niereninsuffizienz steigt das kardiovaskuläre Risiko sprunghaft an und ist ab Stadium 3 mit einer glomerulären Filtrationsrate (GFR) von < 60 ml/min deutlich erhöht [Anavekar et al., 2004; Go et al., 2004].

1.1.2. Einteilung und Klinik:

Zur Beurteilung der Nierenfunktion wird die glomeruläre Filtrationsrate (GFR) herangezogen. Die Niereninsuffizienz wird nach der GFR in fünf Stadien eingeteilt. Sie haben therapeutische und prognostische Bedeutung. Im Stadium 1 besteht eine Nierenschädigung ohne Einschränkung der glomerulären Filtration ($GFR > 90$ ml/min), das Stadium 2 kennzeichnet eine leichte Einschränkung der glomerulären Filtration von 60-89 ml/min. Stadium 3 zeigt eine mäßig erniedrigte GFR von 30-59 ml/min, im Stadium 4 besteht eine stark erniedrigte GFR mit 15-29 ml/min und Stadium 5 kennzeichnet das terminale Nierenversagen mit einer $GFR < 15$ ml/min [Lang et al., 2005].

Die Klinik ist gekennzeichnet durch:

1. Versagen der exkretorischen Funktion mit Störungen im Wasser-, Elektrolyt- und Säuren-Basen-Haushalt und der Retention harnpflichtiger Substanzen. Die Ausscheidung von Produkten des Protein- und Aminosäurestoffwechsels hängt im Gegensatz zum Kohlenhydrat- und Fettstoffwechsel, deren Produkte zu CO_2 und H_2O abgebaut und abgeatmet werden können, wesentlich von der Nierenfunktion ab. Die Retention stickstoffhaltiger Abfallprodukte bezeichnet man als Azotämie. Harnstoff, Guanidino-Verbindungen, Harnsäure, Mittelmoleküle (500-12.000 Da) und andere Substanzen reichern sich mit der Folge toxischer Organschäden im Blut an.

2. Abnahme der inkretorischen und metabolischen Funktionen: Eine verminderte Sekretion von Erythropoetin führt zu einer renalen Anämie. Eine Einschränkung der Hydroxylierung von 25-OH-cholecalciferol zu aktivem Vitamin D₃ (=1,25-(OH)₂-Cholecalciferol=Calcitriol) führt durch Phosphatretention und Hypokalzämie zu einem sekundären Hyperparathyreoidismus mit der Folge einer renalen Osteopathie. Eine verminderte Katabolisierung und Inaktivierung von Polypeptidhormonen (PTH, Insulin, Glukagon, Prolaktin, LH) zieht ein hormonelles Ungleichgewicht nach sich.

Eine Urämie hat Auswirkungen auf alle Organe und ist durch eine Vielzahl von Symptomen gekennzeichnet, die nicht alle durch eine Nierenersatztherapie gelindert werden können (Abb. I-1) [Skorecki et al., 2003].

1. Einleitung

Flüssigkeits- und Elektrolytstörungen <ul style="list-style-type: none"> • Volumenüberladung und -mangel • Hyper- und Hyponatriämie und -kaliämie • Metabolische Azidose • Hyperphosphatämie • Hypokalzämie 	Neuromuskuläre Störungen <ul style="list-style-type: none"> • Schlafstörungen • Myopathie und Muskelkrämpfe • Dysäquilibriumssyndrom
Endokrine und Stoffwechselstörungen <ul style="list-style-type: none"> • Erhöhte Lp(a) Spiegel • Erniedrigte HDL-Spiegel • Wachstum- und Entwicklungsstörung • Unfruchtbarkeit und sexuelle Dysfunktion • Amenorrhö • β_2-Mikroglobulin-Amyloidose 	<ul style="list-style-type: none"> • Müdigkeit • Kopfschmerzen • Konzentrationsstörungen • Lethargie • Asterixis • Muskuläre Erregbarkeit • Periphere Neuropathie • Restless legs Syndrom • Lähmungen • Myoklonus • Krampfanfälle • Koma
<ul style="list-style-type: none"> • Sekundärer Hyperparathyreoidismus • Vitamin D-Mangel Osteomalazie • Hyperurikämie • Hypertriglyceridämie • Eiweißmangelernährung • Kohlenhydratintoleranz • Hypothermie 	Dermatologische Störungen <ul style="list-style-type: none"> • Blässe • Hyperpigmentierungen • Ekchymosen • Urämischer „Schnee“
Kardiovaskuläre und pulmonale Störungen <ul style="list-style-type: none"> • Hypotonie und Arrhythmien • <i>Athero-/Arteriosklerose</i> ← 	Gastrointestinale Störungen <ul style="list-style-type: none"> • Anorexie • Übelkeit und Erbrechen • Urämischer Foeter • Gastroenteritis • Peptische Geschwüre • Gastrointestinale Blutungen
Hämatologische und immunologische Störungen <ul style="list-style-type: none"> • Lymphozytopenie • Splenomegalie und Hypersplenismus 	
<ul style="list-style-type: none"> • Anämie • <i>Erhöhte Infektneigung</i> ← • Gerinnungsstörungen 	

Abb. I-1: Tabelle der Komplikationen bei Niereninsuffizienz modifiziert nach Harrison

- Komplikationen, die durch HD induziert oder verschlechtert werden
 Komplikationen, die durch HD verbessert oder verschlechtert werden

1.1.3. Therapiemöglichkeiten:

Eine Bilanzierung von Wasser-, Elektrolyt- und Säuren-Basen-Haushalt und eine Dosisanpassung von harnpflichtigen Medikamenten sind notwendig, Komplikationen (Hypertonie, Infektionen, Herzinsuffizienz, Phosphatmangel, renale Anämie) sollen konsequent behandelt werden.

Als Blutreinigungsverfahren stehen die HD und Peritonealdialyse (PD) zur Verfügung. Da die Korrelation von Nierenfunktion und urämischen Symptomen variiert, ist der Zeitpunkt des Beginns der Dialyse individuell abzuschätzen. Als sicher kann gelten, dass ab einer Kreatinin-Clearance von unter 10 ml/min die Dialyseindikation gegeben ist. Die Dialyse sollte frühzeitig bei Auftreten von urämischen Symptomen begonnen werden, um Komplikationen zu vermeiden. Zwingende Indikationen für die Durchführung einer Dialysebehandlung sind das Vorliegen einer Perikarditis, einer urämischen Enzephalopathie oder Polyneuropathie sowie nicht konservativ beherrschbare Flüssigkeits- und Elektrolytstörungen wie Lungenödem, Hyperkaliämie oder schwere Azidose.

Bei fehlenden Kontraindikationen sollte eine Nierentransplantation als Nierenersatzverfahren angestrebt werden [Singh et al., 2003].

1.2. Hämodialyse (HD)

1.2.1. Prinzip

In Deutschland unterziehen sich 524/Mio Einwohner einem Blutreinigungsverfahren, davon 93% der HD und 7% der PD [Lonnemann, 2000]. Die Dialyse kann nur die exkretorische, nicht jedoch die metabolische oder endokrine Funktion der Niere ersetzen. Bei der Dialyse wird das Blut des Patienten an einer semipermeablen Membran vorbeigeleitet. An der Gegenseite der Membran fließt im Gegenstrom das Dialysat, welches aus einer wässrigen Lösung mit Elektrolyten, Puffern und Glukose besteht und die gleiche Osmolarität wie Plasma besitzt. Durch Diffusion durch die Membran findet ein Transport von Metaboliten aus dem Blut in das Dialysat statt (Abb. 1-2). Die treibende Kraft ist der Konzentrationsunterschied zwischen Blut und Dialysat. Die Transportrate einer Substanz wird bestimmt von der Größe und Richtung des Konzentrationsgradienten, Molekülgröße, Form und Ladung der Substanz und dem Diffusionswiderstand der Membran. Zusätzlich kann dem Körper über Ultrafiltration Wasser entzogen werden, indem der

hydrostatische Druck auf der Dialysatseite niedriger reguliert wird, so dass ein Flüssigkeitsentzug über Konvektion entlang der Membran stattfindet.

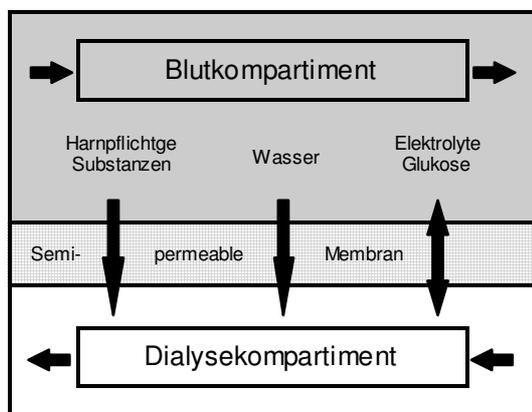


Abb. I-2: Prinzip der Hämodialyse

Dabei werden zusätzlich lösliche Substanzen mit dem Wasser ausgeschwemmt und die Effektivität wird gesteigert (solvent drag). Die Hämodialyse wird im Allgemeinen dreimal pro Woche für vier bis sechs Stunden durchgeführt. Als Kontrolle einer adäquaten Dialyse wird die über

die Zeit gemittelte Harnstoffkonzentration (time averaged concentration-Harnstoff =TAC-Harnstoff) verwendet. Sie berechnet sich aus der Harnstoffkonzentration vor und nach der HD, vor der nächsten HD, der Dialysezeit und der Zeit zwischen den Dialysen [Lonnemann et al., 2000]. Ein anderes Modell beruht auf einem Index, der sich aus KT/V berechnet, wobei K die Harnstoffclearance, T die Zeit an der Dialyse und V das Verteilungsvolumen repräsentiert. Bei der PD infundiert der Patient das Dialysat in die Bauchhöhle, das Peritoneum arbeitet als natürliche Membran. Das Dialysat wird entweder mehrmals täglich durch den Patienten manuell oder nachts durch einen automatisierten Cyclus ausgetauscht [Singh et al., 2003].

1.2.2. Aufbau

Zur Durchführung der HD muss ein extrakorporaler Kreislauf hergestellt werden, der das Blut in das Dialysatsystem leitet. Es wird ein Gefäßzugang benötigt, dabei wird meist am Unterarm eine End-zu-Seit-Anastomose zwischen A. radialis und V. cephalica nach Brescia-Cimino, die sogenannte Cimino-Fistel, angelegt. Es besteht außerdem die Möglichkeit, Gefäßprothesen oder Gefäßinterponate zu implantieren oder zentrale Zugänge zu benutzen. Durch eine arterielle Punktionskanüle wird über die Vene des arteriovenösen Shunts Blut mit Hilfe einer okklusiven Rollerpumpe in das Schlauchsystem gesaugt. Die Flussrate

1. Einleitung

beträgt zwischen 250 bis 500 ml/min. Ein Druckmonitor kontrolliert die Einhaltung der Druckgrenzen, bei deren Überschreitung automatisch eine Sicherheitsklemme geschlossen wird. Hinter der Blutpumpe wird niedermolekulares Heparin in das Schlauchsystem infundiert. Nachdem das Blut den Dialysator durchlaufen hat, gelangt es in eine Tropfkammer, die als Blasenfänger fungiert und mit einem Luftdetektor mit Sicherheitsklemme ausgestattet ist. Der venöse Rücklaufdruck wird gemessen und das Blut wird über eine venöse Kanüle in den Körper zurückgeleitet.

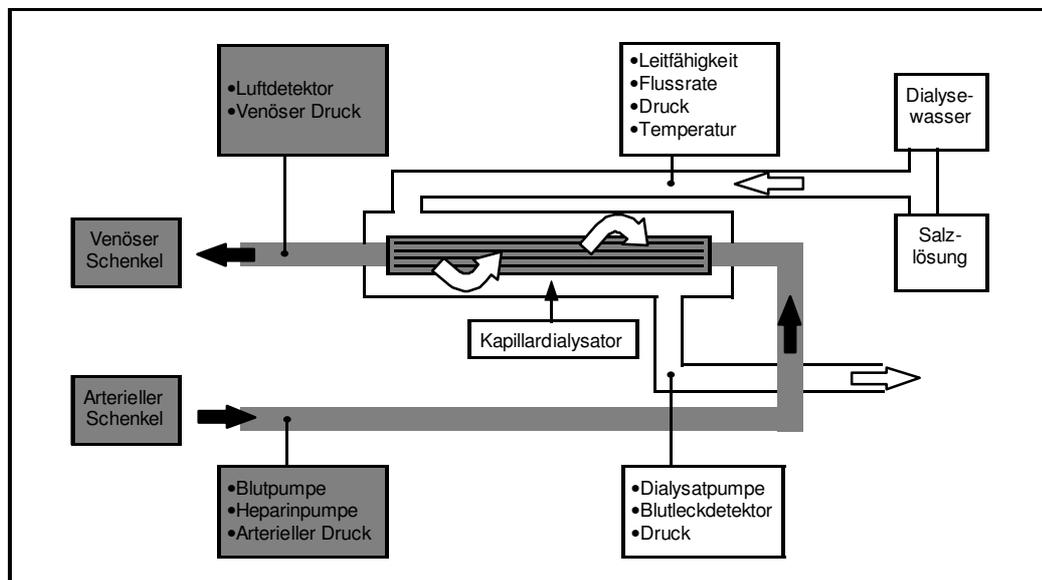


Abb. I-3: Aufbau der Dialyse mit Dialysatkreislauf und extrakorporalem Kreislauf

Im Dialysatsystem wird das Dialysat mittels einer Proportionierungspumpe aus aufbereitetem erhitztem Dialysewasser und Salzlösung frisch zubereitet. Die Zusammensetzung wird durch Messung der Leitfähigkeit überwacht. Vor dem Dialysator zeigt ein Flussmesser die Flussrate an, die üblicherweise bei 500 ml/min liegt. Eine Dialysatpumpe hinter und ein Drosselventil vor dem Dialysator steuern den Dialysatfluss und Druck im System, so kann dem Körper durch die Erzeugung eines negativen Drucks Flüssigkeit entzogen werden. Hinter dem Dialysator befinden sich ein Druckmesser und ein Blutleckdetektor (Abb. I-3). Es gibt Platten- und Kapillardialysatoren, wobei Plattendialysatoren fast keine Rolle mehr spielen. In dieser Arbeit

wurden ausschließlich Kapillardialysatoren verwendet, wobei das Blut durch feine Kapillaren geleitet wird während das Dialysat im Gegenstrom um die Hohlfasern zirkuliert.

Es gibt verschiedene Arten von Membranen. Sie bestehen entweder aus Zellulosederivaten wie Cuprophan oder synthetischen Materialien wie Polysulfon. Die in dieser Arbeit verwendeten Polysulfonmembranen sind High-flux-Membranen, die einen hohen Ultrafiltrationskoeffizienten aufweisen, welcher ein Maß für die Permeabilität darstellt. Sie besitzen eine höhere Permeabilität für höhermolekulare Substanzen bis zu 25.000 Da, da sie einen geringeren Diffusionswiderstand besitzen. Synthetische Membranen haben den Vorteil, dass sie biokompatibler sind und weniger Interaktionen mit Blutzellen auslösen [Lonnemann et al., 2000; Singh et al., 2003].

1.2.3. Probleme der Dialysebehandlung:

1. Akute Komplikationen: Hypotonie durch zu starken Volumenentzug und gestörte kompensatorische Vasokonstriktion, Muskelkrämpfe durch Elektrolytverschiebungen, anaphylaktische Reaktionen, Dysäquilibrium-Syndrom durch erhöhte Harnstoffkonzentration in der cerebrospinalen Flüssigkeit gegenüber dem Blut mit der Folge eines osmotisch verursachten Hirnödems, Blutungen durch Heparinabgabe bei der Dialyse und eventuellen Thrombozytenverlust an der Membran.
2. Begleiterkrankungen: Zytokine induzieren einen gesteigerten katabolen Muskeleiweißabbau und die Freisetzung von Aminosäuren aus Muskeln und sind vermutlich assoziiert mit der chronisch entzündlichen β_2 -Mikroglobulin-Amyloidose (Dialyseamyloidose) bei Langzeitdialysepatienten [Memoli, 1999]. β_2 -Mikroglobulin lagert sich in Gelenken und Knochen ab und lockt chemotaktisch Monozyten an, die IL-1 und TNF- α produzieren, welche den Knochenabbau fördern und zur Destruktion führen. Es besteht die Gefahr von Herzrhythmusstörungen, Myokardinfarkten, Verkalkungen von

1. Einleitung

Gefäßen und Infektionen (virale Hepatitiden, Perikarditis und bakterielle Infekte) [Lonnemann et al., 2000].

3. Durch Bioinkompatibilitätsreaktionen mit der Membranoberfläche (0,9-1,8 m²) oder dem Schlauchsystem (0,05 m²) werden humorale Faktoren und Blutzellen aktiviert. Eine Komplementaktivierung über den alternativen Weg wird besonders durch die dem Lipopolysaccharid (LPS) ähnliche Zellulose ausgelöst. Es kommt zu einer Erhöhung von Komplementfaktoren, die durch Anlagerung an Zellmembranen Zellen aktivieren oder deren Lyse induzieren. Die Komplementaktivierung hat ihr Maximum nach ca. 15 min Dialyse erreicht und kann zu akuten Unverträglichkeitsreaktionen führen, nach 30 min werden normale Plasmaspiegel nachgewiesen. Die Aktivierung von Zellen führt zur Freisetzung von Proteasen und zur Zytokin-Produktion. Hauptsächlich werden IL-1, IL-6 und TNF- α als proinflammatorische Zytokine produziert, welche Mediatoren akuter und chronischer Entzündungsreaktionen sind. Durch die Verwendung von synthetischen, biokompatibleren Membranen können diese Effekte heute weitgehend verhindert werden.

Es ist schwer zu differenzieren, ob der Immundefekt durch die HD-Behandlung verbessert wird, da Urämiegifte ausgeschaltet werden, oder ob die HD selbst einen Defekt des Immunsystems durch den Kontakt mit Membran und Dialysat verursacht. Monozyten können für die veränderte Immunantwort mitverantwortlich sein. Es wurden Untersuchungen an Monozyten vor und nach der HD durchgeführt, um eine Aussage treffen zu können.

Während der arteriosklerose-induzierende Faktor Hypertonie durch die Dialyse besser eingestellt werden kann, lassen sich Aspekte wie HDL-Erniedrigung, Hypertriglycerdämie und erhöhte Lp(a)-Spiegel durch die Dialyse nicht beeinflussen. Während der HD produzierte Zytokine induzieren eine chronische Entzündungsreaktion, erkennbar an einer CRP-Erhöhung, die zu Endothelschäden mit Endotheldysfunktion und

Prädisposition für atheromatöse Plaques führt und für die kardiovaskulären Ereignisse wie Myokardinfarkt und Insult verantwortlich sind [Vallance et al., 1997]. Der unter anderem von Monozyten produzierte Tissue factor könnte eine Rolle spielen bei der Pathogenese der durch HD bedingten Arterio-/Atherosklerose.

1.3. Monozyten

1.3.1. Morphologie und Funktion

Monozyten sind zwischen 12-20 μm groß und haben einen nierenförmigen Kern, der gelegentlich gelappt und meist exzentrisch gelagert ist. Das Zytoplasma ist basophil und enthält feine Granula, die überwiegend aus Lysosomen bestehen (Abb. I-4). Diese enthalten saure Phosphatase, andere Hydroxylasen und Peroxidase. Es finden sich reichlich Mitochondrien, Ribosomen und ein ausgeprägter Golgi-Apparat [Bucher und Wartenberg, 1999]. Monozyten nehmen eine wichtige Rolle in der angeborenen unspezifischen zellulären Abwehr ein. Ihre Zellmembran besitzt eine Vielzahl an Rezeptoren, so z.B. einen Fc-Rezeptor für IgG und Rezeptoren für Komplementfaktoren zur Erkennung opsonierter Antigene (AG) (=AG+AK+Komplement) und Rezeptoren, die direkt Bestandteile von Mikroorganismen erkennen (z. B. Leukozytenintegrine, Scavenger-Rezeptoren, die Sialinsäureliganden binden, CD14 zur Bindung von LPS) [Janeway et al., 2002]. Monozyten bilden zusammen mit den B-Lymphozyten und dendritischen Zellen die Antigen-präsentierenden Zellen (APZ) und besitzen sowohl den major histocompatibility complex (MHC) I- als auch den MHC-II-Komplex [Petrides, 1998].

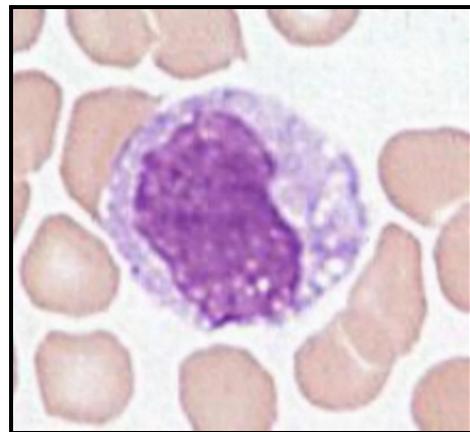


Abb. I-4: Monozyt, May-Grünwald-Giemsa-Färbung nach Pappenheim

Ihre Funktionen sind:

1. Phagozytose: Als Zelle des unspezifischen Immunsystems besitzt der Monozyt die Fähigkeit zur Phagozytose. Das Pathogen wird mittels Rezeptoren an die Zelle gebunden und internalisiert. Durch Einstülpung der Zellmembran bildet sich um das Antigen ein Phagosom. Dieses verschmilzt mit Lysosomen zu einem Phagolysosom, in dem das Antigen durch oxidativen Metabolismus (H_2O_2 , O_2^- , NO) und Enzyme zerstört wird.
2. AG-Präsentation: Da T-Lymphozyten freie Antigene nicht erkennen können, müssen sie diese in Verbindung mit dem MHC-II-Komplex präsentiert bekommen. Monozyten binden im Phagolysosom entstandene Proteinfragmente des Antigens zusammen mit dem MHC-II-Komplex und präsentieren diese auf ihrer Oberfläche. T-Helfer-Lymphozyten erkennen mit Hilfe des Corezeptors CD 4 den MHC-II-Komplex und binden mit dem T-Zellrezeptor das Antigen. Es findet ein Zell-Zell-Kontakt statt, woraufhin T-Lymphozyten Monozyten zur Zytokinproduktion aktivieren.
3. Sekretorische Eigenschaften: Monozyten sind befähigt zur Produktion von Komplementfaktoren, Enzymen, Gerinnungsfaktoren, wie z.B. Tissue factor, Wachstumsfaktoren, Plasmaproteinen, reaktiven Sauerstoffprodukten, bioaktiven Lipiden und Zytokinen. Die wichtigsten Zytokine sind die proinflammatorischen Zytokine IL-1, TNF- α und IL-6, und das antiinflammatorische Zytokin IL-10. IL-1 bewirkt Fieber, die Produktion von Akute-Phase-Proteinen in der Leber (diese machen Bakterien für das Komplementsystem angreifbar) und die Freisetzung und Aktivierung von neutrophilen Granulozyten, B- und T-Lymphozyten.

1.3.2. Schicksal und Differenzierung

Monozyten werden im Knochenmark aus einer myeloepoetischen Stammzelle gebildet (Monoblast->Promonozyt->Monozyt), die Monozytopoese wird stimuliert durch granulocyte-makrophage colony stimulating factor (GM-CSF) und macrophage colony stimulating factor (M-CSF). Die Monozyten gelangen nach der Differenzierung in das

Blutkreislaufsystem, in dem sie ca. 2-8% der Leukozyten ausmachen [Bucher und Wartenberg, 1997]. Monozyten sind keine Endzellen, sie verbleiben 8-70 Stunden im Blut. Die Dauer wird beeinflusst von im Laufe einer Entzündung gebildeten chemotaktischen Produkten, die Monozyten veranlassen, am Endothel zu adhären und amöboid ins Gewebe einzuwandern. Dort differenzieren sie zu gewebspezifischen Makrophagen und es entstehen unterschiedliche Zellen, die Aschoff 1924 unter dem Begriff retikuloendotheliales System (RES) (heute auch monozytäres Phagozyten-System (MPS)= Monozyten-Makrophagen System (MMS)= Retikuloendotheliales System (RES)) zusammengefasst hat. Dazu gehören Histiocyten des Bindegewebes, Osteoklasten, Chondroklasten, Mikroglia des ZNS, Retikulumzellen des lymphatischen Systems, Langerhanszellen der Epidermis, Sinusendothelzellen in Milz und Knochenmark, Alveolarmakrophagen der Lunge, Kupfer-Sternzellen der Leber und Peritonealmakrophagen [Bucher und Wartenberg, 1997]. Werden die Monozyten nicht chemotaktisch aktiviert, sterben sie mittels Apoptose und werden hauptsächlich in der Milz von Makrophagen entfernt [Heidenreich, 1999].

1.3.3. Monozyten unter Urämie und HD-Behandlung

Bei Patienten, die unter einer Niereninsuffizienz leiden und sich einer Dialysebehandlung unterziehen, deuten eine erhöhte Infektanfälligkeit und eine verminderte Impfreaktion darauf hin, dass eine gestörte Immunantwort vorliegt. Dabei spielt unter anderem eine Störung der unspezifischen Abwehr eine Rolle, an der die Monozyten wesentlich beteiligt sind. Bei Monozyten sind hauptsächlich drei Fehlfunktionen beschrieben. Die Phagozytose ist vermindert, die Zytokinproduktion ist verändert und es findet vermehrt Apoptose und Nekrose statt. Es wird ein Defekt der C3b- und Fc-Rezeptor-vermittelten Phagozytose von Pertosa et al. beschrieben [Pertosa et al., 1989]. Heidenreich et al. weisen eine eingeschränkte Elimination von *Candida albicans* durch urämische Monozyten nach [Heidenreich et al., 1996]. Bezüglich der Zytokinproduktion liegen unterschiedliche Ergebnisse vor, ein

veränderter Zytokingehalt kann sowohl durch Urämie als auch durch HD induziert worden sein [Schindler et al., 2000]. Heidenreich et al. beschreiben in urämischen Monozyten eine verminderte Produktion von TNF- α , welches Immunzellen stimuliert. Außerdem unterliegen Monozyten bei Niereninsuffizienz einer vermehrten Apoptose und Nekrose. Nach der HD steigt die Produktion an TNF- α und es findet weniger Apoptose statt. [Heidenreich et al., 1996]. Girndt fand heraus, dass Patienten vor der HD mehr IL-6 und -10 produzieren. Nach der HD sinkt sowohl die Anzahl der Monozyten als auch die Zytokinproduktion. Die Monozyten sind weniger zytokinspezifisch als Monozyten von gesunden Probanden [Girndt et al., 2001].

Bei der HD werden die Monozyten auf drei Wegen aktiviert, und zwar durch eine möglicherweise induzierte Komplementaktivierung (=C3 auf Monozyten-> C3a), den Membrankontakt und durch eventuell vorhandene Endotoxine, die aus dem Dialysat ins Blut gelangen. Meist sind dies kleinmolekulare Teile von Endotoxin oder Exotoxin A, meist von Pseudomonaden [Memoli, 1999]. Polysulfon besitzt eine hohe Adsorptionsfähigkeit solcher Substanzen und ist 5- bis 10-mal so dick wie Zellulose, somit besteht bei Polysulfonmembranen ein vermindertes Risiko für eine Kontamination [Lonnemann et al., 2000; Hörl, 2002]. Die Aktivierung setzt Proteasen und proinflammatorische Zytokine frei, die eine chronische Entzündungsreaktion auslösen. Während Membrankontakt und Komplementaktivierung die Zytokinproduktion nur bis zur Ebene der Transkription der mRNA induzieren, erfolgt bei zusätzlichem Stimulus, z. B. durch bakterielle Endotoxine oder andere Pyrogene, die vollständige Synthese und deren Freisetzung. Es folgt dann eine verstärkte Freisetzung, da die Monozyten schon vorgeprimt sind [Memoli, 1999]. Die Immunschwäche kann durch eine chronische Überstimulation der Monozyten durch proinflammatorische Zytokine verursacht sein und führt zu einer verminderten Resonanz gegenüber weiterer Stimulation [Memoli, 1999]. Girndt et al. beschreiben eine Störung der kostimulierenden Signale der APZ durch weniger

exprimiertes B7-2 (CD86) auf Monozyten von Dialysepatienten, jedoch nicht bei niereninsuffizienten Patienten, durch die es zu einer eingeschränkten Aktivierung von T-Helfer-Zellen und B-Zellen kommt [Girndt et al., 2001]. Auch Hörl berichtet von einer reduzierten Stimulierbarkeit gegenüber LPS bei Monozyten von HD-Patienten [Hörl, 2002].

1.4. MAPK

Apoptose, Proliferation und Differenzierung (Zytokinproduktion, Chemotaxis, Adhärenz) werden in einer Reihe von Zellen durch mitogen-aktivierte Proteinkinasen (MAPK) reguliert. Sie sind eine Familie von Kinasen, die durch extrazelluläre Signale entlang einer Proteinkaskade aktiviert werden und mittels veränderter Transkription die zelluläre Antwort beeinflussen [Terada et al., 1999]. Sie spielen auch bei der Aktivierung von Monozyten eine Rolle. Dieser Familie gehören drei Subfamilien an, die p38 MAPK, die extrazellulär signal-regulierte Kinase (ERK 1/2) bzw. p44/p42 MAPK und die stress-aktivierte Proteinkinase (SAPK) bzw. c-Jun N-terminale Kinase (JNK) [Rao, 2000; Janeway et al., 2002,2]. Jede Familie von MAPK wird aktiviert durch eine Kaskade von zwei vorgeschalteten Kinasen, einer MAPK-Kinase-Kinase (MAPKKK) und einer MAPK-Kinase (MAPKK, auch MEK=MAPK oder ERK-Kinase-Kinase, MKK= MAP-Kinase-Kinase genannt) (Abb. I-5). Die MAPKKK wird durch Interaktion mit einem GTP-bindenden Protein der Ras/Rho-Familie als Antwort auf extrazelluläre Stimulation aktiviert. Sie ist eine Serin/Threonin-Kinase und aktiviert durch Phosphorylierung die MAPKK, die wiederum die MAPK durch Phosphorylierung an Threonin und Tyrosin eines Threonin-X-Tyrosin-Motivs in der Subdomäne VII aktiviert.

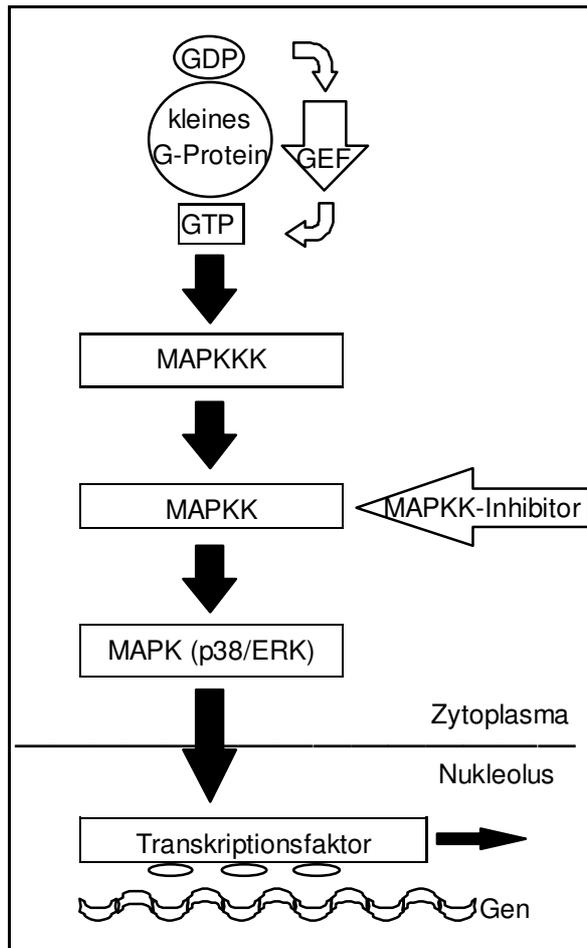


Abb. I-5: MAPK-Kaskade, GDP= Guanosindiphosphat; GTP= Guanosintriphosphat; GEF= Guanin nucleotide exchange factor; MAPK= mitogen-aktivierte Protein-kinase; MAPKK= MAPK-Kinase; MAPKKK= MAPKK-Kinase; ERK= extrazellulär signal-regulierte Kinase

Alle MAPK sind Serin/Threonin-Kinasen, die ihre Zielsubstrate an Serin oder Threonin gefolgt von einem Prolin phosphorylieren. [Roux und Blenis, 2004; Edmunds und Mahadevan, 2004]. Die phosphorylierten MAPK gelangen in den Nukleus, wo sie Transkriptionsfaktoren beeinflussen, die die Herstellung der mRNA von Genen nach sich ziehen [Schorey und Cooper, 2002]. In dieser Arbeit wurde die Expression der p38 MAPK und der ERK 2 in Monozyten untersucht, um die veränderte Immunantwort bei terminal niereninsuffizienten Patienten zu charakterisieren.

1.4.1. p38

Es gibt vier Formen der p38 MAPK ($\alpha, \beta, \gamma, \delta$), wobei p38 α die vorherrschende Form in Monozyten ist und p38 δ geringfügig vorkommt, p38 β und p38 γ kann in Monozyten nicht detektiert werden [Hale et al., 1999]. p38 wird u. a. durch inflammatorische Zytokine, Hitze, osmotischen Schock, UV-Licht und Oxidantien aktiviert [Schorey und Cooper, 2002]. Sie kann an der Stelle Threonin180/Tyrosin182 phosphoryliert werden, Stelle 181 ist mit Glycin besetzt. Es gibt diverse MAPKKK, die die MAPKK 3 und 6 (auch MEK oder MKK 3 und 6

genannt) aktivieren, die wiederum p38 aktivieren [Roux und Blenis, 2004]. p38 ist in die Produktion von Zytokinen, wie IL-1 und TNF- α nach Stimulation durch LPS in Monozyten involviert [Rabehi et al., 2001; Baldassare et al. 1999]. Bezüglich einer Apoptose-Induktion durch p38 liegen unterschiedliche Ergebnisse für verschiedene Zelltypen vor. In Phäochromozytom-Zellen (PC12), neuronalen Kulturzellen und Fibroblasten induziert es die Apoptose [DeZutter und Davis, 2001; Kummer et al., 1997]. Nemoto et al. postulieren eine Induktion von Apoptose durch p38 α und eine Inhibition durch p38 β in T-Lymphozyten Jurkat-Zellen [Nemoto et al., 1998]. In Bone-marrow-derived Macrophagen (BMM) können Jaworowski et al. keinen Zusammenhang zwischen der Aktivität von p38 und dem Auftreten von Apoptose feststellen [Jaworowski et al., 1999].

1.4.2. ERK 2

Es wurden bisher zwei Formen der ERK gefunden. ERK 1 und ERK 2 ähneln sich im Aufbau sehr und weisen das gleiche Substrat-spezifische Muster auf. Ihre spezifischen Funktionen sind noch nicht geklärt. In einer Studie an ERK 1 knockout Mäusen wird beobachtet, dass ERK 2 die Funktion von ERK 1 kompensieren kann. Das Fehlen von ERK 2 jedoch führt in der frühen Embryogenese zum Absterben der Zellen [Pagès et al., 1999; Pouysségur et al., 2002]. Es gibt Hinweise, dass nach Immunstimulation ERK 2 vermehrt aktiviert wird. Dies wurde bisher in PBMC, T- und B-Lymphozyten festgestellt [van der Voort, 2000]. ERK wird durch Wachstumsfaktoren, Serum, Tumor-Promotoren und andere mitogene Stimuli aktiviert [Schorey und Cooper, 2002]. Sie wird an den Stellen Threonin202/Tyrosin204 phosphoryliert, Stelle 203 ist mit Glutamat besetzt. Die bekannteste und am besten untersuchte Kaskade der ERK-Aktivierung beginnt mit dem G-Protein Ras, welches die MAPK-Kinase-Kinase c-Raf aktiviert. c-Raf phosphoryliert die MAPK-Kinasen 1 und 2 (auch MEK oder MKK 1 und 2), diese wiederum aktivieren ERK. Der spezifische ERK-Inhibitor U0126 hemmt die ERK-Aktivierung auf der Stufe von MAPKK 1 und 2 (Abb. I-5) [Janeway et al., 2002,2]. Insgesamt

ist eine Vielfalt von möglichen Folgen und Funktionen der ERK in der Literatur beschrieben. Verschiedene Stimulantien haben in verschiedenen Arten von Zellen eine unterschiedliche Folge der ERK-Aktivierung. Die Konsequenz ist abhängig von der Stärke und der Art der Stimulation. Unter bestimmten Bedingungen findet eine Zytokinproduktion und Differenzierung in bestimmten Zellen statt. Eine ERK-Aktivierung kann sowohl eine Apoptose als auch eine Hemmung der Apoptose nach sich ziehen. Ebenso sind unterschiedliche Ergebnisse in Bezug auf die Proliferation beschrieben worden, abhängig von Art, Dauer und Stärke eines Stimulus und der Art der Zelle [Pouysségur et al., 2002; Kurosawa et al., 2000; Rao, 2000; Rabehi et al., 2001; Guha und Mackman, 2001; Valledor et al., 2000; Jaworowski et al., 1999; Miranda et al., 2002]. In dieser Arbeit wurde untersucht, ob eine Regulation der ERK durch NI und/oder HD stattfindet.

1.5. Tissue factor (TF)

Patienten, die sich einer HD-Behandlung unterziehen müssen, leiden vermehrt an Athero-/Arteriosklerose. TF trägt zur Bildung der Athero-/Arteriosklerose bei, indem es über eine intravasale Gerinnungsaktivierung zur Thrombinbildung führt. Die extrinsische Gerinnungskaskade wird durch die Bindung von Faktor VII an TF auf aktivierten Zellen eingeleitet [Mercier et al., 2001]. Da Monozyten während der HD aktiviert werden und befähigt sind TF zu exprimieren, wurde in dieser Arbeit untersucht, ob Patienten nach der Dialyse eine veränderte Aktivität von TF gegenüber Gesunden aufweisen. TF (Tissue factor = Gewebsthromboplastin) ist ein membranständiges Glykoprotein und besteht aus einer Rezeptordomäne (für Faktor VII), einer zytoplasmatischen Domäne und einer löslichen extrazellulären Komponente. Er muss nicht durch proteolytische Aktivität aktiviert werden und aktiviert die extrinsische Gerinnungskaskade über Bindung an Faktor VII, der zu aktiviertem Faktor VIIa wird. Die Expression von TF in humanen Monozyten und TPH-1-Zellen wird durch LPS und

inflammatorische Zytokine über eine Aktivierung der ERK-Kaskade induziert [Guha et al., 2001]. Auch Adhäsionsmoleküle wie VLA4-Integrine induzieren in TPH-1-Zellen die TF-Expression über ERK [McGilvray et al., 1997]. Ohsawa et al. allerdings fanden heraus, dass TF in TPH-1 und U937-Zellen über eine Aktivierung der p38-Kaskade durch Proteaseinhibitoren induziert wird, ohne dass ERK involviert ist [Ohsawa et al., 2003].

1.6. Zielsetzung

Die terminale NI reduziert die Lebensqualität und Lebenserwartung nachhaltig und führt zu einer enormen Kostenbelastung des Gesundheitssystems. Risikofaktoren müssen identifiziert werden und eine Prävention etabliert werden.

Infektionen spielen bei vielen Patienten eine erhebliche Rolle und führen häufig zur Hospitalisierung und stehen mit 16% an erster Stelle der Mortalität. Mit dieser Arbeit sollte versucht werden, eine Monozytenfehlfunktion, die mitverantwortlich für den Immundefekt ist, näher zu charakterisieren. Es wurde nach Faktoren gesucht, die für die mangelnde Immunkompetenz verantwortlich sind, um zu einem besseren Verständnis der zellbiologischen Veränderungen zu kommen und mögliche Therapieansätze zu erkennen. Folgende Fragen sollten geklärt werden:

1. Werden MAPK, die die Proliferation, Apoptose und Zytokinproduktion von Monozyten regulieren, durch die NI verändert und welche Konsequenzen hat diese mögliche Veränderung auf das Verhalten der Monozyten?
2. Welchen Effekt hat die Hämodialyse? Können eventuelle Fehlfunktionen durch Dialyse kompensiert werden?

Zusätzlich sollte in der Arbeit eine mögliche Ursache für die erhöhte Inzidenz von Arterio- und Atherosklerose bei dialysepflichtigen Patienten

untersucht werden. Es sollten Faktoren identifiziert werden, die eine Rolle in der Pathogenese spielen.

3. Könnte eine vermehrte TF-Expression in Monozyten von HD-Patienten für die vermehrte Athero-/Arteriosklerose und die dadurch häufiger auftretenden kardiovaskulären Ereignisse verantwortlich sein?

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1. Patienten und Kontrollen

Das Patientenkollektiv bestand aus 33 Patienten, davon 22 Männer und 11 Frauen. Das Alter betrug im Mittel 54 Jahre +/- 15 Jahre (von 20-79 Jahre). Die durchschnittliche Dialysedauer betrug dreimal in der Woche ca. vier Stunden. Es wurde ein Polysulfanmembran-Kapillardialysator von Fresenius verwendet. Die Patienten waren seit 14 Monaten +/- 6 Monate dialysepflichtig, die zur Dialysepflichtigkeit führenden Erkrankungen waren Glomerulonephritis, Refluxnephropathie, interstitielle Nephritis und polyzystische Nieren. Es bestand bei den Patienten keine Infektion, keine maligne Erkrankung und kein Eisenüberschuss.

Als Kontrollen dienten 26 gesunde Probanden zwischen 22 und 42 Jahren, davon 16 Männer und 10 Frauen. Das Durchschnittsalter betrug 28 Jahre +/- 5 Jahre. Die Probanden befanden sich alle in guter körperlicher Verfassung, waren normgewichtig, nahmen keine Medikamente und hatten zum Zeitpunkt der Blutentnahme keine Infektionen.

Es wurden 50 ml peripheres venöses Blut in Perfusorspritzen abgenommen. Bei den Patienten erfolgte die Blutentnahme unmittelbar vor bzw. nach der Hämodialyse.

2.2. Materialien

2.2.1. Geräte

Tabelle II-1: Geräte

Art	Firma	Bezeichnung
Allgemeines		
Steribank	Heraeus	LaminAir HA 2472 GS
Mikrowelle	Sharp	R-2V16
pH-Meter	Schott	pH-Meter CG 840
Mikroskop	Zeiss	Telaval 31
Vortex	Snijders	press-to-mix 34524
Bunsenbrenner	Schütt	GASl
Zählkammer	Brand	Neubauer Improved

2. Material und Methoden

Elisa-Reader	Tecan	Spectra Mini AP
Software WinFitting		
Feinwaage	Sartorius	RC 210 D
Waage	Sartorius	LP 1200 S
Western Blot		
Thermoblock	Techne	Dri Block DB 2A
Elektrophoresezelle	Novex	XCell 2 Mini Cell
Bloteinsatz	Novex	XCell 2 Blot Module
Spannungsquelle	Biometra	Power Pack P 25
Schüttel-Rotor	Janke&Kunkel	IKA-Vibrax-VXR
Kamera	INTAS	Cosmicar
UV-Schirm	Rothhaar&Schroeder	Quick Store
Video Monitor	Rothhaar&Schroeder	Monacor B&W Monitor
Video Copy Processor	Rothhaar&Schroeder	Model P67E
Auswertungsprogr.		BioDocAnalyze
FACS		
Flow Cytometry	Becton Dickinson	FACScan
Cytometry Monitor	Hewlett Packard	98785 A
Cytometry PC	Hewlett Packard	9000 340
Cytometry Programm		Lysis II
Auswertungsprogr.		WinMDI
Zentrifugen		
Zentrifuge, Rotor 3042	Heraeus Sepatech	Biofuge 28 RS
Zentrifuge	Beckman	Model TJ-6 Centrifuge
Mikrotischzentrifuge	Rothhaar&Schroeder	Uniequip UEC 3
Kühl- und Wärmeschränke		
Wärmeschrank	Heraeus	electronic B 5050 E
Brutschrank	Heraeus	electronic
Kühlschrank, +4 °C	Bosch	Cooler
Gefrierschrank, -20 °C	AEG	Ökö Arctis
Gefrierschrank, -80 °C	Sanyo	VIP series MDS-U70V
Kühlschrank, +4 °C	Bosch	
Gefrierschrank, -20 °C	Bosch	

2.2.2. Arbeitsmaterialien

Tabelle II- 2: Arbeitsmaterialien

Art	Firma	Bezeichnung
Pipetten		
Pipetus	Hirschmann	Pipetus-akku
Glaspipetten, 5 u. 10 ml	Falcon	
Eppendorf-Pipette	Eppendorf	Eppendorf
Pipettenspitzen	Sarstedt	

2. Material und Methoden

Multipipette	Eppendorf	
Combitips, 12,5 ml	Eppendorf	
Röhrchen		
Bluecap=PP Tube	Greiner/Cellstar	
Ficoll-Bluecaps	Greiner/Cellstar	
Microtube, 1,5 ml	Sarstedt	
Cryotube	Greiner/Cellstar	
FACS-Röhrchen	Falcon	Polystremer RB Tube
Gewebe-Kulturplatte		
24-Well, flat bottom	Becton Dickinson	Multiwell Primaria
96-Well	Greiner/ Cellstar	Micro-Platte
Western Blot		
Filterpapier	Schleicher & Schuell	
Blot Membran	Roche	PVDF Membranes
Erlenmeyer-Kolben	Hirschmann	
Schwämme		
Hamilton-Spritze, 50 µl		
Pinzette	Inox-Aesculap	LHU/DA 231
Plastiktöpfe	Buchsteiner	
Sonstiges		
Rührfisch	Heidolph	MR 2002
3,5-Disketten 1,44 MB		
Perfusorspritzen, 50 ml	Braun	
Spritzen, 10 ml	Luer	
Sterilfilter	Nalgene	Spritzenfilter
Handschuhe, unsteril	Kimberley-Clark	
Folie	America National Can	Parafilm M

2.2.3. Reagenzien

- Zusammensetzung des 5%-FCS-Kulturmediums
 - RPMI-1640-Kulturmedium von PAA Laboratories
 - + 5 % Fetales Kälberserum (FCS) von Biochrom
 - + 100 µg/ml Penicillin/ Streptomycin von Biochrom
 - + 10 mM HEPES-Buffer von Biochrom
 - + 2 mM L-Glutamin von Invitrogen
 - + 48,6 µM Mercaptoethanol von Sigma
- Puffer
 - Duplecco's PBS-Puffer von PAA Laboratories
 - PBS (w/o) ohne $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$

2. Material und Methoden

PBS (w) mit $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$

➤ DTT-Lysepuffer

3 mg Dithiothieitol (DTT) von Sigma auf
10 ml Triton-X-100 von Merck

➤ NuPage Puffer für Western Blots

NuPage LDS Sample Buffer (4x) von Invitrogen

NuPage MOPS SDS Running Buffer (20x) von Invitrogen, 1:19
verdünnt mit Aqua dest.

NuPage Transfer Buffer (20x) von Invitrogen, 1:19 verdünnt mit
Aqua dest.

➤ TTBS-Puffer

4 g Tris-Cl von Sigma und

4,4 g NaCl von Merck in 1 l Aqua dest. gelöst

+ 500 µl Tween 20 von Merck;

ph= 7,4 eingestellt mit Natronlauge 1 M von Bernd Kraft GmbH

➤ FACS-Puffer

250 mg Natrium-Azid von Merck in 500 ml PBS (w)

+250 µl FCS

➤ Saponin-Puffer

0,1 g Saponin von Sigma und 1 g BSA von Merck in 98 ml
PBS (w) und 2 ml Hapes-Buffer von Biochrom

• Antikörper und Inhibitoren

Primäre Antikörper

➤ Anti-human p38 (N-20) Antikörper von Santa Cruz, 38 kDa,
goat polyclonal IgG, 200 µg/ml in einer Verdünnung von
1:2000 eingesetzt, also 0,1 µg/ml

➤ Anti-human pp38 (D-8) Antikörper von Santa Cruz, 38 kDa,
mouse monoclonal IgM, 200 µg/ml in einer Verdünnung von
1:100 eingesetzt, also 2 µg/ml

➤ Anti-human ERK 2 (D-2) Antikörper von Santa Cruz, 42 kDa,
mouse monoclonal IgG2b, 200 µg/ml in einer Verdünnung von
1:1000 eingesetzt, also 0,2 µg/ml

2. Material und Methoden

- Anti-human Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase (GAPDH) Antikörper von Chemicon, 40 kDa, mouse monoclonal IgG, 1 mg/ml in einer Verdünnung von 1:1000 eingesetzt, also 1 µg/ml
- FITC-conjugated Mouse Anti-human PCNA von BD Biosciences Pharmingen

Sekundäre Antikörper

- Peroxidase-conjugated AffiniPure Donkey Anti-goat IgG(H+L), 800 µg/ml in einer Verdünnung von 1:5000 eingesetzt, also 0,16 µg/ml
- Anti-mouse-IgG-POD, Fab-fragments from sheep, Peroxidase-konjugiert, 300 U/ml von Boehringer Mannheim, in einer Verdünnung von 1.5000 eingesetzt, also 0,06 U/ml

Inhibitor

- ERK-Inhibitor U0126 (MEK1/2 Inhibitor) von Cell Signaling in DMSO gelöst

- Sonstiges

- Lymphozytentrennmedium LSM 1077 (Ficoll-Lösung) von PAA Laboratories
- Heparin von Biochrom (5000 U/ml) gelöst in
- Aqua ad injectabilia von Boehringer Ingelheim/Delta Pharma
- DMSO von Sigma
- BSA (bovine serum Albumin fraction V) von Merck
- Bio-Rad Protein Assay von Bio-Rad Laboratories
- Aqua dest. aus der Apotheke Uniklinik Münster
- Prestained SDS-PAGE Standards, Broad Range von Bio-Rad Laboratories
- NuPage 4-12 % Bis-Tris Gel von Invitrogen
- Methanol von Merck
- BM Blue POD Substrat, präzipitierend von Roche
- Paraformaldehyd 4 % von Sigma, pH= 7,4
- Actichrome TF-Kit von American Diagnostics

mit lyophilisiertem Human Factor VIIa, X und Spectrozyme®-Xa, die alle in Aqua dest. gelöst werden und

Assay Buffer

- Eisessig von Merck

2.3. Monozytenseparation

In einem Bluecap wurden 50 ml heparinisieretes Vollblut für 15 min bei 1600 rpm zentrifugiert. Das im Überstand befindliche Plasma wurde mit einer Pipette weitestgehend abgenommen und verworfen. Das im Bluecap verbleibende Sediment wurde mit kaltem PBS (w/o) bis auf 50 ml aufgefüllt und resuspendiert. Zwei Ficoll-Bluecaps, die in Höhe der Markierung 15 ml eine 2,5 mm dicke Polyestermembran enthalten, wurden mit je 15 ml Ficoll-Lösung befüllt und 10 min bei 1600 rpm zentrifugiert, so dass die Ficoll-Lösung unter den Filter gelangte. Der Filter wurde vorsichtig mit je 25 ml der Blut-PBS-Lösung überschichtet und das Bluecap 20 min bei 2200 rpm zentrifugiert, wobei der Auslauf der Zentrifuge ohne Bremse vorzunehmen war, um Verwirbelungen der

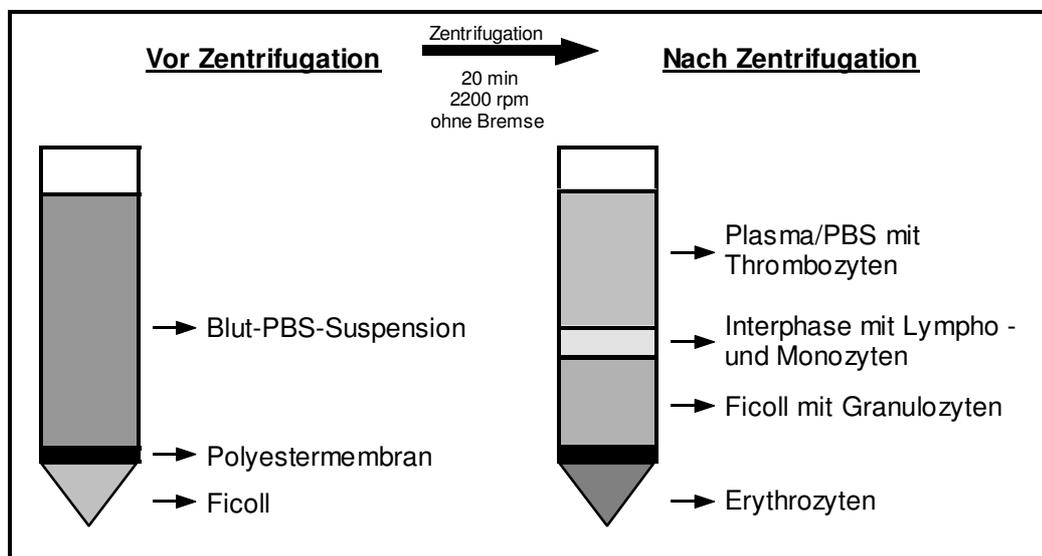


Abb. II-1: Trennung der Blutbestandteile durch Dichtegradientenzentrifugation

entstehenden Schichten zu verhindern. In dieser Dichtegradientenzentrifugation trennten sich Erythrozyten, Granulozyten, Thrombozyten und mononukleäre Zellen voneinander und es ergab sich die in Abb. II-1 gezeigte Auftrennung der Blutbestandteile. Die

Interphase, in der die Monozyten und Lymphozyten enthalten waren, wurde aus dem Ficoll-Bluecap pipettiert, in ein frisches Bluecap gegeben, mit PBS (w) aufgefüllt und bei 1600 rpm für 10 min zentrifugiert. Es bildete sich ein Pellet, welches nach Verwerfen des PBS erneut in 50 ml PBS (w) resuspendiert und nochmals wie zuvor zentrifugiert wurde, um Ficoll-Lösungsreste herauszuwaschen. Nach der Resuspendierung des Pellets in 10 ml 0%-RPMI-1640-Kulturmedium folgte die Zählung der Zellen. Dazu wurden 50 µl der Zellsuspension 1:10 verdünnt und davon die in 0,1 µl Medium enthaltenen Monozyten mit der Neubauer-Zählkammer (16 Felder= 1 mm² x 0,1 mm= 0,1 mm³= 0,1 µl) gezählt. Nach der Hochrechnung der Zellzahl in den 10 ml ($\times 10^6$) wurde die Zellsuspension dann soweit mit 0%-Medium weiter verdünnt, dass man die gewünschte Zelldichte von 5-7 Mio Zellen/ml erhielt. Die Monozytenanreicherung erfolgte mittels Adhärenz. Die 24-Well-Kulturplatten wurden mit Zellsuspension befüllt (1 ml/Well), es wurde eine Inkubation der Platten für eine Stunde bei 37 °C und 5%iger CO₂-Atmosphäre im Brutschrank durchgeführt. Die Monozyten adhärirten aufgrund ihrer Oberflächenstruktur in den Wells. Durch zweimaliges Waschen der Wells mit 1 ml PBS (w) wurden die nicht adhärenenten Lymphozyten entfernt. Die in den Wells verbliebenen Monozyten wurden in Kultur gebracht und entsprechend der Fragestellung stimuliert.

2.4. Kultur und Stimulation

Nach der einstündigen Inkubation der Zellen mit 0%-Medium und dem Waschvorgang der Wells mit PBS (w) folgte für die Probenbestimmung mittels Western Blot das Auffüllen der 24-Well-Platten mit je einem Milliliter 37 °C bzw. 47 °C warmen 5%-FCS-Medium. Die 37°C-Platte wurde in den 37 °C warmen Brutschrank gestellt, während die Platte mit 47 °C warmen Medium zunächst 40 min in einem Brutschrank bei 47 °C inkubiert und erst anschließend in den 37°C-Brutschrank überführt wurde. Die Inkubation beider Platten erfolgte danach für 12-18 Stunden.

Für die FACS-Analyse auf PCNA und Aktivitätsbestimmung von TF wurden die Zellen in 5%-Medium inkubiert. Es wurde ERK-Inhibitor in Konzentrationen von 0 μM , 20 μM und 50 μM hinzugefügt. Die Inkubation der Zellen dauerte ebenfalls 12-18 Stunden bei 37 °C.

2.5. Proteingewinnung und -bestimmung Western Blot

2.5.1. Proteingewinnung

Nach der Inkubation wurde das Medium verworfen, die Wells einmal mit PBS (w/o) gewaschen und die 24-Well-Platten mit PBS (w/o) für ca. 20 min auf Eis gestellt, wodurch sich die Monozyten vom Boden der Platte lösten. Durch mehrmaliges Spülen mit der Pipette wurden restliche Zellen zusätzlich mechanisch gelöst und die Monozyten konnten dann in Bluecaps pipettiert werden. Durch Zentrifugation bei 2000 rpm für einige Minuten setzten sie sich als Pellet ab und wurden nun je nach Größe des Pellets in 60-200 μl einer 0,5%igen Triton-X-100-Lösung mit DTT als Proteaseinhibitor (300 mg/l) resuspendiert und in 1,5 ml Zentrifugenröhrchen überführt. Nach 10 min Inkubation bei Raumtemperatur folgte die Zentrifugation bei 22000 rpm und 4 °C für 30 min. Die so erhaltenen Zelllysate wurden bis zur Aufbereitung bei minus 80 °C eingefroren.

Die Ausbeute an Protein pro Probenansatz war unterschiedlich groß, da nicht immer die gleiche Anzahl von Monozyten zu isolieren waren. Daher war die Proteinmenge nicht für alle geplanten Ansätze ausreichend, so dass sich in einzelnen Untersuchungen z.T. nicht für jeden Ansatz die identische Anzahl von Patienten und Kontrollen ergab. Insgesamt waren aufgrund von Schwierigkeiten bei der Patientenrekrutierung die Fallzahlen klein.

2.5.2. Proteinbestimmung

Die Messung der Proteinmenge im Lysat erfolgte mittels Bio-Rad-Assay auf einer 96-Well-Platte. Alle Ansätze wurden als Doppelansatz pipettiert. Die erste Spalte wurde mit je 100 μl Standardlösungen, hergestellt aus BSA in PBS (w/o) zu Konzentrationen mit 0; 5; 10; 20; 40; 60; 80 und

100 µg/ml befüllt. Zu je 99 µl Aqua bidest. wurde 1 µl Zellysat in die Wells pipettiert. Allen Wells wurde nun 100 µl 40%iges Bio-Rad Protein Assay hinzugefügt und der Inhalt eines jeden Wells vermischt. Die Auswertung erfolgte mittels Extinktionsmessung im Elisa-Reader mit

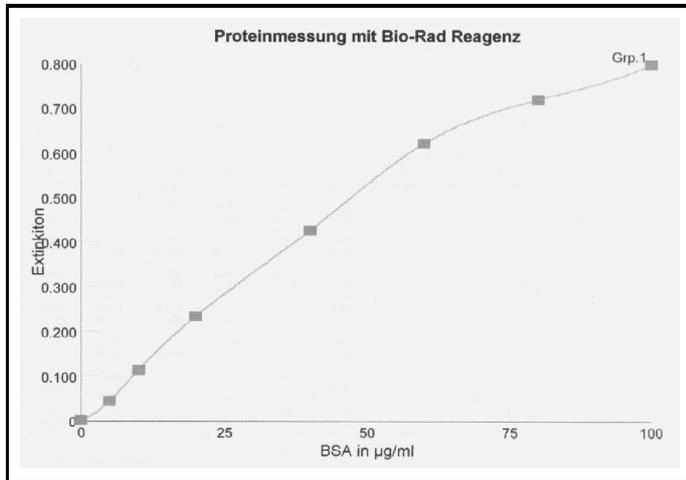


Abb. II-2: Standardproteinkurve

einem 590 nm Filter. Der Computer (Programm WinFitting) berechnete eine Standardkurve aus der Standardreihe (Abb. II-2) und errechnete anhand dieser die Konzentrationen der Proben. Nach der

Rausrechnung der vorgenommenen Verdünnung erhielt man Werte zwischen 1,5 und 19 µg Protein/µl Lysat.

2.6. Western Blot

2.6.1. Prinzip

Die Proteine des Zellysats wurden im Western Blot durch Auftragen auf ein Gel nach Größe und Ladung elektrophoretisch aufgetrennt und anschließend auf eine PVDF Blot Membran übertragen (geblottet). Auf dieser wurden nur die interessierenden Proteine mittels spezifischer Antikörper in Form von Banden angefärbt, deren Farbintensität der Konzentration an Protein entspricht. Nach einer digitalen Fotografie der Membran ordnete das Computerprogramm BioDocAnalyse der Farbintensität einer Bande einen relativen Zahlenwert zu, um die Banden zu quantifizieren und biometrisch vergleichbar zu machen.

2.6.2. Methode

2.6.2.1. Probenvorbereitung

Alle Arbeitsschritte des Western Blots wurden grundsätzlich mit Handschuhen durchgeführt, um Verunreinigungen der Proben mit

eigenen Proteinen zu verhindern. Nach Auftauen der Zellysate wurden 25 µg Protein gemäß der Proteinmessung pro Probenansatz in ein Microtube gegeben. Jeder Ansatz wurde bis auf 16 µl mit Aqua dest. aufgefüllt und zusätzlich mit 4 µl LDS Sample Buffer vermischt. Man stellte die Proben für 5 min in einen auf 100 °C vorgeheizten Thermoblock, wobei die Proteine mit Lithiumdodecylsulfat (LDS) beladen und entfaltet wurden. Anschließend wurde ca. 1 min bei 13000 rpm zentrifugiert, um entstandenes Kondenswasser am Microtube-Deckel zurückzuführen.

2.6.2.2. Gelelektrophorese

Das mit Aqua dest. abgespülte Gel wurde in die Elektrophoresekammer eingesetzt und die innere und äußere Kammer wurden mit einfach konzentriertem Running Buffer befüllt und mittels Pipette vom Schaum befreit. Nach dem Entfernen des Kamms aus dem Gel wurden die Taschen vorsichtig mit dem Running Buffer gespült. Mit der Hamilton-Spritze wurde die erste Geltasche mit 10 µl SDS-PAGE Standard und die restlichen Geltaschen mit den jeweiligen 20 µl Probe befüllt. Der Deckel wurde angebracht und für 70 min eine Spannungsquelle mit 200 V angeschlossen. Eine optische Kontrolle der Elektrophorese war über die Auftrennung des angefärbten Standards möglich.

2.6.2.3. Blot

Die Vorbereitung des Blots bestand im Zurechtschneiden von vier Stücken Filterpapier und einer Blot Membran. Vier Schwämme und die Filterpapiere wurden im einfach konzentrierten Transfer-Puffer getränkt, die Blot Membran ebenfalls, nachdem sie aber zunächst ca. 30 s in Methanol gelegen hatte, um eine Befeuchtung der hydrophoben Membran erst zu ermöglichen. Nach der Elektrophorese wurde die Plastikummantelung des Gels an den Seiten aufgeknackt, das Gel auf zwei übereinander-liegende Stücke Filterpapier übertragen und mit der Blot Membran und zwei Stücken getränktem Filterpapier bedeckt. Es sollten sich keine Luftblasen zwischen den Schichten des Blots befinden. In der Kathodenschale wurde dieser Blot auf zwei der nassen

Schwämme gelegt und mit zweien bedeckt. Es war unbedingt darauf zu achten, dass das Gel der Unterseite der Blotwanne anliegend ist und die

Membran zum Deckel, der Anodenseite, zeigte (Abb. II-3). Das Blot Modul wurde eingebaut und mit Transfer-Puffer aufgefüllt. Nach Anbringen des Deckels wurde die

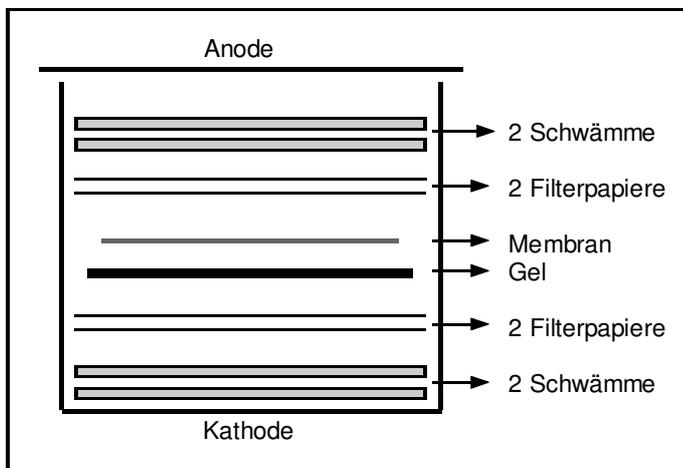


Abb. II-3: Zusammensetzung des Blots

Spannungsquelle für ca. 60 min bei 80 V angeschlossen. Der Transfer des Proteins konnte anhand des prestained Standards, der nach dem Blot auf der Membran sichtbar sein sollte, beurteilt werden.

2.6.2.4. Proteinmarkierung/Antigendetektion/Anfärbereaktion

Nach dem Blot wurde die Membran für mindestens 60 min bei Raumtemperatur in TTBS-Puffer leicht geschüttelt, um proteinfreie Stellen der Membran zu blockieren und spätere unspezifische Bindungen zu vermeiden. Es folgte die Inkubation mit dem primären Antikörper für 60 min. Je nach Versuch erfolgte die Bindung von goat anti-human p38-, mouse anti-human pp38- oder mouse anti-human ERK-Antikörpern an die entsprechenden Proteine auf der Membran. Nach dreimaligem je fünfminütigem Waschgang in TTBS-Puffer wurde die Membran für ca. 10 min mit einem zweiten primären Antikörper, welcher gegen humanes GAPDH gerichtet war, beladen. GAPDH wurde als Standard-Proteinbande angefärbt. Auf ein nochmaliges Waschen mit TTBS-Puffer für dreimal fünf Minuten folgte die Inkubation mit dem sekundären Antikörper, der sich an die Fc-Fragmente der primären Antikörper band. Bei p38 war dies ein anti-goat, bei den restlichen primären Antikörpern ein anti-mouse Antikörper. Nun wurde die Membran nochmals wie zuvor gewaschen. Die Banden des Blots wurden mittels BM Blue POD

Substrat sichtbar gemacht, indem durch an die sekundären Antikörper gebundene Enzyme eine Farbreaktion katalysiert wurde, die das Protein in Form einer blauen Bande sichtbar machten. Die Farbintensität der Banden entsprach den Konzentrationen an Protein. Die Membran wurde fotografiert, als Bilddatei gespeichert und der Intensität der Banden wurde mit dem Computerprogramm BioDocAnalyse ein relativer Zahlenwert zugeordnet, um die vorhandenen Proteinmengen vergleichen zu können. Die Proteinbandenintensitäten wurden als prozentuale Expression im Bezug auf die GAPDH-Expression angegeben.

2.7. Durchflusszytometrie

2.7.1. Prinzip

Die Durchflusszytometrie, auch als FACS (fluorescence-activated cell sorter) bezeichnet, ist ein Verfahren der Zellanalyse mit Hilfe Fluoreszenzfarbstoffmarkierter Antikörper. Die Zellen werden durch eine Kapillare gesogen und an einem Laser vorbeigeleitet. Es gibt fünf Detektoren, die beim Vorbeifließen der Zellen die Streuung des Lichts und die Fluoreszenz messen. Anhand der Streuung misst der FSC (Forward-Scatter)-Detektor die Größe, der SSC (Sideway-Scatter)-Detektor die Granularität der Zellen. In einem Diagramm werden diese beiden Parameter gegeneinander aufgetragen. Eine Differenzierung der verschiedenen Zellpopulationen wie Lymphozyten mit niedriger Granularität bei geringer Größe und Monozyten mit hoher Granularität und Größe ist so möglich. Man kann Populationen digital aussortieren und des Weiteren nur die Fluoreszenz bestimmter Zellen messen (Abb. II-4). Die Fluoreszenz wird von den drei weiteren Detektoren registriert, wobei der erste, als FL-1 bezeichnet bei einer Wellenlänge von 535 nm (grün), der zweite FL-2 bei 580 nm (orange) und der dritte FL-3 bei 680 nm (rot) detektiert. Die Zellen wurden mit einem oder zwei Antikörpern beladen, die Substanzen gebunden haben, die je in einem dieser Wellenlängenbereiche fluoreszieren. In meinem Fall wurden die Monozyten nur mit einem FITC (**F**luorescein **I**sothiocyanate)-

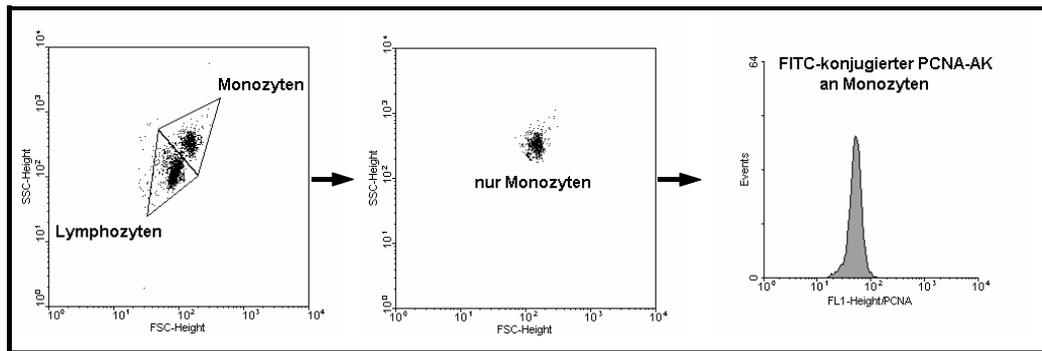


Abb. II-4: Auswertung der Durchflusszytometrie

konjugiertem Antikörper inkubiert, der bei 535 nm fluoresziert und somit in der FACS-Analyse bei FL-1 gemessen wurde.

2.7.2. Methode

Nach der 12-18-stündigen Inkubation erfolgte die Beladung der Zellen mit dem FITC-konjugierten PCNA-Antikörper. PCNA steht für proliferating cell nuclear antigen und ist ein Marker für die zelluläre DNA-Synthese, diese wiederum für die Proliferation der Zellen. Je mehr PCNA die Zellen binden, desto mehr Proliferation hat stattgefunden. Das Medium der 5%-Ansätze wurde abgenommen und zur Tissue factor Aktivitätsmessung bei -80 °C eingefroren. Die Wells wurden mit 1 ml PBS (w/o) gefüllt, für 20 min auf Eis gestellt, um die adhärenenten Zellen zu lösen. Der Inhalt der Wells wurde in FACS-Röhrchen überführt und bei 2000 rpm für 2 min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und das Pellet in 1 ml FACS-Puffer resuspendiert und erneut wie zuvor zentrifugiert. Es folgte die Fixierung der Zellmembranen in 100 µl 4%igem Paraformaldehyd für 10 min bei 4 °C. Es wurde 1 ml FACS-Puffer hinzu gegeben, erneut 2 min bei 2000 rpm zentrifugiert und jedes Pellet in 105 µl PCNA-Saponin-Gemisch, welches kurz vorher aus je 5 µl PCNA-Reagenz und 100 µl Saponin pro Ansatz zusammengemischt worden war, resuspendiert. Die Inkubation erfolgte für 30 min bei 4 °C. Saponin permeabilisiert die Zellmembran, damit PCNA-Antikörper ins Zellinnere gelangen können, um dort an PCNA zu binden. Anschließend wurde 1 ml FACS-Puffer hinzugefügt, wie vorher zentrifugiert und das

Pellet in 500 µl FACS-Puffer aufgenommen. Die Messung erfolgte am FACS-Scan Gerät und wurde am Computer mit dem Programm WinMDI ausgewertet.

2.8. Aktivitätsmessung von Tissue factor

Im zuvor abgefrorenen Kulturmedium, in dem Patienten- bzw. Kontrollmonozyten inkubiert worden waren, wurde mithilfe des chromogenen Assays die Aktivität des Tissue factor festgestellt. Tissue factor ist ein Transmembranprotein, welches in Verbindung mit Factor VIIa der Gerinnungskaskade Faktor X zu Faktor Xa umwandelt. Im chromogenen Assay wurde Spectrozyme®-Xa verwendet, welches von Xa gespalten wurde und dabei das chromophore para-Nitroanilin freisetzte, dessen Quantität im Elisa-Reader gemessen wurde. Die Aktivität des Tissue factor im Kulturmedium wurde in relativen Einheiten angegeben. Die Messung erfolgte auf einer 96-Well-Platte im Doppelansatz. Bis auf Eisessig waren alle benötigten Reagenzien im Actichrome TF-Kit enthalten. Zunächst füllte man jedes Well mit 50 µl Assay Buffer, 25 µl Faktor VIIa, 25 µl Faktor X und 25 µl des zu messenden Kulturmediums. Die Platte wurde dann 15 min bei 37 °C inkubiert, bevor 25 µl Spectrozyme®-Xa hinzugefügt wurden und eine erneute Inkubation bei 37 °C für 60 min stattfand. Die Gelbfärbung der Lösung diente als optische Kontrolle für das Funktionieren der oben beschriebenen Reaktionskaskade. Die Reaktion wurde durch die Zugabe von 50 µl Eisessig gestoppt und die Messung im Elisa-Reader erfolgte bei einer Wellenlänge von 405 nm.

2.9. Statistische Methoden

Die Ergebnisse wurden als Mittelwerte (MW) +/- Standardabweichung (SD) angegeben. Zur statistischen Analyse wurden nicht parametrische Tests angewendet, da alle Stichproben quantitativ stetige Merkmale darstellten, die nicht sicher normalverteilt waren. Es wurden der Wilcoxon-Test für verbundene und der U-Test nach Mann-Whitney-

2. Material und Methoden

Wilcoxon für unverbundene Stichproben verwendet. Das Signifikanzniveau wurde bei $p < 0,05$ festgelegt.

3. ERGEBNISSE

3.1. Expressions-Zeitkinetik der p38 MAPK

Zunächst wurde aus kultivierten Monozyten einer gesunden Kontrollperson die Stärke der Expression von p38 in Abhängigkeit von der Inkubationszeit im Western Blot bestimmt. Die Inkubationszeiten

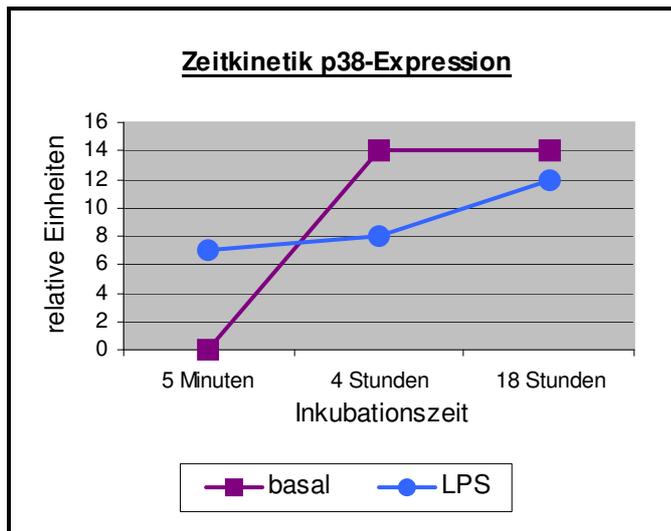


Abb. III-1: Zeitkinetik, LPS= Lipopolysaccharide

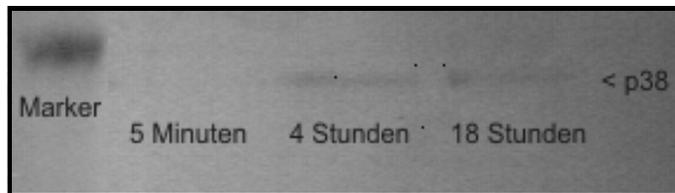


Abb. III-2: Western Blot Zeitkinetik p38 basal

betragen fünf Minuten, vier Stunden oder 18 Stunden. Die Zellen wurden in 5%-FCS-Medium (=basal) kultiviert oder mit 5%-FCS-Medium mit LPS stimuliert. LPS ist ein Endotoxin gram-negativer Bakterien, das an Monozyten bindet und diese dadurch aktiviert. Unter basalen Bedingungen war nach einer Inkubationszeit von vier

bzw. 18 Stunden die höchste p38-Expression nachzuweisen. Die p38-Expression nach LPS Stimulation war zeitabhängig. Eine Inkubation von 18 Stunden zeigte die stärksten Signalintensitäten (Ab. III-1 und 2). Bei allen folgenden Untersuchungen wurden die Monozyten zwölf bis 18 Stunden in 5%-FCS-Medium und dem Versuchsprotokoll entsprechender zusätzlicher Stimulation inkubiert.

3.2. Regulation der MAPK durch Niereninsuffizienz

3.2.1. Regulation der p38/pp38

Die Expression von p38 wurde mittels Western Blot an Patienten und Gesunden unter basalen Bedingungen, das heißt bei 37 °C und ohne

3. Ergebnisse

weitere Stimulation gemessen. Nach Überprüfung von fünf Proben konnte kein signifikanter Unterschied der Expression von p38 zwischen Patienten und Kontrollen festgestellt werden. Tendenziell exprimierten Patienten weniger p38 als Gesunde. Die Werte sind als Mittelwerte +/- Standardabweichung in Abb. III-3 dargestellt, die Abbildung eines Western Blot ist in Abb. III-8 integriert.

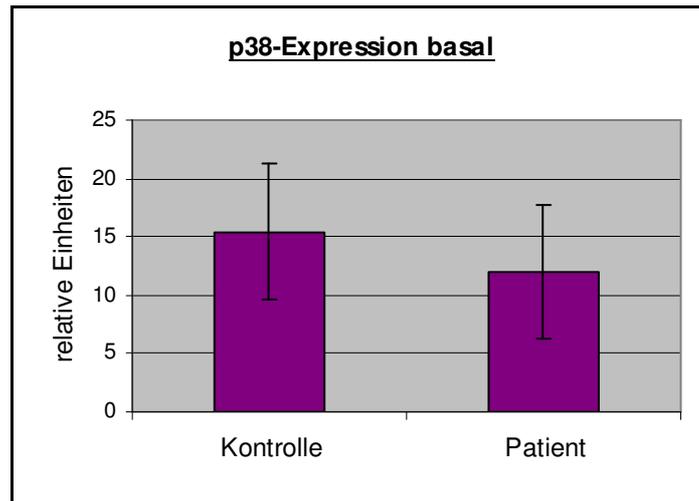


Abb. III-3: Basale Expression der p38 MAPK; MW +/- SD

Tabelle III-1: Basale Expression der p38 MAPK

	Kontrolle	Patient
Mittelwert	15,44	12
Anzahl	5	5
SD	5,80	5,73

In weiteren Messungen wurde die Expression der aktivierten Form der p38 gemessen. Der Antikörper gegen pp38 detektiert nur die an der Stelle Tyr 182 phosphorylierte und somit aktivierte Form der p38 MAPK. Doch auch bei der pp38 MAPK konnten keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden und zeigten somit nur eine Tendenz zur verminderten Expression bei Patienten. Eine Darstellung der Ergebnisse findet sich in Abb. III-4, ein Western Blot auf pp38 MAPK ist in Abb. III-5 abgebildet.

3. Ergebnisse

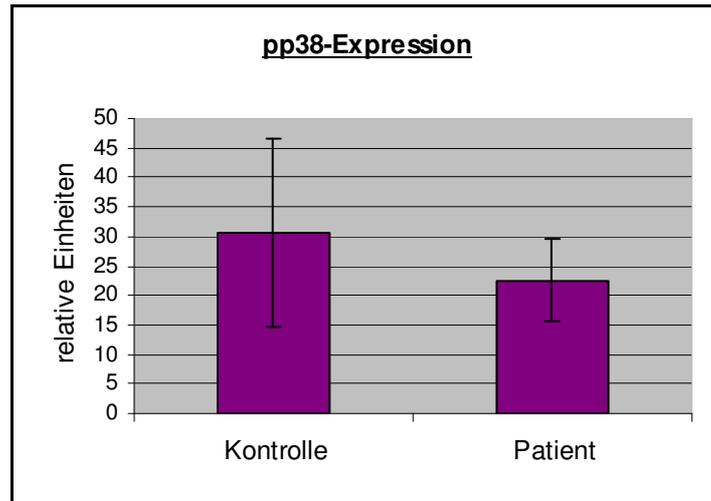


Abb. III-4: Basale Expression der pp38 MAPK; MW+/-SD

Tabelle III-2: Basale Expression der pp38 MAPK

	Kontrolle	Patient
Mittelwert	30,57	22,56
Anzahl	7	9
SD	16,00	8,20

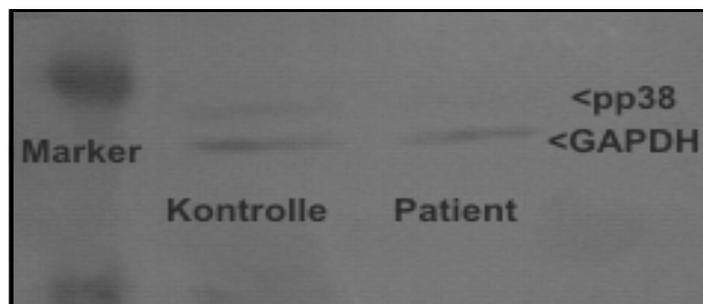


Abb. III-5: Western Blot der pp38 MAPK basal

3.2.2. Regulation der ERK

ERK wurde auf der Suche nach Expressionsunterschieden ebenfalls bei niereninsuffizienten Patienten und Gesunden vergleichend bestimmt. Es ergab sich auch hier eine Minderung der Expression der MAPK in Monozyten von Patienten, jedoch ebenfalls ohne signifikanten Unterschied, wie Abb. III-6 zeigt.

3. Ergebnisse

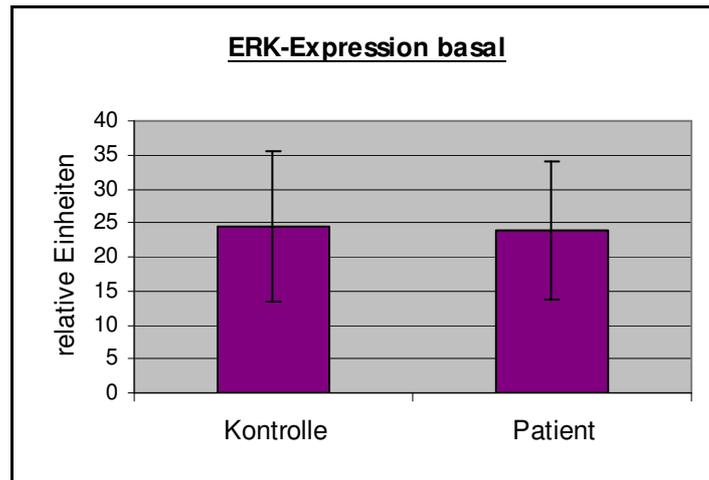


Abb. III-6: Basale Expression der ERK MAPK; MW+/-SD

Tabelle III-3: Basale Expression der ERK MAPK

	Kontrolle	Patient
Mittelwert	24,5	23,81
Anzahl	12	16
SD	11,12	10,16

3.3. Expression der MAPK unter Stress

Da bei den Patienten unter Niereninsuffizienz eine zwar nicht signifikante, aber durchgehend erkennbare Minderung der Expression von MAPK erkennbar war, wurden die Monozyten in einer weiteren Versuchsreihe einem zusätzlichen Stressfaktor ausgesetzt. Dieser Stressfaktor war eine 40-minütige Hitzeexposition bei 47 °C direkt nach der Monozytenpräparation.

3. Ergebnisse

3.3.1. p38/pp38

Unter Hitzeexposition war bei der p38 MAPK sowohl bei Gesunden als auch bei Patienten eine Reduktion der Expression erkennbar. Der Unterschied war jedoch nicht signifikant.

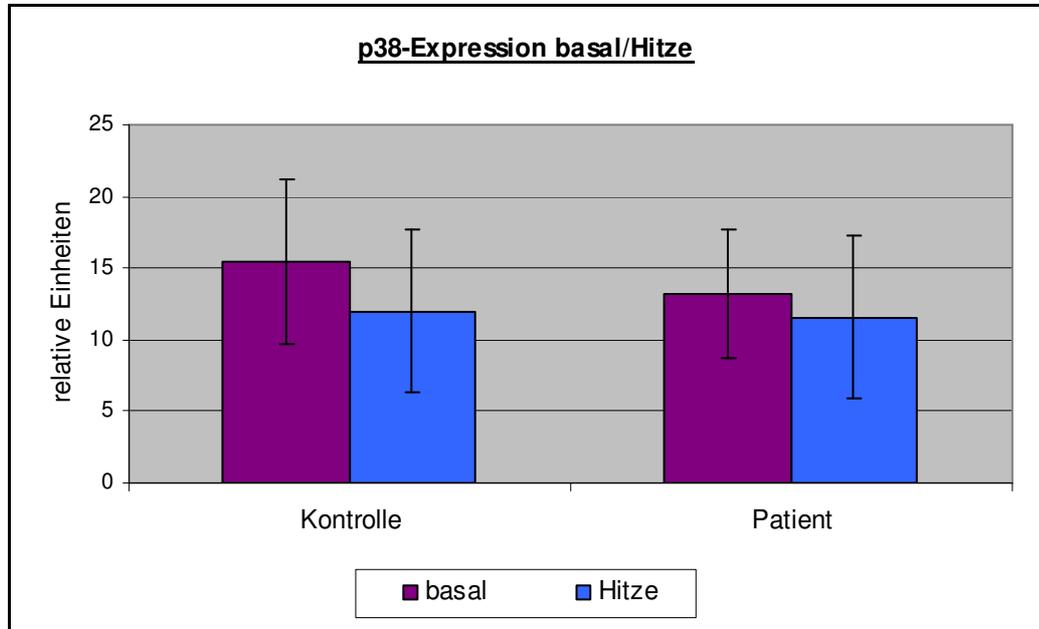


Abb. III-7: Expression der p38 MAPK basal und unter Hitzeexposition; MW +/- SD

Tabelle III-4: Expression der p38 MAPK basal und unter Hitzeexposition

	Ktr. basal	Ktr. Hitze	Patient basal	Patient Hitze
Mittelwert	15,44	13,22	12	11,56
Anzahl	5	5	5	5
SD	5,81	4,47	5,73	5,70

Marker	basal		Hitze	
	Kontrolle	Patient	Kontrolle	Patient
p38 >				

Abb. III-8: Western Blot der Expression der p38 MAPK basal und unter Hitze

Die Expression der pp38 der bei 47 °C inkubierten Zellen war nicht detektierbar und konnte somit nicht quantifiziert werden. Entweder war die aktivierte Form der pp38 nicht vorhanden oder die Menge war so minimal, dass sie technisch nicht darstellbar war.

3. Ergebnisse

3.3.2. ERK

Bei der MAPK ERK ergab sich eine Minderung der Expression nach Hitzeexposition bei den Patienten. Während bei den Kontrollen die Minderung der ERK-Expression nach Hitze minimal und nicht signifikant war, war der Unterschied bei den Patienten signifikant. Sie exprimierten basal 23,81 % +/- 10,16 % und nach Hitzeexposition nur noch 13,79 % +/- 8,55 %. Patientenmonozyten exprimierten unter Stress somit auch signifikant weniger ERK als Kontrollmonozyten mit 23,29 % +/- 13,21 % unter Stress (Abb. III-9). Die Signifikanzen wurden sämtlich mit dem U-Test nach Mann-Whitney-Wilcoxon bestimmt. Ein Western Blot ist in Abb. III-11 integriert.

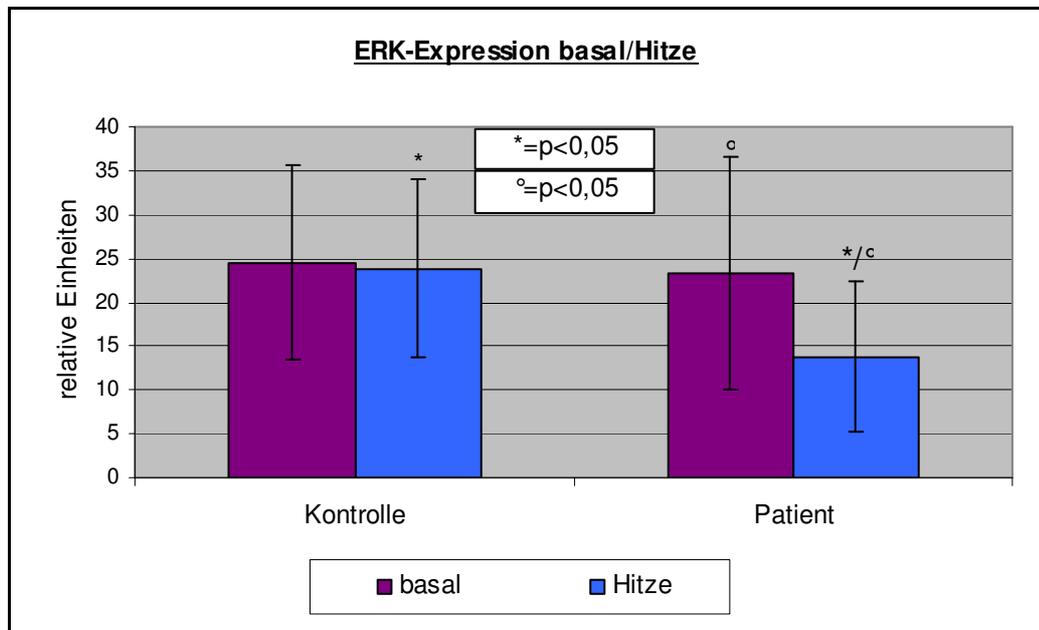


Abb. III-9: Expression der ERK MAPK basal und unter Hitzeexposition; MW +/- SD

Tabelle III-5: Expression der ERK MAPK basal und unter Hitzeexposition

	Ktr. basal	Ktr. Hitze	Patient basal	Patient Hitze
Mittelwert	24,5	23,29	23,81	13,79
Anzahl	12	7	16	14
SD	11,12	13,21	10,16	8,55

3.4. Einfluss der HD auf die ERK-Expression

Da Patienten tendenziell weniger MAPK exprimierten als Gesunde (bei ERK unter Stress signifikant) wurde im Folgenden gemessen, ob Expressionsunterschiede von ERK zwischen Patienten vor und nach HD erkennbar sind. Den Patienten wurde dazu direkt im Anschluss an die HD nochmals Blut entnommen.

3.4.1. Expression unter Stress bei Patienten vor/nach HD

Zunächst wurde die Messung an Monozyten nach Hitzeexposition durchgeführt, da Patientenmonozyten hier eine signifikant geringere ERK-Expression als die Kontrollzellen hatten. Die Fragestellung war dabei, ob die Dialyse das ERK-Defizit bei den durch Hitze gestressten Patientenzellen wieder aufheben kann. Die Patientenmonozyten hatten nach der HD eine durchschnittlich um 17,35 % erhöhte Expression von ERK (31,14 % +/- 15,18 %) gegenüber den Zellen vor der Dialyse (13,79 % +/- 8,55 %). Das Niveau von 31,14 % +/- 15,18 % nach der Dialyse übertraf das der Kontrollen mit 23,29 % +/- 13,21 % um 7,85 %, war aber nicht signifikant.

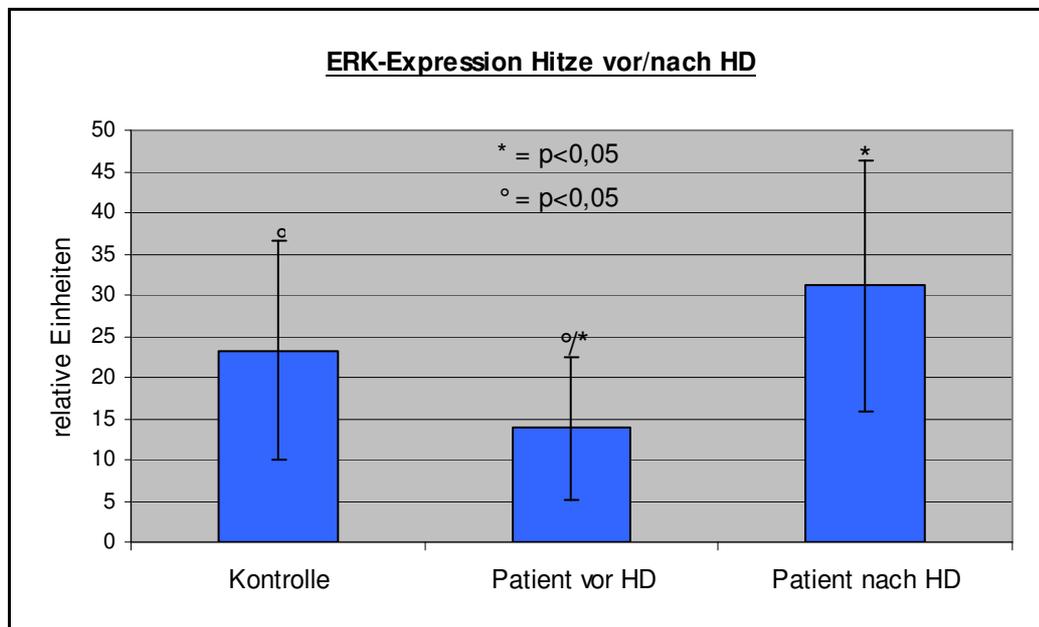


Abb. III-10: Expression der ERK MAPK unter Hitzeexposition vor und nach der HD; MW +/- SD

3. Ergebnisse

Tabelle III-6: Expression von ERK unter Hitzeexposition vor und nach der HD

	Kontrolle	Patient vor HD	Patient nach HD
Mittelwert	23,28	13,78	31,14
Anzahl	7	14	7
SD	13,21	8,55	15,18

Abb. III-11 zeigt die Membran eines Western Blots auf ERK von Monozyten nach Hitzeexposition. Links im Bild ist der Marker mit seinen zwei Markierungen bei 55,9 und 35,4 kDa zu sehen, rechts nebeneinander dreimal zwei Proteinbanden. Oben ist die Bande für ERK (42 kDa) und unten für GAPDH (36 kDa) zu erkennen. GAPDH ist ein Enzym, das in allen Zellen stark exprimiert wird und deshalb häufig als Standard eingesetzt wird. Die Intensität der ERK-Bande wurde prozentual zur Intensität der GAPDH-Bande angegeben, so dass sich die relativen Einheiten ergaben, die die Expression von ERK auf unterschiedlichen Blots vergleichbar machten.

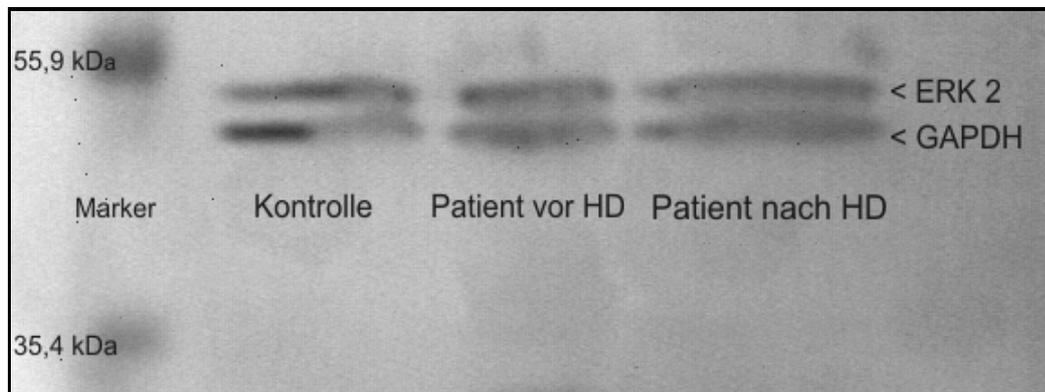


Abb. III-11: Western Blot auf ERK MAPK von Monozyten nach Hitzeexposition

3.4.2. Basale Expression bei Patienten vor/nach HD

Da das Expressionsniveau von ERK nach der Dialyse das der Gesunden Zellen übertraf, warf dies die Frage auf, ob die Dialyse die ERK nicht sogar induzieren könnte. Es wurde nun unter basalen Bedingungen, also ohne Hitzeexposition die gleiche Messung an Patienten nach der HD durchgeführt. Auch unter basalen Bedingungen konnte eine signifikante Expressionserhöhung nach der HD festgestellt werden, obwohl das Expressionsniveau gegenüber Gesunden nicht signifikant erniedrigt war.

3. Ergebnisse

Während vor der HD 23,81 % +/- 10,16 % exprimiert wurden, konnte ein Anstieg auf 30,64 % +/- 13,47 % festgestellt werden. Die Signifikanz wurde mit dem Wilcoxon-Test bestimmt. Die Werte der Patienten nach HD waren nicht signifikant höher als die der Gesunden mit 24,5 % +/- 11,12 % (U-Test). Bei Patienten nach der HD war die Expression unter basalen Bedingungen nicht signifikant unterschiedlich zu der unter Hitze (30,64 % gegenüber 31,14 %).

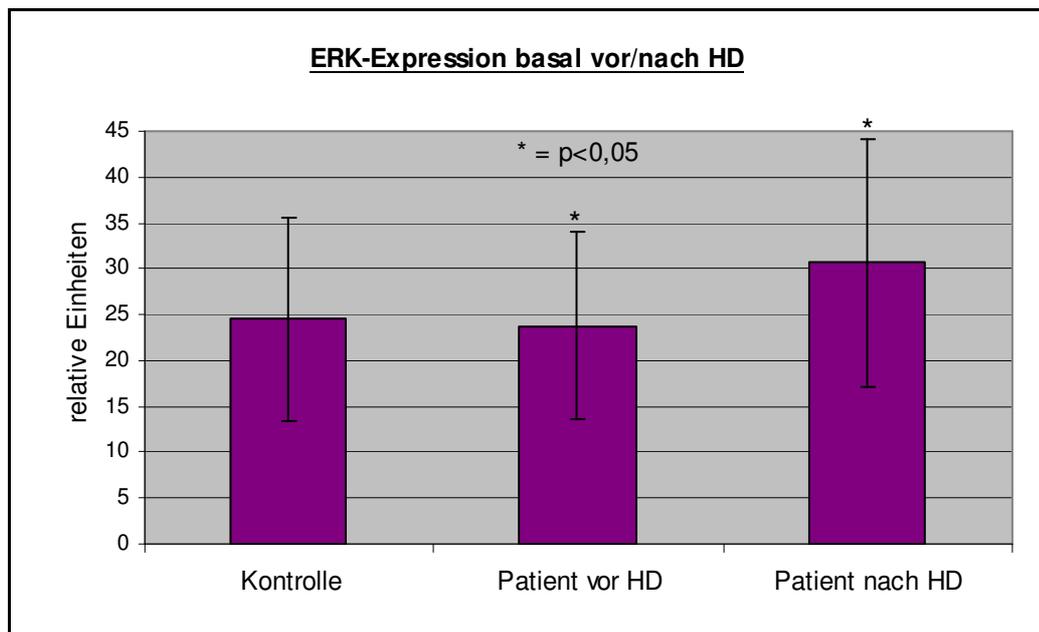


Abb. III-12: Basale Expression der ERK MAPK vor und nach der HD; MW +/- SD

Tabelle III-7: Basale Expression der ERK MAPK vor und nach der HD

	Kontrolle	Patient vor HD	Patient nach HD
Mittelwert	24,5	23,81	30,64
Anzahl	12	16	7
SD	11,12	10,16	13,47

Der Western Blot in Abb. III-13 zeigt dieses Ergebnis. Der Aufbau entspricht der Abb. III-11. Die Proteinbande des Patienten nach HD zeigt eine höhere Intensität im Vergleich zur Expression vor der HD.

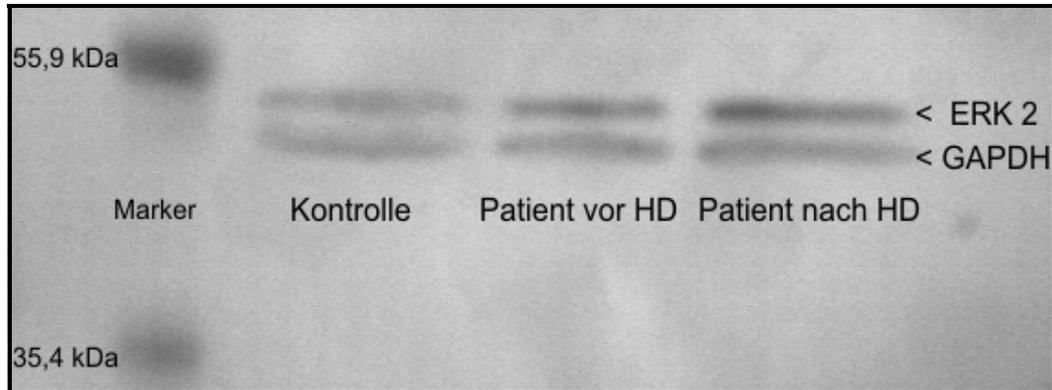


Abb. III-13: Western Blot auf ERK unter basalen Bedingungen

3.5. Welche Rolle spielt ERK bei der Proliferation?

Um das Proliferationsverhalten der Monozyten zu untersuchen, wurden FACS-Analysen auf PCNA durchgeführt. In der gesunden Kontrollgruppe wurde dabei ein Teil der Monozyten jeweils mit verschiedenen Konzentrationen von U0126, einem ERK-Inhibitor, inkubiert. Der ERK-Inhibitor greift auf der Ebene der vorgeschalteten MAPKK ein und hemmt selektiv deren Phosphorylierung, so dass ERK nicht aktiviert wird. U0126 hemmt sowohl ERK 1 als auch ERK 2. Es ergaben sich bei Gesunden signifikante PCNA-Erhöhungen nach Zufügen von U0126 gegenüber der reinen 5%-FCS-Inkubation. Bei Zugabe von 20 μM ERK-Inhibitor stieg die PCNA durchschnittlich auf 14,8 % +/- 8,4 % und bei 50 μM auf 39,6 % +/- 22,8 % an. Es handelt sich um verbundene Merkmale und die Signifikanz wurde mit Hilfe des Wilcoxon-Tests festgestellt.

3. Ergebnisse

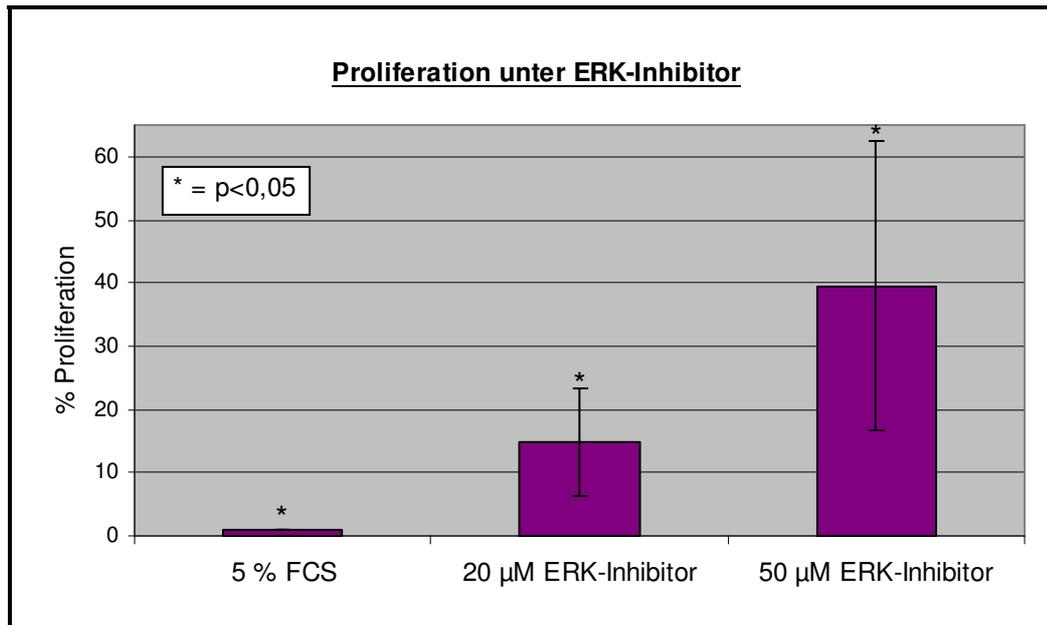


Abb. III-14: FACS-Auswertung von Monozyten mit PCNA als Marker für Proliferation

Tabelle III-8: FACS-Analyse von Monozyten mit PCNA

	5 % FCS	20 µM ERK-Inh.	50 µM ERK-Inh.
Mittelwert	1	14,8	39,58
Anzahl	6	6	6
SD	0	8,44	22,84

In Abb. III-15 ist die Auswertung der FACS-Daten einer Gesundkontrolle. Das linke Diagramm zeigt die PCNA-Antikörperbindung von Monozyten, die in 5%-FCS-Medium inkubiert wurden. Die rechten Diagramme zeigen die PCNA-Bindung von Zellen, die zusätzlich mit ERK-Inhibitor inkubiert wurden. Die Kurve der 5%-Zellen ist in diesen Diagrammen überlagernd mitgezeichnet, um die Rechtsverschiebung der Kurve unter ERK-Inhibitor zu verdeutlichen und die Festlegung des Markers M1 auf den Schnittpunkt der beiden Kurven zu legen. Die Rechtsverschiebung entspricht einer verstärkten Bindung von PCNA. Der prozentuale Anteil der PCNA-Bindungen in M1 unter 5%-Medium wurde zur Auswertung gleich eins gesetzt und von den Werten unter ERK-Inhibitor subtrahiert. So ergab sich unter 20 µM ERK-Inhibitor in diesem Fall eine um 11 % erhöhte und unter 50 µM eine um 25 % erhöhte Bindungskapazität

3. Ergebnisse

gegenüber Zellen in 5 %-Medium.

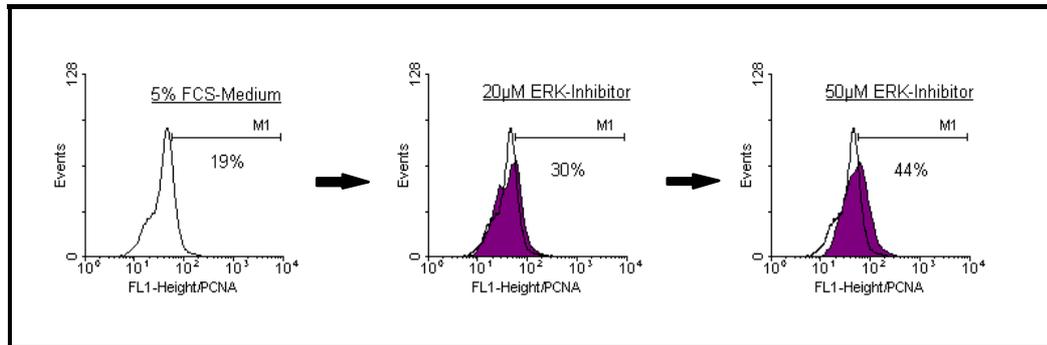


Abb. III-15: Auswertung einer Facs-Analyse mit PCNA am Beispiel einer Kontrolle

Bei Patienten wurden diese Messungen nach der HD durchgeführt und ergaben ebenfalls signifikante Unterschiede mit einer PCNA-Erhöhung um 28,8 % +/- 23,1 % bei Zugabe von 20 µM ERK-Inhibitor und 68,1 % +/- 23,3 % bei 50 µM. Die Signifikanz wurde mit dem Wilcoxon-Test berechnet. Die Erhöhungen sind deutlicher als die der Gesunden, jedoch nicht signifikant höher.

3.6. Tissue factor-Aktivität

Die Tissue factor-Aktivität wurde in den Überständen von inkubierten Monozyten von Gesunden und Patienten nach HD mit Hilfe eines chromogenen Assays gemessen. Es ergeben sich anhand der Farbintensität relative Einheiten zu einem mitgemessenen Standard. Patienten hatten mit 0,58 +/- 0,16 eine um 25 % erniedrigte TF-Aktivität gegenüber Kontrollen mit 0,83 +/- 0,10. Diese Erniedrigung war nach Überprüfung mit dem U-Test signifikant.

3. Ergebnisse

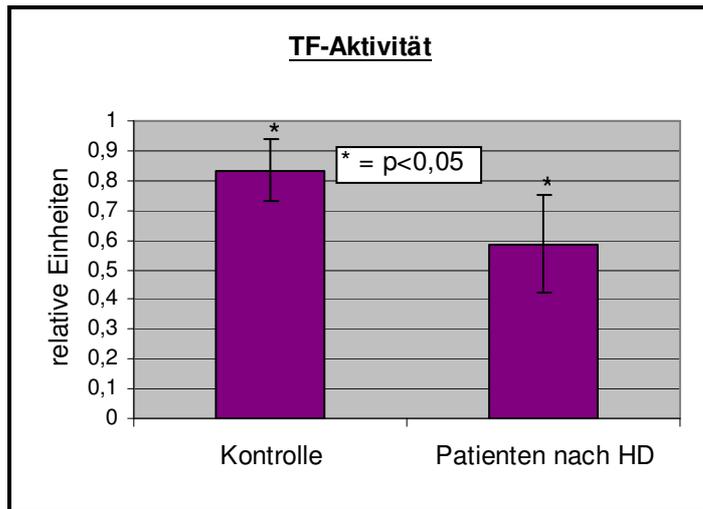


Abb. III-16: TF-Aktivität

Tabelle III-9: TF-Aktivität

	Kontrolle	Patient n. HD
Mittelwert	0,83	0,58
Anzahl	6	8
SD	0,10	0,16

4. DISKUSSION

4.1. Keine Regulation der MAPK durch Urämie unter basalen Bedingungen

4.1.1. Monozyten unter Urämie

Durch Urämie wird die Monozytenfunktionen bezüglich Phagozytose, Apoptose, Nekrose, Proliferation und Zytokinproduktion verändert. Es kommt zu einer erniedrigten Phagozytose [Pertosa et al., 1989; Heidenreich et al., 1996], Apoptose und Nekroseraten sind erhöht, [Heidenreich et al., 1996; Martin-Malo et al., 2000] die Proliferation ist erniedrigt [Weissgarten et al., 2002; Moeslinger and Spieckermann, 2001]. Die Zytokinproduktion ist ebenfalls verändert. Für verschiedene Zytokine konnten unterschiedliche Regulationen nachgewiesen werden [Schindler et al., 2000].

Da MAPK wie die p38 und ERK ebenfalls in einige dieser Mechanismen involviert sind, ergab sich die Hypothese, dass die Änderung der Apoptose, Proliferation und Zytokinproduktion durch die Urämie über die MAPK reguliert werden könnte. In Endothelzellen stellten Serradell et al. eine Regulation von ERK und p38 durch Urämie fest. Sowohl die p38- als auch die ERK-Aktivität stiegen nach Inkubation mit urämischem Serum an. Allerdings mit einem Maximum bei fünf Minuten, nach einer Stunde waren die ERK- und p38-Level wieder nicht mehr signifikant unterschiedlich zur Kontrollgruppe [Serradell et al., 2003].

4.1.2. Apoptoseregulation durch MAPK

Serradell stellte bei seinem Experiment an Endothelzellen unter Urämie keine erhöhte Apoptoserate fest. An Monozyten konnte jedoch unter Urämie eine vermehrte Apoptoserate nachgewiesen werden [Heidenreich et al., 1996; Martin-Malo et al., 2000]. MAPK sind in Apoptosemechanismen involviert. p38 induziert in PC12-Zellen und Ratten-Fibroblasten die Apoptose [Kummer et al., 1997; DeZutter and Davis, 2001] Auch Xia et al. bestätigen in PC12-Zellen eine Induktion der

Apoptose durch p38, während ERK gehemmt wird [Xia et al., 1995]. Nemoto et al postulieren in Jurkat-Zellen eine Abhängigkeit von der Subform der p38, so soll die p38 β die Apoptose hemmen und die p38 α diese fördern [Nemoto et al., 1998]. Jaworowski et al. stellten keinen Zusammenhang zwischen dem Auftreten von Apoptose und der p38 in BMM fest [Jaworowski et al., 1999]. In einer myeloiden Zelllinie ist durch ERK eine Hemmung der Apoptose festgestellt worden [Miranda et al., 2002]. Eine flüchtige, nicht-mitogene Stimulation der ERK führt ebenfalls in CCL39-Fibroblasten zur Apoptose [Pouysségur et al., 2002].

Es besteht bei Monozyten von niereninsuffizienten Patienten eine vermehrte Apoptoserate. Es galt zu klären, ob ein Unterschied der Expression von MAPK besteht, so dass eine Regulation der Apoptose durch MAPK postuliert werden kann.

In der oben zitierten Literatur wird solch eine Regulation der Apoptose durch MAPK angenommen, eine Regulation der p38 oder der ERK führt zur Abnahme oder Zunahme der Apoptoseraten in verschiedenen Zellen. In meinen Ergebnissen zeigte sich keine signifikante Änderung der Level an p38, pp38 und ERK in Monozyten von Patienten, die einer vermehrten Apoptose unterliegen und denen der Kontrollen, die weniger Apoptose betreiben.

Somit kann ein Zusammenhang zwischen der Regulation der Apoptose durch Urämie und der Expression von p38 und/oder ERK in Monozyten nicht postuliert werden. Bei Jaworowski et al. konnte ein Zusammenhang zwischen Apoptoseregulation und p38 ebenfalls nicht gefunden werden.

4.1.3. Regulation der Proliferation durch ERK

Die Proliferation von PBMC und Makrophagen ist unter Urämie erniedrigt [Weissgarten et al., 2002; Moeslinger and Spieckermann, 2001]. Für die Proliferation spielt ERK eine wesentliche Rolle. Abhängig von Stimulus, Dauer und Stärke der Stimulation führt eine ERK-Aktivierung zur Proliferation oder zu deren Hemmung. In BMM führt eine Stimulation mit

macrophage colony stimulating factor (M-CSF) nach 5 min zur Proliferation der Zellen, während eine Stimulation mit LPS nach 15 min zur Zytokinproduktion führt [Valledor et al., 2000]. Auch Pouysségur et al. zeigen eine Abhängigkeit von Stimulus und Stärke der Stimulation in CCL39-Fibroblasten. Während lang anhaltende mitogene Stimuli über ERK zur Proliferation führen, ermöglichen flüchtige nicht-mitogene Stimuli die Apoptose [Pouysségur et al., 2002]. M-CSF kann konzentrationsabhängig in Makrophagen von Mäusen die Proliferation über hohe Konzentrationen sowohl aktivieren als auch über niedrige Konzentrationen hemmen [Rovida et al., 2002].

Die erniedrigte Proliferationsrate unter Urämie veranlasste zu der Annahme einer veränderten ERK-Expression, da diese wie oben beschrieben in vielen Zellen in Prozesse der Proliferation involviert ist. In Monozyten konnte jedoch keine Regulation der ERK unter Urämie festgestellt werden. Weissgarten macht einen Mangel an Zn^{2+} für die mangelnde Proliferation verantwortlich. Moeslinger und Spiekermann untersuchten den Einfluss der NO-Synthese auf die Proliferation von Makrophagen, so dass möglicherweise ganz andere Mechanismen bei vorhandener Urämie Einfluss auf die Proliferation nehmen ohne dass MAPK eine Rolle spielen.

Möglicherweise führt die Urämie zu einer so schweren Zellschädigung, dass eine Regulation der ERK nicht mehr möglich ist und die Proliferation über andere Wege, die stressresistenter sind, reguliert wird.

4.1.4 Regulation der Zytokinproduktion durch MAPK

Die Produktion von Zytokinen unter Urämie ist verändert. Die Produktion der proinflammatorischen Zytokine IL-1 β und -6 ist unter Urämie erhöht [Malaponte et al., 2002; Maruyama et al., 2005; Girndt et al., 2001,2]. Bezüglich des proinflammatorischen TNF- α und des antiinflammatorischen IL-10 gibt es in der Literatur sowohl Angaben von erhöhten als auch erniedrigten Spiegel in [Heidenreich et al., 1996; Malaponte et al. 2002; Perianayagam et al., 2005; Girndt et al., 2001,2].

Die Datenlage bezüglich des Zusammenhangs der p38 und ERK MAPK mit der Zytokinproduktion ist vielfach belegt. So führt p38 in Monozyten nach Stimulation mit LPS zur Produktion von IL-1 und TNF- α [Rabehi et al., 2001; Guha and Mackman, 2001; Baldassare et al. 1999]. IL-6 wird ebenfalls über p38 reguliert [Guo et al., 2003; Beyaert et al., 1996]. Auch für IL-10 sind in der Literatur Angaben über einen Zusammenhang mit der p38 zu finden [Foey et al., 1998; Guo et al., 2003; Lucas et al., 2005].

ERK führt in Monozyten nach LPS-Stimulation zur Produktion von IL-1 [Rabehi et al., 2001]. In THP-Zellen führt ERK ebenfalls zur Produktion von IL-1 β [Kurosawa et al., 2000]. In BMM kommt es nach LPS-Stimulation über ERK zur Produktion von IL-1 β , TNF- α und IL-6 [Valledor et al., 1999; Rao et al., 2000]. In adhärennten Monozyten führt die LPS-Stimulation zu einer TNF- α Produktion, die ohne Adhärenz niedriger ist [Rosengart et al., 2000]. IL-6 wird in Monozyten über ERK reguliert [Foey et al., 1998]. Zu IL-10 gibt es unterschiedliche Regulationen, Foey et al fanden keinen Zusammenhang der Produktion von IL-10 mit ERK in Monozyten, Lucas et al. fanden eine Regulation über ERK in Makrophagen, ebenso Loscher et al. in dendritischen Zellen [Foey et al., 1998; Lucas et al., 2005; Loscher et al., 2005].

Eine veränderte Zytokinproduktion in urämschen Monozyten ist anzunehmen, eine Regulation über MAPK ist möglich. Auch eine fehlende Regulation der p38 und ERK in meinen Untersuchungen schließt eine Involvierung der MAPK in die Zytokinproduktion nicht aus. Es gibt sehr vielfältige Möglichkeiten der Regulation von unterschiedlichen Zytokinen, so dass eine endgültige Aussage über den Zusammenhang der Zytokinproduktion in Monozyten unter Urämie und die Regulation durch MAPK nicht getroffen werden kann.

4.1.5. Fehlende Regulation der MAPK durch Urämie

Das Ergebnis einer fehlenden Regulation der p38 durch Urämie ist unerwartet. Es wurde daraufhin die aktivierte Form pp38 selektiv gemessen, um zu sehen, ob vielleicht bei gleichen basalen p38-Leveln der aktivierte Anteil bei den Patienten höher ist, doch auch hier ergaben sich keine Unterschiede. Tendenziell war eine Richtung zu einer erniedrigten Expression (p38 und pp38) zu sehen, jedoch war diese nicht signifikant. Die Urämie wäre somit eher ein Inhibitor der p38. Auch die ERK wird nicht durch die Urämie beeinflusst, auch hier zeigt sich lediglich eine Tendenz zu einer erniedrigten Expression. Diese Ergebnisse sind unerwartet, da ein Zusammenhang der Mechanismen mit den MAPK eindeutig belegt ist.

In dem in meiner Arbeit verwendeten Versuchsaufbau waren die Monozyten der Patienten vor der Blutentnahme ständig dem urämischen Serum der Patienten ausgesetzt, bevor die Inkubation in normalem Medium erfolgte. Eventuell handelt es sich um eine Kompensation im Rahmen der chronischen Überstimulation im Sinne eines Gewöhnungseffektes an das urämische Serum, welches dann nicht mehr zur Aktivierung von MAPK führt. Oder aber die Gleichbehandlung der Zellen nach der Blutentnahme und die Zellkulturbedingungen konnten vorher vorhandene Unterschiede nivellieren.

4.2. Einfluss von Urämie und Stress auf MAPK

Da eine Beeinflussung der MAPK-Level durch die Urämie nicht vorzuliegen scheint, wurden die Zellen in einem zweiten Schritt einem zusätzlichen Stressfaktor ausgesetzt. Hierzu wurde eine Hitzeexposition ausgewählt.

4.2.1 Kein Einfluss von Urämie und Stress auf die p38

Die p38 MAPK wurde durch diesen zusätzlichen Stressfaktor in der Expression weder bei den Kontrollen noch bei den Patienten beeinflusst. Es war allerdings in beiden Gruppen wiederum eine Tendenz zu einer

erniedrigten Expression erkennbar, die sich als nicht signifikant erwies. Die pp38 konnte nach der Hitzeexposition nicht mehr detektiert werden. Es muss leider offen bleiben, ob tatsächlich keine Expression mehr vorhanden war, oder ob die Proteinmenge zur Detektion zu gering war. Dieses Ergebnis war unerwartet, da die p38 im Normalfall durch Stress aktiviert wird [Roux and Blenis, 2004; Schorey and Cooper, 2003]. Da jedoch auch bei den Kontrollen kein Anstieg zu verzeichnen war, muss in Erwägung gezogen werden, ob die Hitzeexposition nicht adäquat gewählt war. Die fehlende Regulation der p38 durch Hitze kann somit nur sehr zurückhaltend interpretiert werden.

4.2.2. Herabregulation der ERK durch Urämie und Stress

Die ERK-Expression war nach Hitzeexposition bei den Patienten signifikant erniedrigt gegenüber der Expression unter basalen Bedingungen. Bei den Kontrollen konnte kein Expressionsunterschied festgestellt werden. Die gesunden Zellen waren also trotz Hitze in der Lage die ERK-Expression aufrecht zu erhalten. Die Monozyten aus urämischem Serum hatten eine reduzierte ERK-Expression, wahrscheinlich als Ausdruck einer reduzierten Kompensation unter Stress. Die ERK könnte im Sinne einer chronischen Überstimulation unter basalen Bedingungen noch kompensiert sein und wäre bei zusätzlichem Stress nicht mehr zu einer weiteren proinflammatorischen Antwort aktivierbar. Die Folge wäre eine verminderte Produktion von proinflammatorischen Zytokinen wie TNF- α , IL-1 und IL-6. Da ERK in Mechanismen der Apoptose und Proliferation involviert ist, wäre auch eine Änderung des Proliferationsverhaltens denkbar. In Monozyten ist unklar, welchen Einfluss ERK auf die Proliferation hat. Eine ERK-Aktivierung durch hochkonzentrierte mitogene Stimuli in Makrophagen führt zur Proliferation [Valledor et al. 2000; Rovida et al., 2002; Comalada et al., 2004]. Nicht-mitogene Stimuli führen bei Makrophagen nicht zur Proliferation, sondern zur Apoptose, ebenso in CLL 39 Fibroblasten [He et al., 2005; Pouyssegur et al., 2002].

Eine ERK-Hemmung könnte somit Proliferation oder Hemmung von Proliferation zur Folge haben. Urämie und Stress wären eher ein nicht-mitogener Stimulus, der somit eine Hemmung der Proliferation wahrscheinlicher macht.

An Kontrollen und an Patienten wurde daher eine ERK-Inhibition in einem weiteren Schritt durchgeführt, indem die Zellen mit dem ERK-Inhibitor U0126 inkubiert wurden. Anschließend wurde die Proliferationsrate mittels PCNA ermittelt, um die o.g. Hypothese zu überprüfen (Kapitel 4.4).

4.3. ERK-Expression nach HD

Bei Patienten ist vor der Dialyse unter zusätzlicher Hitzeexposition eine Herabregulation der ERK erfolgt. Nach der HD exprimieren die Monozyten auch unter zusätzlichem Stress ebensoviel ERK wie die Kontrollen. Die HD ist somit in der Lage das Defizit auszugleichen. Tendenziell exprimierten die Monozyten nach der Dialyse sogar mehr ERK als die Kontrollen. Dies warf die Frage nach einer eventuellen Induktion der ERK durch die Dialyse auf.

Unter basalen Bedingungen ist die Expression der ERK zwischen Patienten und Kontrollen nicht unterschiedlich. Nach der HD ist die ERK signifikant höher als vor der HD, jedoch nicht signifikant höher als die der Kontrollen. Eine Induktion der ERK durch die Dialyse ist also möglich. Als Ursache für die ERK-Induktion könnte der Stress an der Dialysemembran verantwortlich sein oder eine Reduktion der Urämiegifte, dies ist jedoch unwahrscheinlich, da die ERK nicht höher ist als die der Kontrollen.

Durch die HD werden Urämiegifte ausgeschaltet, dies verhilft den Zellen zurück zu einer normaleren Funktion und das Defizit der ERK-Expression unter Stress ist nach der Dialyse nicht mehr nachweisbar.

4.4. ERK hemmt die Proliferation in Monozyten

Nach ERK-Inhibition in Monozyten wurde mittels PCNA die Proliferationseigenschaft der Zellen gemessen. PCNA ist ein Antigen, welches auf proliferierenden Zellen exprimiert wird und ist ein Marker für die DNA-Synthese. Es kann über eine FACS-Analyse auf PCNA-positiven Zellen identifiziert werden.

Es wurde also die unter Hitze und Urämie festgestellte ERK- Inhibition durch den ERK-Inhibitor U0126 simuliert und der Einfluss auf die Proliferation gemessen. Erwartet hatten wir unter der Annahme eines nicht-mitogenen Stimulus eine Hemmung der Proliferation. Wider Erwarten ist in Monozyten durch eine ERK-Inhibition die Proliferation sowohl bei Gesunden als auch bei Patienten gestiegen, so dass das gemeinsame Auftreten von Urämie und Stress doch eher als mitogener Stimulus zu sehen ist.

Im Umkehrschluss würde dies bedeuten, dass ERK in Monozyten die Proliferation negativ reguliert. In der Literatur findet in unterschiedlichen Zellen abhängig von der Stärke und Art der Stimulation eine Aktivierung der ERK-Kaskade statt, die zu Proliferation, Apoptose oder Zytokinproduktion führt.

In BMM beschreiben Valledor et al., dass eine Aktivierung der Zellen mit LPS und anderen nicht-mitogenen Substanzen zu einer langsamen ERK-Aktivierung mit einem Maximum bei 15 min führt, die die Proliferation hemmt und eine Zytokinproduktion (IL-1 β , TNF- α , IL-6) zur Folge hat. Eine Stimulation mit Wachstumsfaktoren führt über eine frühe Aktivierung der ERK-Kaskade mit einem Maximum bei 5 min zur Proliferation [Valledor et al., 2000]. In THP-1-Zellen führt eine Aktivierung von ERK über Bufalin in Abwesenheit von Serum zur Apoptose der Zellen, mit Serum erfolgt die Induktion einer vermehrten Zytokinproduktion [Kurosawa et. al., 2000]. In CLL39-Fibroblasten kommt es bei schwacher Stimulation von ERK zur Apoptose, bei starker Stimulation zur Hemmung der Apoptose. Während eine nicht-mitogene Stimulation eine flüchtige

Aktivierung verursacht, die nicht zum Eintritt in den Zellzyklus führt, stimulieren Mitogene die Zellen zu einer langanhaltenden Aktivierung von ERK und lösen die Proliferation der Zellen aus [Pouysségur et al., 2002]. Jaworowski beschreibt eine durch LPS und Wachstumsfaktoren initiierte ERK-Aktivierung in BMM, die zu Zellwachstum führt und die Apoptose hemmt. [Jaworowski et al., 1999]. In HL60-Zellen wird ERK durch eine Stimulation mit PMA aktiviert und führt zur Differenzierung der Zellen in Monozyten, die Apoptose wird gehemmt [Miranda et al., 2002]. Roviada et al. und Comalada et al. postulieren eine Proliferation von Makrophagen nach mitogener Stimulation über ERK [Roviada et al., 2002; Comalada et al., 2004]. He et al. wiederum wiesen eine Apoptoseinduktion über ERK nach [He et al., 2005].

In meinen Ergebnissen führte die ERK-Inhibition zu einer Proliferationsförderung. Eine ERK-Inhibition fand auch unter Urämie und Stress statt. Monozyten aus urämischem Serum müssten also unter Stress mehr proliferieren.

Vielleicht wird die Proliferation in gestressten, urämischen Zellen auf Kosten der Zytokinproduktion und somit Differenzierung gesteigert. Somit wären die mehr produzierten Monozyten weniger effektiv und dies könnte eine Erklärung für die gesteigerte Infektanfälligkeit bei Patienten sein. Möglicherweise ist die gesteigerte Proliferation ein Versuch mit mehr Immunabwehr auf Stimuli zu reagieren. Der Effekt ist jedoch nicht ausreichend, um die Infektabwehr sicherzustellen.

4.5. HD senkt TF-Aktivität

Neben der Immunsuppression leiden Patienten mit terminaler NI vermehrt an Athero-/Arteriosklerose. Die KHK stellt die häufigste Todesursache unter Dialysebehandlung dar.

Eine Erklärung für das erhöhte kardiovaskuläre Risiko ist das Überschneiden des Risikoprofils für die Pathogenese der NI und der Athero-/Arteriosklerose mit den klassischen Risikofaktoren arterielle

Hypertonie, Diabetes mellitus und Lipidstoffwechselstörungen [Lonnemann et al., 2001].

Bei Patienten mit einer Niereninsuffizienz kommen zusätzlich nicht-traditionelle Risikofaktoren, die durch den oxidativen Stress unter Urämie bedingt sind, hinzu. Es entstehen vermehrt advanced glycation- und -lipoxidation end-products und advanced oxidation protein products unter Urämie und fördern die Entwicklung von Arteriosklerose durch Ablagerung an der Gefäßwand und Endothelläsion. Auch Homocystein und asymmetrisches Dimethylarginin als Inhibitor der NO-Synthese sind involviert in die Pathogenese der Athero-/Arteriosklerose. Zudem ist die Pathogenese der Arteriosklerose bedingt durch eine bei Niereninsuffizienz verminderte Hydroxylierung des Vitamin D3 und der Folge einer Hyperphosphatämie und Hypokalzämie und folgendem Hyperparathyreoidismus. Auch Zebrack et al. stellten ein erhöhtes kardiovaskuläres Risiko von niereninsuffizienten Patienten fest [Horl, 2003, Cozzolino et al., 2005, Zebrack et al., 2003].

Somit wirkt die Urämie progressiv auf die Arteriosklerose. Die Dialysebehandlung kann eine Arteriosklerose induzieren und ebenfalls progressiv wirken. Die HD löst eine chronische Entzündungsreaktion aus und aktiviert proinflammatorische Zytokine, die zu einer Endothelläsion führen, die zu atheromatösen Plaques prädisponiert mit der Folge von Ereignissen wie Myokardinfarkten und Insulten [Vallance et al., 1997]. Auch TF wird über proinflammatorische Zytokine aktiviert. Guha postuliert eine Aktivierung über die ERK-Kaskade, Ohsawa über die p38-Kaskade. [Guha et al., 2001; Ohsawa et al., 2003]. TF trägt zur Bildung der Atherosklerose bei, indem es über die Aktivierung der intravasalen Gerinnung zur Thrombinbildung führt [Mercier et al, 2001].

Es wurde vermutet, dass der in Monozyten produzierte Tissue factor bei der Pathogenese der Athero-/Arteriosklerose unter HD eine Rolle spielen könnte. Eine vermehrte TF-Aktivität nach der HD wurde vermutet. Jedoch konnte nach der HD sogar eine signifikant erniedrigte TF-Aktivität

festgestellt werden. Für das atherothrombotische Geschehen während der Dialyse scheint TF also nicht verantwortlich zu sein. Es müssen andere Mechanismen für die Athero-/Arteriosklerose unter HD verantwortlich sein, die sehr vielfältig sein können. Untersuchungen zu weiteren Risikofaktoren in Monozyten wurde nicht gemacht, da diese nicht immer primär Monozyten zuzuordnen sind und auch nicht in direktem Zusammenhang mit der Stresskinasekaskade zu interpretieren wären.

5.Fazit

Die Charakterisierung einer Monozytenfehlfunktion unter Urämie ist schwer. In der vorgelegten Arbeit konnte allerdings gezeigt werden, dass unter zusätzlichem Stress ein ERK-Defizit auftritt. Urämie induziert die MAPK nicht, so dass eine Inhibition derselben als therapeutisches Eingreifen nicht in Frage kommen wird.

Unter zusätzlichen Stressfaktoren reduziert sich die ERK-Expression, vermutlich mit der Folge einer vermehrten Proliferation. Eine vermehrte Proliferation könnte auf Kosten einer Zytokinproduktion und Differenzierung stattfinden Die Immunschwäche der Patienten wäre mit weniger funktionsfähigen Monozyten zu erklären.

Durch eine adäquate HD wird das ERK-Defizit, das unter Urämie und Stress entstanden ist, ausgeglichen. Dabei kann auch der Kontakt mit der Dialysemembran ein zusätzlicher Stressfaktor sein, der die ERK Expression erklären würde.

Die terminale Niereninsuffizienz führt nicht zu einer Induktion von TF als proatherogenem Faktor in Monozyten.

5. LITERATURVERZEICHNIS

Anavekar NS, McMurry JJV, Velazquez EJ, Solomon SD, Kober L, Rouleau J-L, White HD, Nordlander R, Maggioni A, Dickstein K, Zelenhofske S, Leimberger JD, Califf RM, Pfeffer MA (2004)

Relation between renal dysfunction and cardiovascular outcomes after myocardial infarction

N Engl J Med 351: 1285-1295

Baldassare JJ, Bi Y, Bellone CJ (1999)

The role of p38 mitogen-activated protein kinase in IL-1 β transcription

J Immunol 162: 5367-5373

Berthoux F, Jones E, Gellert R, Mendel S, Saker L, Briggs D (1999)

Epidemiological data of treated end-stage renal failure in the European Union (EU) during the year 1995: report of the European Association Registry and the National Registries

Nephrol Dial Transplant 14: 2332-2342

Beyaert R, Cuenda A, Vanden Berghe W, Plaisance S, Lee JC, Haegemann G, Cohen P, Fiers W (1996)

The p38/RK mitogen-activated protein kinase pathway regulates interleukin-6 synthesis response to tumor necrosis factor

EMBO J 15: 1914-1923

Bucher O, Wartenberg H (1997)

Blut und blutbildende Organe.

In: Cytologie, Histologie und mikroskopische Anatomie des Menschen Verlag Hans Huber, Bern Göttingen Toronto Seattle, 12. Aufl, S 187-228

Comalada M, Xaus J, Sanchez E, Valledor AF, Celada A (2004)

Macrophage colony-stimulating factor-dependent macrophage proliferation is mediated through a calcineurin-independent but immunophilin-dependent mechanism that mediates the activation of external regulated kinases

Eur J Immunol 34 (8) : 2257-2267

Cozzolino M, Butti A, Chiarelli G, Rocca-Rey L, Santagostino G, Gallieni M, Brancaccio D (2005)

Cardiovascular calcification and accelerated atherosclerosis in chronic kidney disease

Ital Heart J Suppl. 6(1) : 25-28

De Zutter GS, Davis RJ (2001)

Pro-apoptotic gene expression mediated by the p38 mitogen-activated protein kinase signal transduction pathway

PNAS 98 (11): 6168-6173

Edmunds JW and Mahadevan LC (2004)

MAP kinases as structural adaptors and enzymatic activators in transcription complexes

J Cell Sci 117: 3715-3723

Foey AD, Parry SL, Williams LM, Feldmann M, Foxwell BMJ, Brennan FM (1998)

Regulation of monocyte IL-10 synthesis by endogenous IL-1 and TNF- α : Role of p38 and p42/44 mitogen-activated protein kinases

J Immunol 160: 920-928

Frei U, Schindler R (2000)

Medizinische Probleme der Langzeitdialysepatienten.

In: Koch K-M (Hrsg) *Klinische Nephrologie*. Urban & Fischer Verlag, München Jena, 1.Auflage, S 764-778

Girndt M, Kaul H, Leitnaker CK, Sester M, Sester U, Kohler H (2001)
Selective sequestration of cytokine-producing monocytes during
hemodialysis treatment

Am J Kidney Dis 37 (5): 954-963

Girndt M, Sester M, Sester U, Kaul H, Köhler H (2001,2)
Defective expression of B7-2 (CD86) on monocytes of dialysis
patients correlates to the uremia-associated immune defect

Kidney Int 59: 1382-1389

Go AS, Chertow GM, Fan D, McCulloch CE, Hsu C (2004)
Chronic kidney disease and the risks of death, cardiovascular
events and hospitalisation

N Engl J Med 351: 1296-1305

Guo X, Gerl RE, Schrader JW (2003)
Defining the involvement of p38 α MAPK in the production of anti-
and proinflammatory cytokines using an SB 203580-resistant form
of the kinase

J Biol Chem 278(25): 2237-2242

Guha M and Mackman N (2001)
LPS induction of gene expression in human monocytes

Cell Signal 13: 85-94

Guha M, O'Connell MA, Pawlinski R, Hollis A, McGovern P, Yan S-F,
Stern D, Mackmann N (2001)
Lipopolysaccharide activation of the MEK-ERK1/2 pathway in
human monocytic cells mediates tissue factor and tumor necrosis
factor α expression by inducing Elk-1 phosphorylation and Egr-1
expression

Blood 98 (5): 1429-1439

Hale KK, Trollinger D, Rihanek M, Manthey CL (1999)

Differential expression and activation of p38 miogen-activated protein kinase α, β, γ and δ in inflammatory cell lineages

J Immunol 162: 4246-4252

He X, Wang J, Guo Z, Liu Q, Chen T, Wang X, Cao X (2005)

Requirement for ERK activation in sinomenine-induced apoptosis of macrophages

Immunol Lett 98 (1): 91-96

Heidenreich S, (1999)

Monocyte CD14: a multifunctional receptor engaged in apoptosis from both sides

J Leukoc Biol 65: 737-743

Heidenreich S, Schmidt M, Bachmann J, Harrach B (1996)

Apoptosis of monocytes cultured from long-term hemodialysis patients

Kidney Int 49(3): 792-799

Hörl WH (2002)

Hemodialysis membranes: Interleukins, biocompatibility and middle molecules

J Am Soc Nephrol 13: 62-71

Horl WH (2003)

Atherosclerosis and uremia: significance of non-traditional risk factors

Wien Klin Wochenschr 115(7-8): 220-234

Hsu C, Vittinghoff E, Lin F, Shlipak MG (2004)

The incidence of end-stage renal disease is increasing faster than the prevalence of chronic renal insufficiency

Ann Intern Med 141: 95-101

Janeway CA, Travers P, Walport M, Shlomchik M (2002)

Die angeborene Immunität.

In: Immunologie Spektrum Akademischer Verlag, 5. Auflage, Heidelberg, Berlin, S 37-93

Janeway CA, Travers P, Walport M, Shlomchik M (2002,2)

Signalgebung durch Rezeptoren des Immunsystems.

In: Immunologie Spektrum Akademischer Verlag, 5. Auflage, Heidelberg, Berlin, S 201-209

Jaworowski A, Wilson NJ, Christy E, Byrne R, Hamilton JA (1999)

Roles of the mitogen-activated protein kinase family in macrophage responses to colony stimulating factor-1 addition and withdrawal

J Biol Chem 274 (21): 15127-15133

Kummer JL, Rao PR, Heidenreich KA (1997)

Apoptosis induced by withdrawal of trophic factors is mediated by p38 mitogen-activated protein kinase

J Biol Chem 272 (33): 20490-20494

Kurosawa M, Numazawa S, Tani Y, Yoshida T (2000)

ERK signaling mediates the induction of inflammatory cytokines by bufalin in human monocytic cells

Am J Physiol Cell Physiol 278: C500-C508

Kyriakis JM, Avruch J (1996)

Sounding the alarm: Protein kinase cascade activated by stress and inflammation

J Biol Chem 271 (40): 24313-24316

Lang D, Kosch M, Schaefer RM (2005)

Management von Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz

MMW Fortschr Med 147 (3): 27-31

Lang D, Hubrich A, Dohle F, Terstesse M, Saleh H, Schmidt M, Pauels H-G, Heidenreich S (2000)

Differential expression of heat shock protein 70 (hsp70) in human monocytes rendered apoptotic by IL-4 or serum deprivation

J Leukoc Biol 68 (5): 729-736

Levey AS, Coresh J, Balk E, Kausz AT, Levin A, Stefes MW, Hogg RJ, Perrone RD, Lau J, Eknoyan G (2003)

National kidney foundation practice guidelines for chronic kidney disease: evaluation, classification and stratification

Ann Intern Med 139: 137-147

Lonnemann G, Olbricht C, Nonnast-Daniel B, Brunkhorst R (2000)

Blutreinigungsverfahren bei terminaler Niereninsuffizienz.

In: Koch K-M (Hrsg) *Klinische Nephrologie*. Urban & Fischer Verlag, München Jena, 1. Auflage, S 723-763

Loscher CE, Draper E, Leavy O, Kelleher D, Mills KH, Roche HM (2005)

Conjugated linoleic acid suppresses NF- κ B activation and IL-12 production in dendritic cells through ERK-mediated IL-10 induction

J Immunol 175 (8): 4990-4998

Lucas M, Zhang X, Prasanna V, Mosser DM (2005)

ERK activation following macrophage Fcγ₃R ligation leads to chromatin modifications at the IL-10 locus

J Immunol 175 (1): 469-477

Malaponte G, Bevelacqua V, Fatuzzo P, Rapisarda F, Emmanuele G, Travali S, Mazzarino MC (2002)

IL-1β, TNF-α and IL-6 release from monocytes in Haemodialysis patients in relation to dialytic age

Nephrol Dial Transplant 17: 1964-1970

Martin-Malo A, Carracedo J, Ramirez R, Rodriguez-Benot A, Soriano S, Rodriguez M, Aljama P (2000)

Effect of uremia and dialysis modality on mononuclear cell apoptosis

J Am Soc Nephrol 11: 936-942

Maruyama Y, Stenvinkel P, Lindholm B (2005)

Role of interleukin -1beta in the development of malnutrition in chronic renal failure patients

Blood Purif 23 (4): 275-281

McGilvray I, Lu Z, Bitar R, Dackiw APB, Davreux CJ, Rotstein OD (1997)

VLA-4 Integrin cross-linking on human monocytic TPH-1 cells induces tissue factor expression by a mechanism involving mitogen-activated protein kinase

J Biol Chem 272 (15): 10287-10294

Memoli B (1999)

Cytokine production in haemodialysis

Blood Purif 17: 149-158

Mercier E, Branger B, Vecina F, Al-Sabadani B, Berlan J, Dauzat M, Fourcade J, Gris JC (2001)

Tissue factor coagulation pathway and blood cells activation state in renal insufficiency

Hematology J 2: 18-25

Miranda MB, McGuire TF, Johnson DE (2000)

Importance of MEK-1/-2 signaling in monocytic and granulocytic differentiation of myeloid lines

Leukemia 16: 683-692

Moeslinger T, Spieckermann PG (2001)

Urea-induced inducible nitric oxide synthase inhibition and macrophage proliferation

Kidney Int Suppl 78: 2-8

Nemoto S, Xiang J, Huang S, Lin A (1998)

Induction of apoptosis by SB202190 through inhibition of p38 β mitogen-activated protein kinase

J Biol Chem 273 (26): 16415-16420

Ohsawa M, Koyama T, Nara N, Hirosawa S (2003)

Induction of tissue factor expression in human monocytic cells by protease inhibitors through activating activator protein-1 (AP-1) with phosphorylation of JUN-N-terminal kinase and p38

Thromb Res 112: 313-320

Pagès G, Guérin S, Grall D, Bonino F, Smith A, Anjuere F, Auberge P, Pouysségur J (1999)

Defective thymocyte maturation in p44 MAP kinase (ERK1) knockout mice

Science 286: 1374-1377

- Perianayagam** MC, Morena M, Jaber BL, Balakrishnan VS (2005)
Anti-oxidants reverse uremia-induced down-regulation of
mitochondrial membrane potential and interleukin-10 production
Eur J Clin Invest 35 (2): 148-153
- Pertosa** G, Mastrolitti G, Späth PJ, Fracasso AR, Manno C., Schena FP
(1989)
Effect of fibronectin on C3b and Fc receptor-mediated
phagocytosis by peripheral blood monocytes in uraemic patients
Nephrol Dial Transplant 4: 15-20
- Petrides** PE (1998)
Immunsystem.
In: Löffler G, Petrides PE (Hrsg) Biochemie und Pathobiochemie.
Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, 6. Auflage, S 1057-1086
- Pouysségur** J, Volmat V, Leonrmand P (2002)
Fidelity and spatio-temporal control in MAP kinase (ERKs)
signalling
Biochem Pharmacol 64: 755-763
- Rabehi** L, Irinopoulou T, Cholley B, Haeffner-Cavaillon N, Carreno MP
(2001)
Gram-positive and gram-negative bacteria do not trigger
monocytic cytokine production through similar intracellular
pathways
Infect Immun: 4590-4599
- Rayner** HC, Pisoni RL, Bommer J, Canaud B, Hecking E, Locatelli F,
Piera L, Bragg-Gresham JL, Feldmann HI, Goodkin DA, Gillespie B,
Wolfe RA, Held JP, Port FK (2004)

Mortality and hospitalisation in haemodialysis patients in five european countries: Results from the Dialysis Outcome and Practice Patterns Study (DOPPS)

Nephrol Dial Transplant 19:108-120

Rao KMK (2000)

MAP kinase activation in macrophages

J Leukoc Biol 69: 3-10

Rosengart MR, Arbabi S, Garcia I, Maier RV (2000)

Interactions of calcium/calmodulin-dependent protein kinases(CaMK) and extracellular-regulated kinase (ERK) in monocyte adherence and TNF alpha production

Shock 13 (3): 183-189

Roux P and Blenis J (2004)

ERK and p38 MAPK-activated protein kinases: A family of protein kinases with diverse biological functions

Microbiol Mol Biol Rev 68 (2): 320-344

Roupe Van der Voort C, Kavelaars A, van de Pol M, Heijnen CJ (2000)

Noradrenaline induces phosphorylation of ERK-2 in human peripheral blood mononuclear cells after induction of α_1 -adrenergic receptors

J Neuroimmunol 108: 82-91

Rovida E, Baccarini M, Olivotto M, Sbarba PD (2002)

Opposite effects of different doses of MCSF on ERK phosphorylation and cell proliferation in macrophages

Oncogene 21: 3670-3676

Schindler R, Haubitz M (2000)

Niere und Immunsystem.

In: Koch K-M (Hrsg) Klinische Nephrologie. Urban & Fischer Verlag, München Jena, 1.Auflage, S 881-886

Schorey SJ and Cooper AM (2003)

Microreview macrophage signalling upon mycobacterial infection:
The MAP kinases lead the way

Cell Microbiol 5 (3): 133-142

Serradell M, Diaz-Ricart M, Cases A, Petriz J, Ordinas A, Escolar G (2003)

Uraemic medium accelerates proliferation but does not induce apoptosis of endothelial cells in culture

Nephrol Dial Transplant 18: 1079-1085

Singh AK, Brenner BM (2003)

Dialyse in der Behandlung des Nierenversagens.

In: Dietl M, Dudenhausen J, Suttrop N (Hrsg) Harrisons Innere Medizin. McGraw Hill Book Company, Deutsche Ausgabe der 15 Auflage, ABW-Verlag, S 1716-1721

Skorecki K, Green J, Brenner BM (2003)

Chronische Niereninsuffizienz.

In: Dietl M, Dudenhausen J, Suttrop N (Hrsg) Harrisons Innere Medizin. McGraw Hill Book Company, Deutsche Ausgabe der 15 Auflage, ABW-Verlag, S 1704-1715

Terada Y, Nakashima O, Inoshita S, Kuwahara M, Sasaki S, Marumo F (1999)

Mitogen –activated protein kinase cascade and transcription factors: the opposite role of MKK3/6-p38K and MKK1-MAPK

Nephrol Dial Transplant 14 [Suppl1]: 45-47

Tuyt LML, Dokter WHA, Birkenkamp K, Koopmans SB, Lummen C, Kruijer W, Vellenga E (1999)

Extracellular-regulated kinase 1/2, Jun N-terminal kinase and c-Jun are involved in NF- κ B-dependent IL-6 expression in human monocytes

J Immunol 162: 4893-4902

Vallance P, Collier J, Bhagat K (1997)

Infection, inflammation and infarction: does acute endothelial dysfunction provide a link?

Lancet 349 (9062): 1391-1392

Valldor AF, Comalada M, Xaus J, Celada A (2000)

The differential time-course of extracellular-regulated kinase activity correlates with the macrophage response toward proliferation or activation

J Biol Chem 275 (10): 7403-7409

Weissgarten J, Berman S, Modai D, Rosenberg R, Rapoport M, Cohen M, Averbukh Z (2002)

Zn metabolism affects apoptosis rate and proliferative responsiveness of PBMC from patients on chronic hemodialysis

Metabolism 51 (11): 1392-1396

Xia Z, Dickens M, Raingeaud J, Davis RJ, Greenberg ME (1995)

Opposing effects of ERK and JNK-p38 MAP kinases on apoptosis

Science 270 (5240): 1326-1331

Zebrack S, Anderson JL, Beddhu S, Horne BD, Bair TL, Cheung A, Muhlestein JB (2003)

Do associations with C-reactive protein and extent of coronary artery disease account for the increased cardiovascular risk of renal insufficiency?

JACC 42(1): 57-63

6. LEBENSLAUF

Persönliche Daten:

Name: Kampen
Vorname: Heike
Geburtsdatum: 07.04.1977
Geburtsort: Thuine
Familienstand: ledig

Eltern:

Anna Kampen, geb. Mersch
Manfred Kampen

Ausbildung:

1984-1988 Castellschule, heute Elisabethschule, Lingen
1988-1997: Franziskusgymnasium, Lingen
1997-2004: Medizinstudium an der Westfälischen Wilhelms-
Universität Münster und der University of Malta

Examina:

Ärztliche Vorprüfung	1999
Erster,	2000
Zweiter und	2002
Dritter Teil der Ärztlichen Prüfung	2004

Berufliche Tätigkeit:

Assistenzärztin in der Klinik für Neurologie im Klinikum Minden seit dem
1.10.2004

Ort, Datum

Unterschrift

ANHANG

Abkürzungsverzeichnis

A.	Arteria
AG	Antigen
AK	Antikörper
APZ	Antigenpräsentierende Zellen
BMM	<i>Bone-marrow-derived Macrophages</i>
BSA	<i>bovine serum albumin</i>
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
ca.	circa
dest.	destilliert
Cl	Chlorid
CRP	C-reaktives Protein
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
Da	Dalton
dl	Deziliter
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTT	Dithiothitol
ERK	extrazellulär signal-regulierte Kinase
et al.	et alii
FACS	<i>fluorescence-activated cell sorter</i>
FCS	Fetales Kälberserum
FITC	<i>Fluorescein Isothiocyanate</i>
GAPDH	Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase
GDP	Guanosindiphosphat
GEF	<i>guanin nucleotide exchange factor</i>
GFR	Glomeruläre Filtrationsrate
GM-CSF	<i>granulocyte-makrophage colony stimulating factor</i>
GTP	Guanosintriphosphat

Anhang

HD	Hämodialyse
H ₂ O	Wasser
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
IgG	Immunglobulin G
IL	Interleukin
JNK	c-Jun N-terminale Kinase
kDa	Kilodalton
LDS	Lithiumdodecylsulfat
LP(a)	Lipoprotein (a)
LPS	Lipopolysaccharid
MAPK	mitogen-aktivierte Proteinkinase
MAPKK	MAPK-Kinase
MAPKKK	MAPK-Kinase-Kinase
M-CSF	<i>macrophage colony stimulating factor</i>
MEK	MAPK oder ERK-Kinase-Kinase
mg	Milligramm
MHC	<i>major histocompatibility complex</i>
min	Minute
Mio.	Millionen
MKK	MAP-Kinase-Kinase
µl	Microliter
ml	Milliliter
µm	Micrometer
µM	micromol
mM	millimol
MMS	Monozyten-Makrophagen System
MPS	monozytäres Phagozyten-System
mRNA	<i>messenger RNA</i>
MW	Mittelwert
Na	Natrium
NI	Niereneinsuffizienz
NO	Stickstoffoxid

Anhang

PBMC	<i>peripheral blood mononuclear cells</i>
C12	Phäochromozytom-Zellen
PCNA	<i>proliferating cell nuclear antigen</i>
PD	Peritonealdialyse
PML	Polymorphkernige Leukozyten
RES	Retikuloendotheliales System
RHS	retikulohistiozytäres System
rpm	<i>rounds per minute</i>
SAPK	stress-aktivierte Proteinkinase
SD	<i>standard deviation</i>
s	Sekunden
TAC-Harnstoff	<i>time averaged concentration-Harnstoff</i>
TF	<i>Tissue factor</i>
TNF- α	Tumor Nekrose Faktor- α
UV	Ultraviolett
V	Volt
V.	Vena
z. B.	zum Beispiel
ZNS	Zentralnervensystem

Abbildungsverzeichnis

- Abb. I-1: Tabelle der Komplikationen bei Niereninsuffizienz modifiziert nach Harrison
- Abb. I-2: Prinzip der Hämodialyse
- Abb. I-3: Aufbau der Dialyse mit Dialysatkreislauf und extrakorporalem Kreislauf
- Abb. I-4: Monozyt
- Abb. I-5: MAPK-Kaskade
- Abb. II-1: Trennung der Blutbestandteile durch Dichtgradientenzentrifugation
- Abb. II-2: Standardproteinkurve
- Abb. II-3: Zusammensetzung des Blots
- Abb. II-4: Auswertung der Durchflusszytometrie
- Abb. III-1: Zeitkinetik
- Abb. III-2: Western Blot Zeitkinetik p38 basal
- Abb. III-3: Basale Expression der p38 MAPK
- Abb. III-4: Basale Expression der pp38 MAPK
- Abb. III-5: Western Blot der pp38 MAPK basal
- Abb. III-6: Basale Expression der ERK MAPK
- Abb. III-7: Expression der p38 MAPK basal und unter Hitzeexposition
- Abb. III-8: Western Blot der Expression der p38 MAPK basal und unter Hitze
- Abb. III-9: Expression der ERK MAPK basal und unter Hitzeexposition
- Abb. III-10: Expression der ERK MAPK unter Hitzeexposition vor und nach der HD
- Abb. III-11: Western Blot auf ERK MAPK von Monozyten nach Hitzeexposition
- Abb. III-12: Basale Expression der ERK MAPK vor und nach der HD
- Abb. III-13: Western Blot auf ERK unter basalen Bedingungen
- Abb. III-14: FACS-Analyse von Monozyten mit PCNA als Marker für Proliferation

Abb. III-15: Auswertung einer FACS-Analyse mit PCNA am Beispiel
einer Kontrolle

Abb. III-16: TF-Aktivität

Tabellenverzeichnis

- Tabelle II-1: Geräte
- Tabelle II-2: Arbeitsmaterialien
- Tabelle III-1: Basale Expression der p38 MAPK
- Tabelle III-2: Basale Expression der pp38 MAPK
- Tabelle III-3: Basale Expression der ERK MAPK
- Tabelle III-4: Expression der p38 MAPK basal und unter Hitzeexposition
- Tabelle III-5: Expression der ERK MAPK basal und unter
Hitzeexposition
- Tabelle III-6: Expression der ERK MAPK unter Hitzeexposition vor und
nach der HD
- Tabelle III-7: Basale Expression der ERK MAPK vor und nach der HD
- Tabelle III-8: FACS-Analyse von Monozyten mit PCNA
- Tabelle III-9: TF-Aktivität

Danksagung

Als erstem gilt besonderer Dank meinem Doktorvater Herrn Priv.-Doz. Dr. med. D. Lang für die Übernahme der Betreuung der Arbeit nach dem Weggang von Prof. Dr. med. S. Heidenreich, die Bereitstellung der Arbeitsplätze und Materialien sowie die stets verlässliche Betreuung und die überaus engagierte und kompetente fachliche Hilfe während der Dissertation.

Zudem geht mein Dank an Herrn Professor Dr. med. S. Heidenreich für die Vergabe des Themas und das über das Ende der eigentlichen Betreuung hinausgehende Engagement.

Ein Dank geht an Dr. med. Schulte Vorwick und an Dr. med. Zangerl aus dem Kuratorium für Hemodialyse Münster für die Bereitstellung von Blutproben und die Erleichterung der Patientenakquirierung.

Bedanken möchte ich mich bei allen Mitarbeitern des immunologisch-nephrologischen Labors, die mir bei Problemen und Fragen stets geduldig geholfen haben und durch die Schaffung eines netten Arbeitsklimas meine Arbeit sehr bereichert haben.

Vielen Dank an meine Mitdoktoranden für zahlreiche konstruktive Gespräche und Ermutigungen.

Ich bedanke mich ganz herzlich bei meiner Familie und bei meinen Freunden, die mich stets unterstützt haben und Verständnis aufgebracht haben.