

Klinische Abteilung des Deutschen Diabetes-Zentrums

an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Leibnitz-Zentrum für Diabetes-Forschung

Ärztlicher Direktor: Prof. Dr. med. W.A. Scherbaum

Analyse der prädiktiven Bedeutung der Expression von pro- und antiinflammatorischen Zytokinen auf Protein und Genexpressions (mRNA)- Ebene bei Hämodialysepatienten.

Dissertation
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Medizin

Der Medizinischen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Reiner Füh

2007

meiner Familie in Liebe gewidmet

Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
gez.: Univ.-Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. Bernd Nürnberg
Dekan

Referent: Prof. Dr. med. S. Martin
Korreferent: PD Dr. med. G. R. Hetzel

Inhaltsverzeichnis

| | Seite |
|---|-----------|
| 1 Einleitung | 5 |
| 1.1 Regulation des Immunsystems | 5 |
| 1.1.1 Das Immunsystem im Allgemeinen | 5 |
| 1.1.2 Das TH1 / TH2 Konzept | 6 |
| 1.1.3 Proinflammatorische Immunmediatoren | 8 |
| 1.1.4 Antiinflammatorische Immunmediatoren | 9 |
| 1.2 Immunpathogenese der Arteriosklerose | 11 |
| 1.2.1 Einführung | 11 |
| 1.2.2 Arteriosklerose und Inflammation | 13 |
| 1.2.3 Immunität der Arteriosklerose | 18 |
| 1.3 Progression der Arteriosklerose bei Dialyse | 24 |
| 1.3.1 Aktivierungsmechanismen bei Kontakt von Blutkomponenten mit künstlichen Oberflächen bzw. Dialysemembranen | 24 |
| 1.3.2 Das immunologische Paradoxon der Urämie | 29 |
| 1.4 Einführung in die Real Time PCR | 31 |
| 1.5 Ziele der Forschungsarbeit | 33 |
| 2 Material und Methode | 34 |
| 2.1 Patientenkollektiv | 34 |
| 2.1.1 Dialysepatienten | 34 |
| 2.1.2 gesundes Kontroll-Kollektiv | 34 |
| 2.2 Real Time PCR zur Zytokinbestimmung | 36 |
| 2.3 ELISA-Technik der Zytokinbestimmung | 49 |
| 2.4 Statistische Analysen | 55 |

| | Seite |
|--|-----------|
| 3 Ergebnisse | 56 |
| 3.1 Kinische Charakterisierung des Patientenkollektivs | 56 |
| 3.2 Immunmediatoren im Verlauf der Dialyse | 58 |
| 3.2.1 Verhalten der proinflammatorischen TH-1 Zytokine im Verlauf der Dialyse | 58 |
| 3.2.2 Verhalten der antiinflammatorischen TH-2 Zytokine im Verlauf der Dialyse | 63 |
| 3.2.3 Veränderung von akut Phase Protein Spiegeln (CRP und SAA) im Verlauf der Dialyse | 65 |
| 3.3 Korrelationen zwischen den Immunmediatoren | 67 |
| 3.3.1 Korrelationen auf Proteinebene | 67 |
| 3.3.2 Korrelationen auf mRNA-Ebene | 71 |
| 3.3.3 Korrelationen beim Vergleich Protein- zu mRNA-Ebene | 72 |
| 3.4 Mortalitätsdaten | 75 |
| 3.4.1 Veränderung der auf Proteinebene gemessenen pro- und antiinflammatorischen Zytokine in Bezug auf die Mortalitätsrate | 75 |
| 3.4.2 Veränderung der auf mRNA-Ebene gemessenen pro- und antiinflammatorischen Zytokine in Bezug auf die Mortalitätsrate | 78 |
| 3.4.3 Mortalitätsrate der Dialysepatienten auf Proteinebene | 80 |
| 3.4.4 Mortalitätsrate der Dialysepatienten auf mRNA-Ebene | 81 |
| 3.5 Überlebenskurven | 82 |
| 4 Diskussion | 84 |
| 5 Zusammenfassung | 90 |
| 6 Literaturverzeichnis | 92 |
| Danksagung | 103 |

1 Einleitung

1.1 Regulation des Immunsystems

1.1.1 Das Immunsystem im Allgemeinen

Das Immunsystem des menschlichen Organismus hat sich in der Evolution entwickelt, um körperfremde Substanzen zu identifizieren und über entsprechende Eliminationswege aus dem Körper auszuschleusen. Mechanische Barrieren wie Haut oder Schleimhaut sind bereits mit einem aktiven Mechanismus ausgestattet, der einen ersten Schutz gegen körperfremde Umwelteinflüsse verleiht. Grundlage und Aufgabe des Immunsystems bestehen also darin, zwischen Selbst und nicht-Selbst zu unterscheiden und Materialien, die als nicht-Selbst -also körperfremd- erkannt werden, zu eliminieren. Der immunologischen Abwehr und Elimination von körperfremdem Material stehen neben humoralen Plasmakomponenten, wie Akut-Phase-Proteine, Komplementproteine, Antikörpern und Zytokinen, vor allem spezialisierte Zellen, wie Monozyten, Makrophagen, Granulozyten, natürliche Killerzellen sowie B- und T-Lymphozyten, die gemeinsam dem zellulären Immunsystem zugerechnet werden, zur Verfügung. In den letzten hundert Jahren hat sich die Forschung mit dem Verständnis der Regulation und Kommunikation der verschiedenen Zellfunktionen beschäftigt und ein komplexes Netzwerk von Interaktionen aufgestellt [1,2].

Zytokine bzw. Interleukine sind die Substanzen, welche die Immunabwehr gezielt organisieren. Es handelt sich dabei um eine Protein-Familie im Molekulargewichtsbereich zwischen 5000 und 40000 Dalton, die durch Aktivierung verschiedener Zellen produziert und freigesetzt werden. Aus Zellkulturuntersuchungen ist bekannt, dass durch Einsatz von einzelnen Zytokinen bzw. durch Kombination von verschiedenen Zytokinen oder auch Wachstumsfaktoren die Funktion von Zellen wie z.B. Proliferation von Antigenen stimuliert bzw. moduliert werden kann [3].

Bis heute sind ca. 160 unterschiedliche Oberflächenmerkmale von Zellen bekannt (sog. „Cluster of Differentiation“ (CD), Oberflächenantigene), die z.B. durch die Wirkung von Zytokinen von verschiedenen Zelltypen wie Monozyten, Makrophagen, T-Zellen oder B-Zellen exprimiert werden [4]. Dazu gehören auch sogenannte Zytokinrezeptoren, über die letztendlich Aktivierung und Funktionsänderung stattfinden.

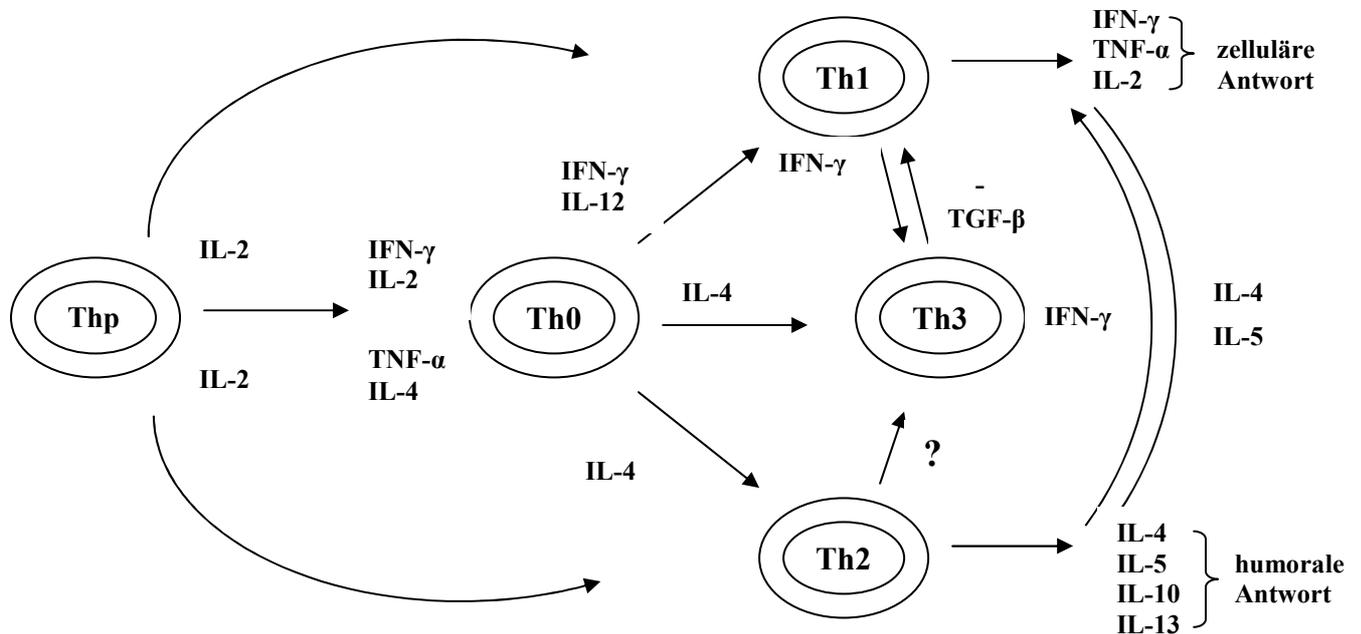
Die Kommunikation zwischen Zellen, wie Aktivierung, Proliferation, Differenzierung oder gerichtete Bewegung (Chemotaxis), wird also durch Mediatoren vermittelt, die entweder aus humoralen Effektorsystemen, wie z.B. dem Komplementsystem, oder aus Zellen freigesetzt werden. Die letzteren fasst man als Zytokine zusammen. Die Wirkung der Zytokine auf ihre Zielzelle wird in erster Linie von der Umgebung bestimmt, in welcher sie wirken; so können verschiedene Zytokine auf dieselbe Zelle einen inhibitorischen, synergistischen oder additiven Effekt haben. Letztendlich resultiert aus der Vielzahl von Informationen und Einflüssen eine sehr präzise Antwort des Organismus auf einen Reiz.

Kommt es zu einem Ausfall einer dieser Effekte, ist die Folge eine Immundefizienz. Gerät das Gleichgewicht des Immunsystems aus der Balance, kann es zu einer einseitigen Aktivierung des Immunsystems und in deren Folge zu immunmedierten Erkrankungen wie z.B. der multiplen Sklerose, rheumatoiden Arthritis oder des Typ-1 Diabetes kommen.

1.1.2 Das Th1/TH2- Konzept (Regulation der Immunantwort):

Einen besonderen Stellenwert in dieser Regulation wird den T-Lymphozyten zugeschrieben, die aufgrund ihrer Oberflächenstrukturen in CD4 (T-Helfer-Zellen) und CD8 (T-Suppressor-Zellen) positive Lymphozyten differenziert werden. 1988 gelang es, die CD4 Lymphozyten auf der Basis der von ihnen sezernierten Zytokine weiter zu differenzieren [5]. Dieses Konzept besagt, dass Th1-Lymphozyten TNF- α , IFN- γ und IL-2 bilden, Th2-Lymphozyten im Gegensatz dazu IL-4, IL-5, IL-10 und IL-13 [6,7]. In Zellkulturen ist die Entstehung von Th1-Klonen normalerweise dominant über die der Th2-Klone. Neben den ursprünglich von Mosman et al. beschriebenen Th1- und Th2-Subtypen wurde später der Th3-Subtyp definiert, der in erster Linie den transformierenden Wachstumsfaktor (TGF- β) bildet [8].

Abb. 1: Th1/Th2-Modell erweitert nach Mosmann et al., (1986)



Wie in Abb. 1 zu erkennen, sezernieren die Th-Vorläuferzellen (Thp) ausschließlich IL-2 und differenzieren sich so zu Th0-Zellen, welche IL-2, IL-4, IFN- γ und TNF- α bilden können. Th0-typische Zellen differenzieren sich unter dem Einfluß von IL-12 und IFN- γ in Th1-typische Zellen, unter dem Einfluß von IL-4 in Th2-typische Zellen und unter dem Einfluß von IL-4 und monoklonalen Antikörpern (mAk) gegen IL-12 in Th3-typische Zellen. Die drei Th-Subtypen regulieren ihre eigene Proliferation durch selbst sezernierte Zytokine und inhibieren bzw. stimulieren die Proliferation der jeweiligen anderen Subtypen. Th1-typische Zellen sind beteiligt an der zellulären Immunität und am Isotyp-Klassenwechsel der B-Zellen zu Immunglobulin 2a (IgG2a). Th2-typische Zellen induzieren den Isotyp-Klassenwechsel zu IgG1/IgE und sind an der humoralen Immunantwort beteiligt. Von Th3-typischen Zellen ist bekannt, daß von ihnen gebildetes TGF- β 1 inhibitorisch auf das Wachstum von Th1-Zellen wirkt.

Von besonderer Bedeutung ist, dass sich Th1- und Th2-Lymphozyten gegenseitig inhibieren, so dass bei einer normalen Immunität ein Gleichgewicht dieser beiden Zellsysteme besteht. Für eine Reihe von immunmedierten Erkrankungen konnte gezeigt werden, dass eine Dysbalance von Th1- zu Th2-Zellen entweder eine krankheitsprotektive oder eine krankheitsfördernde Wirkung hat.

So wurde -wie oben bereits erwähnt- für den Diabetes mellitus Typ1, die multiple Sklerose oder die rheumatoide Arthritis gezeigt, dass ein Überwiegen von Th-1 Lymphozyten einen Schub der Erkrankung auslösen kann. Hingegen konnte für Erkrankungen wie atopische Dermatitis oder den Morbus Basedow eine krankheitsauslösende Wirkung von Th-2 Lymphozyten zugeschrieben werden [9-11].

Transskriptionelle Regulation der TH1 / TH2- Immunreaktion

Die Regulation einer sich entwickelnden TH-Antwort nach Antigenexposition wird einerseits gesteuert durch die Antigenendosis, die Signalstärke und durch kostimulatorische Moleküle, andererseits aber auch durch die Wirkung lokal gebildeter Zytokine wie IL-12 oder IL-4. Dabei aktiviert das von B-Zellen und Makrophagen gebildete IL-12 einen Transkriptionsfaktor STAT 4 (Signal-Transducer and Activator der Transkription) und induziert eine TH1-typische Immunreaktion, während das von TH2-typischen Zellen und B-Zellen gebildete IL-4 STAT 6 aktiviert und eine TH2-typische Immunreaktion einleitet [12]. Durch die antagonistische Wirkung der TH1- und der TH2-Zellen, wird bereits an therapeutischen Ansätzen gearbeitet, z.B. Stärkung der TH2-Immunantwort bei TH1-dominiertem Entzündungsverlauf und umgekehrt. Warum sich eine proliferierende CD4-T-Zelle zu einer TH1- oder TH2-Zelle entwickelt, ist noch unklar. Welche Zytokine durch den Erreger hervorgerufen werden, welche Kostimulatoren gewählt werden, um die Antwort anzutreiben und wie der MHC-Ligand aussieht, all das spielt hier eine Rolle. Da die Entscheidung, TH1- oder TH2-Zellen zu werden, bereits in den Anfangsstadien der Immunantwort fällt, ist vor allem die Fähigkeit der Pathogene, die Zytokinproduktion durch Zellen des nicht angeborenen, nichtadaptiven Immunsystems zu stimulieren, für die Form der folgenden adaptiven Antwort entscheidend. Die Konsequenz der Entscheidung, ob TH1- oder TH2-Zellen gebildet werden, sind weitreichend: Die selektive Bildung von TH1-Zellen führt zu einer zellvermittelten Immunität, während die selektive Produktion von TH2-Zellen eine humorale Immunität hervorruft.

1.1.3 Proinflammatorische Immunmediatoren:

Zytokine induzieren oder supprimieren die zelluläre Chemotaxis und Proliferation sowie die Freisetzung weiterer Transmitter. Zu den proinflammatorischen Zytokinen zählen IL-1b, IL-6, sIL-6-Rezeptor, IL-8, IFN- γ und TNF- α , die von Immunzellen oder von En-

endothelzellen gebildet werden. Auslöser sind gewebeschädigende Noxen wie Hypoxie, Trauma oder Bakterientoxine.

IL-6 wird innerhalb von 4-6 Stunden sezerniert, TNF- α innerhalb von 12-48 Stunden. Beide Zytokine induzieren die CRP-Freisetzung in Hepatozyten. Vom zeitlichen Ablauf sind IL-6 und TNF- α sehr frühe Inflammationsmarker im Unterschied zu CRP, welches erst nach 24-36 Stunden nachweisbar ist. Im Gegensatz zu IL-6 ist die Bestimmung von TNF- α anspruchsvoller, da es eine extrem kurze Halbwertszeit von weniger als 5 Minuten hat.

TNF- α (Tumor Nekrose Faktor α) als Beispiel eines TH1-Zytokins

TNF- α nimmt eine dominierende Rolle im sogenannten Zytokinnetzwerk und damit in der Pathogenese zahlreicher infektiöser und entzündlicher Erkrankungen ein. Der Tumornekrosefaktor wird nach seiner Eigenschaft benannt, bei Versuchstieren in transplantierten Tumoren eine hämorrhagische Nekrose zu verursachen. TNF- α ist ein physiologisch aktives Protein von 17 kD und 156 Aminosäurenlänge. Für TNF- α kodiert ein 3,6 kb großes, 4 Exone enthaltendes Gen auf dem Chromosom 17 der Maus. Gebildet wird TNF α von Makrophagen, NK-, Mast-, Endothel- und Th1-Zellen. Seinen Namen bekam TNF- α durch seine Wirkung auf Tumorzellen, wo TNF- α zur Zytolyse und Zytostase führte. TNF- α ist ein proinflammatorisch wirkendes Zytokin, welches die Phagozytose von Makrophagen und die Expression von Adhäsionsmolekülen auf Endothelzellen stimuliert. Außerdem ist TNF- α an der Proliferation von B-Zellen und Th1-typischen Zellen beteiligt, wo es seine eigene Synthese autokatalytisch regulieren kann [13].

1.1.4 Antiinflammatorische Immunmediatoren

TGF- β (Transformierender Wachstumsfaktor β)

Physiologischerweise scheint TGF- β zentral für Wundheilungsprozesse zu sein. TGF- β 1 liegt biologisch aktiv als 14 kD Homodimer von 112 Aminosäuren Länge vor. Außer TGF- β 1 existieren noch vier andere Isoformen, TGF- β 2, TGF- β 3, TGF- β 4 und TGF- β 5. Ein Gen mit 7 Exonen und ca. 100 kb Länge kodiert für TGF- β 1, der von Th3-typischen Zellen, Makrophagen und Endothelzellen gebildet wird. TGF- β 1 induziert die Synthese von Matrixproteinen auf Endothelzellen und den IgA bzw. IgG2a Isotyp-Klassenwechsel in B-Zellen. Als anti-inflammatorisches Zytokin hemmt TGF- β 1 die

Synthese von IFN- γ , aber auch die IL-2-abhängige Proliferation der Th1-typischen Zellen, wobei es synergistisch mit dem von Th2-typischen Zellen gebildeten IL-4 wirken kann.

Außerdem unterdrückt TGF- β 1 die Generierung von Stickstoffmonoxid (NO) und reaktiven Sauerstoff Spezies (ROS), die von Makrophagen und Monozyten gebildet werden [14-16]. Zusammen mit dem Antigen 4 zytotoxischer T-Lymphozyten (CTLA-4) kann TGF- β 1 inflammatorischen Auto-immunreaktionen entgegenwirken und Th0-, Th1- bzw. Th2-typische Zelle können nach Kreuzvernetzung mit CTLA-4 ebenfalls TGF- β 1 bilden [17].

1.2 Immunpathogenese der Arteriosklerose

1.2.1 Einführung

Nach der WHO-Definition ist die Atherosklerose eine variable Kombination von Veränderungen der Intima, bestehend aus herdförmiger Ansammlung von Lipidsubstanzen, komplexen Kohlenhydraten, Blut und Blutbestandteilen. Dieser folgen Bindegewebsproliferation und Kalziumablagerungen verbunden mit Schädigung der Arterien-media.

Der Terminus „Arteriosklerose“ ist ein Sammelbegriff für verschiedene metabolische und degenerative Arterienerkrankungen, die mit einer Verhärtung (Sklerose) der Arterienwand einhergehen. Vielfach wird jedoch der Begriff „Arteriosklerose“ im engeren Sinne für „Atherosklerose“ gebraucht, d.h. im allgemeinen medizinisch-klinischen Sprachgebrauch wird mit „Arteriosklerose“ auch „Atherosklerose“ gemeint.

Die Arteriosklerose ist eine chronische, in Schüben verlaufende Arterienerkrankung, deren Beginn oft schon in der Jugend liegt und die mit ihren Folgeerkrankungen die häufigste Erkrankung in industrialisierten Ländern darstellt und dabei etwa die Hälfte aller Todesfälle verursacht.

Die Kenntnis der Pathophysiologie der Arteriosklerose hat sich in den letzten Jahrzehnten grundlegend gewandelt. Während man früher annahm, dass der arteriosklerotische Prozess im Wesentlichen in der Ablagerung von Lipiden und Lipoproteinen in der Gefäßwand besteht, weiß man heute, vor allem aufgrund umfangreicher Daten aus dem Bereich der vaskulären Biologie, dass dies eine sehr vereinfachte Vorstellung war. Arteriosklerose muss als ein hochkomplexer, aktiver Prozess betrachtet werden und ist wesentlich durch eine inflammatorische Reaktion in der Gefäßwand charakterisiert. Bereits in der Frühphase, im Stadium der endothelialen Dysfunktion, kommt es mit dem Anhaften verschiedenster Blutzellen an das Endothel zu einer lokalen inflammatorischen Reaktion in der Gefäßwand.

Ebenfalls handelt es sich bei der Arteriosklerose aber auch um eine systemische inflammatorische Reaktion, die durch die bekannten Risikofaktoren der Arteriosklerose (siehe Tab.1) mit ausgelöst bzw. beschleunigt wird.

Tab. 1: Prädisponierende Faktoren der Arteriosklerose

| | |
|---|---|
| 1. Hyperlipoproteinämie | a) primäre Hyperlipoproteinämie ohne Grunderkrankung: z.B. Typ I = Hypertriglyzeridämie Typ II =Hypercholesterinämie etc. b) sekundäre Hyperlipoproteinämien als Symptom verschiedener Grundkrankheiten. z.B. Gicht, Hypothyreose |
| 2. Diabetes mellitus | |
| 3. Übergewicht (Adipositas) | fett- und kohlenhydratreiche Nahrung bei ungenügender körperlicher Betätigung. |
| 4. arterielle Hypertonie | |
| 5. Nikotinabusus | Übermäßiger Zigarettenkonsum vermindert den HDL-Spiegel, der Fibrinogenspiegel steigt. |
| 6. Übermäßiger psychischer und körperlicher Stress | |
| 7. Hereditäre und konstitutionelle Faktoren | Vorwiegend Defekte des LDL-Rezeptors und Polymorphismen der Apolipoproteine. Die familiäre Häufung der Arteriosklerose ist erwiesen. Wie weit dies von genetisch-konstitutionellen Faktoren oder aber von der Lebensweise und Ernährung abhängt, ist nicht geklärt. |
| 8. Alter und Geschlecht | Zunehmende Inzidenz der arteriosklerotischen Läsionen im Alter und nach der Menopause bei Frauen. |

1.2.2 Arteriosklerose und Inflammation

Die Beteiligung des Immunsystems an der Pathogenese der Arteriosklerose wird seit langem diskutiert [18-21]. Bereits Virchow beschrieb eine entzündliche Komponente bei arteriosklerotischen Plaques [22].

In den letzten Jahren sind nun zunehmend inflammatorische Ereignisse in der Pathogenese der Arteriosklerose entdeckt worden [23,24], die uns heute eine Neuinterpretation dieser Geschehnisse erlauben.

Dieses Modell „response to injury“ des amerikanischen Pathologen Ross bietet eine Erklärungsmöglichkeit für die Assoziation zwischen Inflammation und Gefäßwandveränderungen.

Inflammation bezeichnet allgemein eine Reaktion des Körpers auf Gewebsverletzungen, Infektionen oder Immunstimulation als Schutz gegen fremde oder endogene Substanzen. Diese Entzündungsreaktion führt zu einer Reihe biochemischer und zellulärer Veränderungen, deren Ausmaß mit der Größe des initialen Traumas korreliert („response-to-injury-Hypothese“).

Bei einer Reihe von Erkrankungen kommt hingegen einer überschießenden Aktivität der inflammatorischen Antwort eine pathogenetisch ursächliche oder verschlimmernde Bedeutung zu. Systemische Manifestation der inflammatorischen Antwort sind: Erhöhung der Körpertemperatur sowie die Vielzahl biochemischer Veränderungen, die als Akute-Phase-Reaktion bekannt sind und zur Bildung der Akute-Phase-Proteine (CRP) in der Leber führen.

Die lokale inflammatorische Reaktion ist durch die initiale Blutflusssteigerung sowie gesteigerte Gefäßpermeabilität und den Zustrom selektiver Effektorzellen aus dem peripheren Blut gekennzeichnet. Das gehäufte Vorkommen der neutrophilen Granulozyten mit unspezifischer Phagozytose ist ein frühes Zeichen der Entzündungsreaktion. Zu einem späteren Zeitpunkt gelangen dann die Monozyten-Makrophagen und andere Zellen aus der Lymphozytenreihe (v.a. T- und B-Zellen) an den Ort des Geschehens. Diese Zelltypen sind Antigen-spezifisch für die lokale Immunantwort.

Nach ihrer Aktivierung beginnen sie mit der Produktion pro-inflammatorischer und anti-inflammatorischer (protektiver) Moleküle. Pro-Inflammation-torische-Zytokine beschleunigen die Entzündungsreaktion entweder auf direktem Weg oder durch Synthese zellulärer Adhäsionsmoleküle, sowie durch Bildung anderer Zytokine in speziellen Zelltypen.

Dazu zählt man unterschiedlichste Chemokine, eine Reihe von Interleukinen, TNF- α , CSF (Colony Stimulating Faktor), INF- γ und eine große Anzahl neuromodulatorischer Faktoren. Unter Normalbedingungen wird die durch Mediatoren induzierte Entzündungskaskade streng reguliert. Ein Scheitern des Systems führt zum multiplen Organversagen (z.B. septischer Schock).

Aus diesem Grund besteht großes Interesse an der Modulation und Verbesserung der Effekte der Inflammation und ihrer Folgen. Die initialen Prozesse der Atherogenese sind zur Zeit Gegenstand intensiver Diskussion.

Bei der derzeit gängigen Hypothese [23,24] der Entstehung der atherosklerotischen Läsion wird von einer primären Schädigung des Gefäßendothels ausgegangen. Hypoxie, Akkumulation von Lipiden (LDL), toxische oder entzündliche Einflüsse führen zu einer initialen Endotheldysfunktion, die sich primär in einer Änderung der endothelialen Oberflächeneigenschaften äußert. Immunchemisch konnte gezeigt werden, dass es bereits vor der Bildung der Lipidplaques zu einer Ansammlung von Blutmonozyten in der Gefäßwandintima kommt [25], sowie zu einem Überwiegen von thrombogenen gegenüber antithrombogenen Eigenschaften des Endothels. Dies führt zu erhöhter Permeabilität der Intima und zur Entstehung eines initialen lipoiden Plaques.

Die Ursache der vermehrten Adhärenz von Monozyten an das Endothel wird unter anderem durch die oben beschriebenen erhöhten LDL-Plasmaspiegel induziert, da oxidiertes LDL zu einer proinflammatorischen Veränderung des Gefäßendothels führt [26,27]. Oxidiertes LDL wirkt chemotaktisch auf Monozyten und unterstützt die Expression von Adhäsionsmolekülen auf Endothelzellen [28,29].

Nach der Adhäsion und subendothelialen Migration der Monozyten kommt es nun im subendothelialen Raum zur Umwandlung der Monozyten zu Gewebsmakrophagen bzw. durch Phagozytose von oxidiertem LDL zu Schaumzellen [30].

Zusätzlich konnten in diesen arteriosklerotischen Plaques aktivierte T-Lymphozyten und antigenpräsentierende Zellen nachgewiesen werden [31]. Diese Ansammlung immunkompetenter Zellen in der Plaque führt zur Sekretion verschiedener Wachstumsfaktoren (PDGF) und Zytokine wie IL-1, IL-6 und IL-8 sowie zur Expression von Adhäsionsmolekülen im Sinne einer entzündlichen Veränderung des Gewebes.

Vor allem dem Wachstumsfaktor PDGF (platelet derived growth factor), der für glatte Muskelzellen und kollagene Fasern mitogen und chemotaktisch wirkt, kommt hier eine entscheidene Rolle zu.

Damit wird das Wachstum von Zellen im Bereich der Intima stimuliert und glatte Muskelzellen werden aus der Media rekrutiert. Alle diese Vorgänge führen zur Bildung einer Fibrose-Kappe in den fortgeschrittenen arteriosklerotischen Plaques. Diese Kappe grenzt das Innere der Plaque gegen die Blutbahn ab.

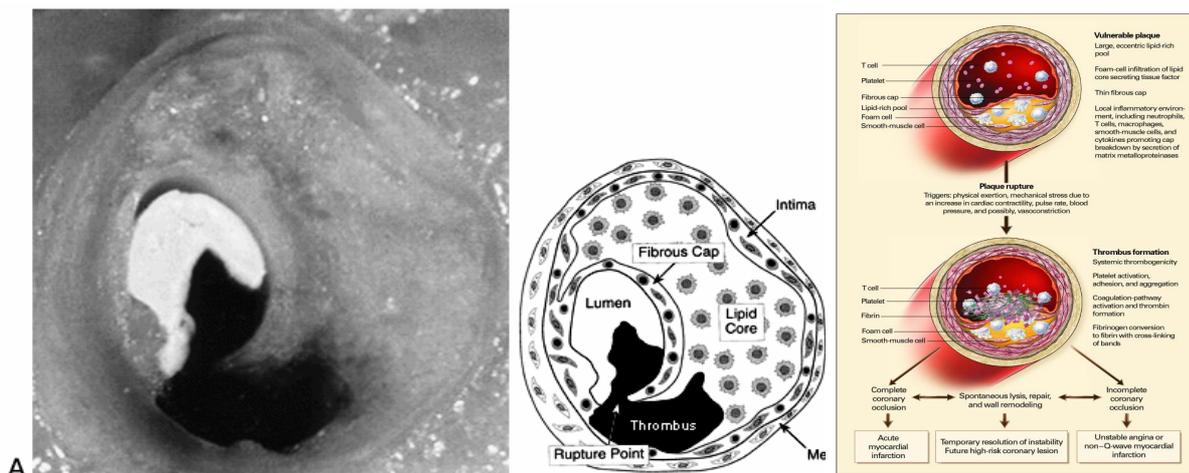


Abb. 2: Pathogenese der Arteriosklerose

I. Gesunde Arterie:

LDL diffundiert aus dem Gefäßlumen in die Intima, wo es an Matrixproteine gebunden wird. Einige Partikel werden dort modifiziert.

II. „Fatty streak“:

Modifiziertes LDL aktiviert Endothelzellen, um Adhäsionsmoleküle und Chemokine zu exprimieren. Leukozyten bleiben an den Endothelzellen haften und wandern in die Intima. Differenzierte Makrophagen und glatte Gefäßmuskelzellen phagozytieren oxLDL, akkumulieren intrazellulär Cholesterin und aktivieren T-Zellen zur Sekretion von Zytokinen und Chemokinen.

III. Beginnende arteriosklerotische Läsion:

Zytokin/Chemokin-aktivierte glatte Muskelzellen wandern in die Intima ein. Es kommt zur weiteren Akkumulation aus dem Blut stammender Zellen und Beginn der Inflammation.

IV. Fortgeschrittene arteriosklerotische Plaque:

Unter einer hauptsächlich aus intimalen glatten Muskelzellen bestehenden Fibrin-kappe finden sich nekrotisch-calcifizierende Anteile mit Fettanteilen.

V. Komplizierte Läsion:

Durch die von Makrophagen, Mastzellen und glatten Muskelzellen produzierten Proteasen wird die extrazelluläre Matrix instabil und führt zur Verletzung der Endothelzellen. Dadurch bekommt die extrazelluläre Matrix Kontakt mit dem Gefäßlumen, was unverzüglich zu einer Aktivierung des Gerinnungssystems führt, und zwar mit der Bildung von Thromben.

Der Trigger für ein Aufbrechen der Plaque ist bis heute nicht wirklich bekannt. Häufig findet man jedoch eine Akkumulation aktivierter Makrophagen, T-Zellen und Mastzellen in der Nähe der Plaqueruptur. Dies unterstützt die Annahme, dass eine chronische Entzündungsreaktion zur Instabilität der Plaque führt. Aktivierte T-Zellen führen zur Sekretion von Kollagenasen, Elastasen und anderen proteolytischen Enzymen, die zur Abtragung der Fibrinkappe der Plaque führen. Die aktivierten T-Zellen führen weiter zu einer Induktion von Apoptose in den glatten Muskelzellen. Ergebnis sind die instabilen Plaques, die leicht rupturieren können.

Rolle des thrombozytären Gerinnungssystems

Desweiteren entsteht an der luminalen Seite arteriosklerotischer Läsionen vermehrt Thrombin, was Aktivierung und Aggregation von Thrombozyten sowie Fibrinpräzipitation bewirkt. Darüber hinaus hat Thrombin auch eine stark mitogen, proliferationsfördernde Wirkung auf glatte Muskelzellen der Media, die zu einer weiteren Progression des Geschehens führt. Auch eine Beteiligung des humoralen Immunsystems konnte bei der Pathogenese der Arteriosklerose mittels Nachweis von Autoantikörpern gegen oxidiertes LDL [32] und gegen das Stressprotein HSP 65 [33] gezeigt werden. Anhand von immunzytochemischen Untersuchungen von rupturierten Plaques konnte ein Zellinfiltrat wie bei einer akuten Entzündungsreaktion nachgewiesen werden [34].

Die systemische inflammatorische Antwort

Neben dieser lokalen Entzündungsreaktion ist die Arteriosklerose jedoch ebenfalls wie oben beschrieben durch eine systemische inflammatorische Antwort charakterisiert. Durch eine Reihe bereits identifizierter proinflammatorischer Stimuli (siehe Tab.1), wie zum Beispiel die oben genannten Risikofaktoren Rauchen, Übergewicht, Typ-2-Diabetes, aber auch andere bislang nicht identifizierte Faktoren, kommt es zur Bildung von primären proinflammatorischen Zytokinen wie IL-1 und TNF- α (Tumor-Nekrose-Faktor). Über die Stimulation von Botenzytokinen wie z.B. IL-6 wird die Akute-Phase-Reaktion in der Leber induziert. Gleichzeitig werden Adhäsionsmoleküle, Hitze-Schock-Proteine und andere Mediatoren aus Endothel- und anderen Zellen freigesetzt. Diese systemische Entzündungsreaktion ist im Blut durch eine Leukozytose, eine erhöhte Blutkörperchen-Senkungs-Reaktion und durch erhöhte Werte des C-reaktiven Proteins gekennzeichnet. In einer Vielzahl von Studien konnte gezeigt werden, dass ein starker Zusammenhang zwischen systemisch messbaren Inflammationsmarkern und konsekutiven kardiovaskulären Endpunkten besteht.

Die „physician’s health study“ [35] lieferte die ersten Hinweise auf einen Zusammenhang zwischen inflammatorischer Aktivierung und Progredienz der Arteriosklerose. In dieser großen Primärpräventionsstudie wiesen die Patientengruppen mit den höchsten Werten für CRP als Zeichen einer systemischen Mikroinflammation den ungünstigsten Verlauf hinsichtlich kardiovaskulärer Ereignisse auf. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass Patienten mit erhöhtem CRP von der Einnahme mit Acetylsalicylsäure (ASS) profitierten, während dies bei denen mit niedrigem CRP nicht der Fall war. Die systemische Inflammation beim Dialysepatienten ist dramatisch ausgeprägter als bei den nierengesunden Probanden der „physician’s health study“. Auch für dieses Kollektiv ist die Assoziation zwischen Inflammation und kardiovaskulären Ereignissen inzwischen gut belegt. So ist ein zufällig und einmalig bestimmter CRP-Wert bei einem Dialysepatienten ohne Infektionskomplikationen prädiktiv für sein Risiko, ein kardiovaskuläres Ereignis zu erleiden [36]. In weiteren Studien konnte gezeigt werden, dass es durch Behandlung mit Statinen zu einer Abnahme der CRP-Konzentration um 15-25 % kommt und so bei den Patienten in der primären und sekundären Prävention das Risiko für kardiovaskuläre Ereignisse um bis zu 20-40 % gesenkt werden konnte [37]. Aber auch bei der Höhe der Leukozytenzahl konnte ein Zusammenhang zwischen inflammatorischer Aktivierung und Progredienz der Arteriosklerose gesehen werden. So korreliert das Reinfarkt-Risiko mit der Leukozytenzahl [38] und die Mortalität in den ersten 2 Monaten nach Infarkt ist vierfach erhöht, wenn die Leukozytenzahl 15000/ μ l übersteigt [39].

Somit scheinen entzündliche Prozesse bei der Pathogenese der Arteriosklerose eine wesentliche Rolle zu spielen. Desweiteren wird als eine entzündliche Ursache für die Entwicklung der Arteriosklerose auch Infektionen mit Chlamydien, CMV- und Herpes-Viren diskutiert [40,41].

1.2.3 Immunität der Arteriosklerose

Schlüsselrolle des oxidierten LDL

Die Schlüsselrolle in der Pathogenese der Arteriosklerose spielt nach den neuesten Erkenntnissen das modifizierte LDL als Antigen für die adaptive Immunität.

Die adaptive Immunabwehr wird unter anderem durch zwei Arten von Lymphozyten gewährleistet, den T-Lymphozyten und B-Lymphozyten. Sie stellen wesentliche Komponenten der zellulären bzw. humoralen Immunität dar.

Man spricht in diesem Zusammenhang von der Dichotomie der Lymphozyten. Alle Entwicklungsstadien der arteriosklerotischen Plaques sind durch eine Ansammlung von immunkompetenten Zellen, d.h. Monozyten und Lymphozyten gekennzeichnet [26], [42]. Immunchemisch konnte gezeigt werden, dass es bereits vor der Bildung der Lipidplaques zu einer Ansammlung von Blutmonozyten in der Gefäßintima kommt [43]. Diese vermehrte Adhärenz von Monozyten an das Endothel wird unter anderem durch erhöhte LDL-Plasmaspiegel induziert, da oxidiertes LDL gemäß der „response-to-injury“-Hypothese zu einer pro-inflammatorischen Veränderung des Gefäßendothels führt [26]. Oxidiertes LDL wirkt chemotaktisch auf Monozyten, die durch die Aufnahme von oxLDL zu Schaumzellen werden [26,43]. In der Plaque kommt es zur Sekretion verschiedener Wachstumsfaktoren wie PDGF und TGF- β und Zytokine wie IL-1, IL-6 und IL-8 sowie die Expression von Adhäsionsmolekülen im Sinne einer entzündlichen Veränderung des Gewebes. Anhand von immunzytochemischen Untersuchungen von rupturierten Plaques konnte ein Zellinfiltrat wie bei einer Entzündungsreaktion nachgewiesen werden.

Seitdem die Schlüsselrolle des oxLDL in der Pathogenese der Arteriosklerose bekannt ist, untersuchten einige Studien die B-Zell-Immunreaktion auf oxLDL. Erhöhte Antikörpertiter gegen oxLDL wurden bei Menschen und im Tiermodell mit ausgedehnter Arteriosklerose gefunden [44-46]. Das Vorhandensein von T-Zellen in einer arteriosklerotischen Plaque und der Nachweis von einem Immunglobulin-Klassenwechsel natürlich vorkommenden anti-oxidierten LDL-Antikörpern deutet auf die Rolle der antigenspezifischen T-Zellen während der Arteriogenese hin [47,48]. Deshalb testete man oxidiertes LDL als Antigen für T-Zellen. T-Zellklone aus humanen arteriosklerotischen Läsionen ließen sich mit oxLDL aktivieren, nicht jedoch mit nativem LDL [49].

Adhäsionsmoleküle (Extravasation)

Die Aktivierung von Monozyten führt zu Heraufregulierung von Rezeptoren auf deren Oberfläche. Dazu gehören muzin-ähnliche Moleküle, welche Selektine bilden, Integrine, welche Adhäsionsmoleküle der Immunglobulin Superfamilie binden und Rezeptoren, welche chemotaktische Moleküle binden.

Zu den Integrinen gehören die CD 11b-Rezeptoren, welche wahrscheinlich für die Adhäsion verantwortlich sind und vor allem auf aktivierten Monozyten/Makrophagen erscheinen.

Inzwischen wurden zahlreiche Zelloberflächen-Glykoproteine an Leukozyten und Endothelzellen identifiziert. Diese Moleküle schließen eine Klasse von Adhäsionsfaktoren, die sogenannten Selektine (E-, L-, und P-Selektinen) ein, welche die Monozyten stimulieren und sich an das Endothel legen, um dort einen Leukozytenwall zu bilden. Sie wirken zusammen mit der Immunglobulinfamilie der Zelladhäsionsmoleküle, welche VCAM-1 (vascular cell adhesion molecule) und ICAM-1 angehören, und zum Anhaften und Ausbreitung der Monozyten führen.

Endothel-Monozyteninteraktion

Generell werden drei Schritte der Monozytenadhärenz an das Endothel unterschieden: Erstens die „rolling phase“ Phase, welche durch Selektine vermittelt wird und aus einer verlangsamten Bewegung der Leukozyten an der Oberfläche des Endothels besteht [50,51]. Die anschließende sichere Adhärenz erfolgt mittels Vermittlung der β_2 -Integrine wie z.B. ICAM-1. Diese Bindung erfordert die Aktivierung der Integrine durch Exposition der Neutrophilen gegenüber Aktivatormolekülen wie IL-8 oder PAF (platelet aggregating factor). Letztendlich erfolgt die Transmigration durch das Endothel, getriggert durch einen Gradienten chemotaktischer Faktoren. Ox LDL kann einer dieser chemotaktischen Faktoren sein. Die Adhärenz von Monozyten an das arterielle Endothelium in Arealen mit niedriger Scherkraft war eine der ersten Veränderungen, die nach Cholesterolfütterung von Versuchstieren nachzuweisen war [52].

Eine der spektakulärsten Effekte der Hypoxie auf Endothelzellen ist die Zunahme der Adhäsivität für Neutrophile. Mehrere Autoren berichten auch, dass die Hypoxie per se zu einer Zunahme der Expression von CD18/CD11b auf der Oberfläche mononukleärer Zellen führt und damit eine verstärkte Adhäsion an Endothelzellen verursacht.

Durch Interaktion der immunkompetenten Blutzellen mit dem lokal aktivierten Endothel wird der Austritt der Lymphozyten aus dem Blutgefäß an den Entzündungsort (Extravasation) geregelt. Ein Verlust anti-adhäsiver Eigenschaften des Gefäßendothels wird nach heutiger Auffassung als ein zentrales Ereignis in der Frühphase der Arteriosklerose angesehen. Dadurch bedingt kommt es zu einer verstärkten Interaktion zirkulierender Monozyten mit dem Endothel; ihre Adhäsion und Aktivierung führen schließlich zur Extravasation dieser Zellen. Diese gestörte Monozyten-Rekrutierung wird sowohl auf die verstärkte Freisetzung von Chemokinen wie MCP-1 aus dem Endothel als auch auf die verstärkte Expression Monozyten-spezifischer Adhäsionsmoleküle (ICAM-1, VCAM-1, Selektine) an der luminalen Endothelzelloberfläche zurückgeführt.

Monozyten / Makrophagen

Die mögliche Rolle zirkulierender Monozyten in der Pathologie der Arteriosklerose ist von grossem Interesse. Die ubiquitär vorkommenden Monozyten, Vorstufen der Gewebemakrophagen, sind an jeder Phase der Atherogenese beteiligt [26]. Die aus den Monozyten gebildeten Makrophagen sind Antigen-präsentierende Zellen, sezernieren Zytokine, Chemokine, Wachstum-regulierende Moleküle, Metallproteinasen, andere hydrolytische Enzyme und können phagozytieren. Allgemein wird davon ausgegangen, dass primär die Sekretion von Endothelzello-faktoren zur Monozytenaktivierung führt [53]. Die Akkumulation der Makrophagen ist ein deutliches Kennzeichen des Frühstadiums der Arteriosklerose beim Menschen [54]. Aus dem Blut stammende Monozyten differenzieren -gesteuert durch den Makrophagen-stimulierenden-Faktor (M-CSF)- zu Gewebemakrophagen. Die Rolle des M-CSF in der Entwicklung der Arteriosklerose wurde im Tierexperiment getestet, und zwar bei Tieren denen M-CSF fehlt. Trotz der fehlenden Makrophagenfunktion und cholesterinreicher Diät entwickelten diese Mäuse nur sehr kleine arteriosklerotische Läsionen.

Aktiviert Makrophagen exprimieren Klasse II-Histokompatibilitäts-Antigene -wie HLA-DR- mit der Aufgabe, Antigene den T-Lymphozyten zu präsentieren. Folglich erklärt dies die Anwesenheit der CD4- und CD8-Zellen in jedem Stadium der entstandenen Läsion, da es sich um eine zelluläre Reaktion des Immunsystems handelt. T-Zell-Aktivierung (durch Antigenbindung und Präsentation) führt zur Sekretion von Zytokinen (IFN- γ , TNF- α) die diese Entzündungsreaktion verstärken. Glatte Muskelzellen aus der Läsion besitzen auch Klasse-II-HLA-Moleküle an ihrer Oberfläche (vermutlich durch IFN- γ induziert), mit denen sie genauso den T-Zellen Antigene präsentieren können. Ein von Makrophagen produziertes Antigen könnte das oxidierte LDL sein. Der CD40-Ligand, ein weiteres immunregulatorisches Molekül, kann von Makrophagen, T-Zellen, Endothelzellen und glatten Muskelzellen aus der Läsion exprimiert werden. Gleichzeitig sind die Zellen auch Besitzer des CD40-Rezeptors. Beide, Ligand und Rezeptor, sind vermehrt in arteriosklerotischen Läsionen anzutreffen, was ein weiterer Beweis für immunologische Aktivität in solchen Bereichen ist.

T-Lymphozyten und Zytokine

T-Zellen spielen für die Immunregulation der Artherogenese eine entscheidende Rolle. Man findet sie in menschlichen arteriosklerotischen Läsionen sowie in Läsionen der ApoE-Mäuse [55]. In frühen arteriosklerotischen Läsionen dominieren CD8+ T-Zellen, wobei aktivierte CD4+ Gedächtniszellen vor allem in fortgeschrittenen Läsionen gefun-

den wurden [56]. Reife T-Lymphozyten lassen sich in 2 Phänotypen unterteilen: CD4+ T-Zellen erkennen Antigene, die auf MHC-Klasse-II präsentiert werden. Sie wurden früher als T-Helferzellen bezeichnet. Sie differenzieren sich zu TH1- oder TH2-Zellen und vermitteln so eine zellvermittelte (TH1) oder eine humorale (TH2) Immunreaktion. CD8+ T-Zellen (früher als Killerzellen bezeichnet) können nach erfolgter Aktivierung Zellen angreifen, welche das spezifische Antigen auf MHC-Klasse-I präsentieren. Sie sind Hauptquelle für die Zytokine.

Zytokine sind Glykoproteine von 8-80 kDa Größe, die eine regulierende Wirkung in der Kontrolle des Wachstums von Zellen haben. Als Botenstoffe sind sie insbesondere bei der Blutbildung und bei der Aktivierung und Steuerung des Abwehrsystems von Bedeutung. Sie werden entweder sezerniert oder an der Zelloberfläche exprimiert und binden an für sie spezifische Rezeptoren auf den Zielzellen. Die Zielzelle kann dabei entweder die sezernierende Zelle selbst (autokrine Wirkung der Zytokine) oder eine benachbarte oder sogar weit entfernte Zelle sein (parakrine bzw. endokrine Wirkung) [57]. Die Wirkung der Zytokine auf ihre Zielzelle ist in erster Linie von ihrer Umgebung bestimmt, in welcher sie wirken; so können verschiedenen Zytokine auf die selbe Zelle einen inhibitorischen, synergistischen oder additiven Effekt haben. Letztlich resultiert aus der Vielzahl von Informationen und Einflüssen eine sehr präzise Antwort des Organismus auf einen Reiz. In der Arteriosklerose spielen Zytokine eine wichtige Rolle bei der Regulation von postischämischen Entzündungen. Sowohl die Zellen der Gefäßwand, d.h. Endothelzellen und glatte Muskelzellen, als auch Leukozyten sind in der Lage, verschiedenen Mediatoren der Entzündungsantwort zu synthetisieren und damit die zelluläre Reaktion zu regulieren.

Das Korrelat einer erfolgten T-Zell-Aktivierung in vivo ist die Synthese von IL-2 und anderen Zytokinen. Dadurch wird die T-Zelle zur Proliferation und Differenzierung zu einer Effektorzelle angeregt. CD4+ Zellen werden nach ihrer charakteristischen Zytokinproduktion eingeteilt und erstmals 1986 anhand ihrer unterschiedlichen Zytokinsekretionsmuster im Mausmodell beschrieben [58]. Auf den Menschen übertragen wurde dieses Konzept bei bestimmten Krankheiten beschrieben, wie z.B. bei viralen Infektionen oder Infektionen mit Helminthen und Allergien [59].

Die beim Menschen identifizierten TH-1 Zellen produzieren u.a. IFN- γ , TNF- α,β , IL-2 und IL-6. Sie sind für die Immunantwort vom verspäteten Typ verantwortlich. TH-2 Zellen produzieren IL-4, IL-5, IL-13 und TGF- β . Sie sind an der Interaktion von T- und B-Zellen und der damit verbundenen Antikörperproduktion beteiligt [59-62]. Dabei vermag

insbesondere IL-10 TH-1 Zytokine zu supprimieren und damit die TH-1 Antwort zu drosseln [63].

Je nach Differenzierung der CD4+ Zelle in TH1 oder TH2 kann die Immunantwort in die eine oder die andere Richtung gelenkt werden [64]. Eine selektive Aktivierung inflammatorischer TH-1 Zellen führt so zu einer zellvermittelten Immunreaktion. Die Aktivierung von TH-2 Zellen zieht eine humorale Immunantwort nach sich.

B-Zellen

Die Aufgabe der B-Zellen in der Arteriosklerose unterscheidet sich von der Wirkweise der Makrophagen und T-Zellen. An zwei Tiermodellen gelang der Nachweis von B-Zellen in der intimalen Arteriosklerose sowie in der Adventitia [65]. In menschlichen intimalen Läsionen wurden dagegen noch keine B-Zellen gefunden. Trotzdem zeigen sich hohe Antikörpertiter arterioskleroseassoziiert Antigenen bei Menschen mit fortgeschrittenen arteriosklerotischen Läsionen. Vielleicht haben die B-Zellen eine „remote-control“-Funktion in der Entstehung der Arteriosklerose.

Zusammenfassend lässt sich somit die Arteriosklerose als chronisch inflammatorisch-fibroproliferative Erkrankung der Gefäßwand charakterisieren. Als Antwort auf unterschiedliche Ursachen einer Endothelschädigung adhären zirkulierende Monozyten und T-Lymphozyten an das Endothel und wandern in die Gefäßintima. Die Kolo-kalisation von CD4+ T-Zellen und Makrophagen in der Läsion, die zahlreiche Expression von HLA-Klasse-II-Molekülen und des ko-stimulatorischen Moleküls CD40 mit seinen Liganden weisen darauf hin, dass neben einer unspezifischen Inflammation auch eine spezifisch zellvermittelte Immunantwort einen Beitrag zur Atherogenese leistet. Neben dem lokal inflammatorischen Prozess in der Gefäßwand sind auch systemische Zeichen einer entzündlichen Reaktion mit der Entwicklung der Arteriosklerose verbunden. Hier stellt sich die Frage, woher die systemischen Zeichen der Inflammation kommen, denn bis heute ist weder der Beweis, dass die Leber, noch dass die Leukozyten an diesen systemischen Zeichen beteiligt sind, bewiesen.

1.3 Progression der Arteriosklerose bei Dialyse

Die chronische Niereninsuffizienz stellt heute nur noch in Ausnahmefällen eine Todesursache dar. Durch verschiedene Formen der Nierenersatztherapie lässt sich eine Lebensverlängerung für die Patienten erreichen, nicht jedoch eine altersentsprechend normale Lebenserwartung. Vielfältige Komplikationen der terminalen Niereninsuffizienz führen zu einer erheblichen Morbidität und Mortalität. Etwa die Hälfte der interkurrenten Komplikationen beruht auf Manifestation einer generalisierten und rasch verlaufenden Arteriosklerose [66].

Kardiovaskuläre Risikofaktoren, wie wir sie für die Allgemeinbevölkerung kennen, wirken sich natürlich auch beim Nierenkranken aus, reichen jedoch zur Erklärung dieser hohen Morbidität nicht aus [67]. In den letzten Jahren sind nun zunehmend die oben beschriebenen inflammatorischen Ereignisse in der Pathogenese der Arteriosklerose bei dialysepflichtigen Patienten entdeckt worden, die uns heute eine Neuinterpretation des kardiovaskulären Geschehens beim niereninsuffizienten Patienten erlauben [68].

Die Entstehung dieser chronischen systemischen Aktivierung proinflammatorischer Mediatoren beim Dialysepatienten ist bis heute nicht ausreichend gut verstanden worden. Wesentliche pathogenetische Faktoren sind die Retention immunologisch aktiver Proteine durch Verlust der physiologischen renal-tubulären Metabolisierung, die Aktivierung von Komplement und Monozyten an der Dialysemembran [69] sowie die Einschwemmung von Endotoxinen und Bakterienbestandteilen im Rahmen von regelmäßigen Gefäßpunktionen sowie über die Dialysemembran aus bakteriell kontaminiertem Dialysat [70].

Es stellt sich daher die Frage, inwieweit der wiederholte Kontakt von Blutkomponenten mit künstlichen bzw. synthetischen Polymeroberflächen über lange Behandlungsperioden im extrakorporalen Kreislauf und/oder andere technische Faktoren des Dialyseverfahrens zu einer chronischen Induktion von proinflammatorischen Signalen beitragen können oder möglicherweise sogar von kritischer Bedeutung dafür sind.

1.3.1 Aktivierungsmechanismen bei Kontakt von Blutkomponenten mit künstlichen Oberflächen bzw. Dialysemembranen

a) Komplementabhängige Induktion von Zytokinen

Beim Kontakt von Blut mit verschiedenen Dialysemembranen wird über einen molekularen Mechanismus die Komplementkaskade aktiviert.

Die Dialysemembranen aktivieren das Komplementsystem in unterschiedlichem Ausmaß in Abhängigkeit der Polymereigenschaften bzw. –zusammensetzung. Die Freisetzung verschiedener Mediatoren wie C3a, C5a bzw. C5b-9/TCC führt zur Stimulierung von Zellen und zur Freisetzung verschiedener Zytokine wie z.B. Interleukin 1 und TNF [71].

In Tab. 2 sind die wesentlichen Aktivitäten und Funktionen der Komplement-Komponenten C3 und C5 sowie der terminalen Kaskade (TCC) zusammengefasst.

Tab. 2: Wichtige biologische Funktionen und Reaktivitäten von Komplementaktivierungskomponenten.

| Komponente | | Funktion und Reaktivität |
|------------|-----|---|
| C3 | C3a | Freisetzung vasoaktiver Substanzen Kontraktion glatter Muskulatur Freisetzung von IL-10 |
| | C3b | Steigerung der Phagozytosegeschwindigkeit durch Opsonierung Steigerung der Sekretion von Lymphokinen |
| | C3d | B-Zellen Proliferation |
| C5 | C5a | Kontraktion glatter Muskulatur Freisetzung vasoaktiver Substanzen (z.B. Histamin) Aktivierung von Granulozyten Thrombozytenaggregation Stimulierung der Transkription von Zytokinen (IL-1, TNF) |
| | C5b | Opsonierung |
| TCC | | Lyse von Bakterien und Fremdzellen Lyse von Erythrozyten Aktivierung von Thrombozyten Aktivierung von nukleären Zellen Freisetzung von Zytokinen (IL-1, TNF) |

Das Ausmaß der Komplementaktivierung ist vom Dialysematerial abhängig. Nicht modifizierte Cellulosemembranen bewirken die stärkste Komplementaktivierung. Durch Modifikation von regenerierter Cellulose, z.B. durch Substitutionen von OH-Gruppen mit Diäthylaminoäthyl-Gruppen (Hemophan) kann die Komplementaktivierung entscheidend reduziert werden. Synthetische Membranmaterialien wie PMMA oder EVAL werden als mittlere Komplementaktivatoren eingestuft. Synthetische Membranen auf der Basis von Polyamid, Polyacrylnitril oder Polysulfon zeigen eine sehr geringe Aktivierung des Komplementsystems. Schindler et al. [72] konnten bei der Dialyse durch Vergleich von C5a-Werten in Plasma mit der Induktion der mRNA in Leukozyten für IL-1 nachweisen, dass Komplementprodukte die Zytokin-Transkription entsprechend der primär induzierten Komplementaktivierung an der Dialysemembran bewirken. Von Interesse ist in diesem Zusammenhang auch, dass das Komplementsystem von Dialysepatienten aufgrund der 10-fachen Erhöhung des Faktor D Plasmaspiegels besonders schnell und effektiv aktiviert werden kann. Faktor D ist die entscheidende Protease, die die Spaltung von C3 beschleunigt [73]. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass das Komplementsystem als Effektormechanismus des Immunsystems das von einer künstlichen Oberfläche ausgehende Aktivierungssignal für die Induktion der Zytokinsynthese vermittelt.

b) Aktivierung von mononukleären Zellen durch absorbierte Proteine

Die Wechselwirkung von peripheren Blutzellen mit Dialysemembranen bewirkt die Induktion verschiedener Aktivierungssignale in Monozyten und Lymphozyten: Anstieg des intrazellulären Kalziums, Anstieg des Umsatzes von Phospholipiden in der Zellmembran sowie die Freisetzung von Zytokinen wie IL-1 und TNF- α [74]. Jahn et al. [75] konnten zeigen, dass die Interaktion von Lymphozyten mit Membranen aus regenerierter Zellulose zur Stimulation der β 2-Mikroglobulin-Synthese auch unter komplementfreien Bedingungen führt. Die Aktivierung von Zellen an zellulosischen Membranen erfolgt über einen L-Fucose spezifischen Mechanismus. Nachfolgend haben dann Meißner et al. [76] zeigen können, dass dieser Aktivierungsmechanismus auf Grund von L-Fucose-Resten in regenerierter Cellulose induziert wird. In einer weiteren Arbeit [74] wurde dann der Vergleich von Membranen aus regenerierter Cellulose mit Membranen aus verschiedenen synthetischen Materialien wie Polyacrylnitril und Polycarbonat-Polyäther untersucht und hinsichtlich der Freisetzung von Zytokinen mit dem Ausmaß der Zelladhäsion korreliert. In Abhängigkeit der Oberflächenstruktur kann die Zytokinsynthese bei der Interaktion von peripheren mononukleären Zellen erfolgen.

Es wurde in dieser Arbeit die Freisetzung von IL-1 bei Kontakt von isolierten mononukleären Zellen mit regenerierter Zellulose und verschiedenen synthetischen Materialien verglichen. Auch hier ist die Freisetzung von Zytokinen an synthetischen (Polycarbonat-Polyäther) Membranen reduziert. Die Optimierung hydrophilen- hydrophoben Mikrodomänen in diesen synthetischen Dialysemembranen bewirkt eine Limitierung der Interaktion mit Plasmaproteinen und Zellen.

Dass neben einer unspezifischen Aktivierung auch eine Funktionsstörung im Sinne einer Suppression von peripheren Blutzellen im Kontakt mit Dialysemembranen auftreten kann, wurde von Kay et al. [77] gezeigt, die nach Inkubation von NK-Zellen mit regenerierter Zellulose eine Reduktion der NK-Zell-Aktivität nachweisen konnten. Dagegen konnte die NK-Zellaktivität im Kontakt mit synthetischen Oberflächen nahezu vollständig konserviert werden [78].

c) Aktivierung von mononukleären Zellen durch absorbierte Proteine

Während des Kontaktes von Blutkomponenten mit Oberflächen wird aus physikalisch-chemischen Gründen zunächst die unspezifische Absorption von Proteinen an der künstlichen Oberfläche beobachtet [79]. Üblicherweise handelt es sich dabei um ionische oder hydrophobe Wechselwirkungen. Die Absorption von Proteinen ist mit Denaturierung und somit mit einer strukturellen Veränderung des Proteinmoleküls verbunden. Proteine tragen häufig Peptidmotive, die durch spezifische Rezeptoren auf mononukleären Zellen erkannt werden können, z.B. existiert ein spezifischer Rezeptor für C3b, so dass neben einer Komplementaktivierung und Freisetzung von C3a, C5a oder TCC auch eine Ligand/Rezeptor-Interaktion mit mononukleären Zellen und Granulozyten an der Oberfläche erfolgen kann.

Kontakt mit Oberflächen stimuliert auch die Gerinnungskaskade und die Ablagerung von Fibrinogen, Fibrin und Thrombin an künstlichen Oberflächen. Diese Proteine enthalten spezifische Motive, die zur Adhäsion von Thrombozyten führen können. In nachfolgenden Schritten werden dann auch mononukleäre Zellen und Granulozyten an oberflächennahe Areale fixiert. Diese Interaktion von mononukleären Zellen mit oberflächengebundenen Liganden ist üblicherweise mit der Induktion von Aktivierungssignalen verbunden: Anstieg des intrazellulären Kalziums, Freisetzung von Elastase, Freisetzung von Zytokinen etc.

Der Zusammenhang zwischen Proteinabsorption, Zelladhäsion und Aktivierung wurde von Anderson et al. [80] für verschiedene polymere Oberflächen beschrieben.

In Abhängigkeit von vorangehender Proteinabsorption wird die Freisetzung von IL-1, IL-6 und TNF- α stimuliert.

In diesem Zusammenhang ist auch die Bildung von oxidierten bzw. denaturierten Proteinschichten auf Dialysemembranen infolge der Anwendungen von Wiederverwendungs-Verfahren (reuse) zu nennen, für die in vitro- vermutlich über einen Rezeptor-vermittelten Mechanismus- eine Freisetzung von Zytokinen nachgewiesen werden konnte [81,82].

d) Zytokin-Induktion durch Kontamination des Dialysewassers

Stoffwechselprodukte aus der Zellwand von Bakterien sind starke Aktivatoren von mononukleären Zellen. In der Zellkultur werden häufig Lipopolysaccharid-Präparationen verwendet, um die Zytokin-Induktion von Monozyten oder peripheren mononukleären Zellen zu stimulieren. In einem Versuch konnte gezeigt werden, dass die Menge von Endotoxinen in humanem Vollblut die Freisetzung von IL-1 beeinflusst. Je höher die Menge an Endotoxin, desto höher war der IL-1 Spiegel. Die Bedeutung von Endotoxinen aus Dialysewasser wurde erstmals von Henderson et al. [83] in der IL-1-Hypothese formuliert. Heute weiß man, dass ultrafiltrierte Dialysatlösungen eine Vielzahl von Dialysekomplikationen reduzieren bzw. verhindern können [84,85].

e) Synergistische Mechanismen zur Induktion von Zytokinen beim Kontakt mit künstlichen Oberflächen

In ihrer physiologischen und funktionellen Bedeutung sind Zytokine nicht als isolierte Wirksubstanzen zu verstehen. Durch Wirkung von ko-stimulatorischen Faktoren wird entweder die Freisetzung oder eine entsprechende Rezeptorexpression moduliert. Bei der Freisetzung von Zytokinen sind LPS bzw. Endotoxine aus dem Stoffwechsel von Bakterienzellwänden besonders aktiv. Arend et al. [86] konnten zeigen, dass nur in Gegenwart von Endotoxinen durch die Wirkung von C5a Interleukine freigesetzt werden können. Diesen Sachverhalt untersuchten Schindler et al. [72] weiterführend für die Situation der Dialyse. Dabei wurde gefunden, dass über das Komplementsystem zwar die Transkription von IL-1 und TNF- α induziert wird, dass jedoch die Synthese von Zytokinen durch LPS induziert werden muss. Dieser Sachverhalt hat besonders Bedeutung bei der Hämodialyse mit nicht-modifizierten zellulosischen Membranen, die einerseits permeabel für Endotoxine sind und andererseits in großem Ausmaß das Komplementsystem aktivieren [87].

Für die vollständige Ausprägung von entzündlichen Reaktionen z.B. im Gefäßsystem sind neben dieser proinflammatorischen Induktion von Zytokinen auch Gerinnungsvorgänge wie Fibrin-Netzbildung oder Thrombozytenaggregation und –adhäsion von Bedeutung, da an künstlichen Oberflächen grundsätzlich die Gerinnungskaskade aktiviert wird. Diese Vorgänge bieten die Möglichkeit der spezifischen Interaktion mit Thrombozyten, die nachfolgend Aggregate mit immunkompetenten Zellen bilden können. Daher muss auch die Gerinnungsaktivität als ko-stimulatorisches Ereignis bei der Zytokin-Induktion Berücksichtigung finden.

1.3.2 Das immunologische Paradoxon der Urämie

In der Bewertung der Funktionen des Immunsystems bei Urämie bzw. bei terminalem Nierenversagen unter extrakorporaler Therapie ist man mit der paradoxen Situation einer ausgeprägten Immunmodulation konfrontiert. Auf der einen Seite ist klar, daß die spezifische Immunantwort durch Monozytendefekt [88] und urämische Faktoren eingeschränkt ist. Durch die Anreicherung von inhibitorischen Proteinen oder Spaltprodukten (z. B. GIP I, GIP II, DIP, Komplementfaktor Ba, etc.) wird auf der einen Seite eine signifikante Suppression verschiedener wichtiger immunologischer Zellfunktionen wie Phagozytose, Degranulation oder Chemotaxis bzw. IgM-Synthese [89-91] beobachtet. Der Suppression von spezifischen Immunfunktionen steht jedoch bei terminalem Nierenversagen unter Dialyse eine Vielzahl von proinflammatorisch wirkenden urämischen Toxinen gegenüber. Dazu gehören z.B. die Wirkung erhöhter Faktor D Konzentrationen auf den Komplementumsatz und die Freisetzung von Zytokinen über verschiedene Aktivierungswege wie Komplement und Endotoxintransfer (s.o.). Ein pro- bzw. mikroinflammatorischer Zustand ist auch durch erhöhte Konzentrationen von Akut-Phase-Proteinen wie CRP, Fibrinogen und Serum Amyloid A deutlich nachweisbar [92].

Girndt et al. [93] haben das Sekretionsmuster von Zytokinen aus Monozyten urämischer und gesunder Patienten detailliert analysiert. Während die Messungen im Plasma keine relevanten Schlüsse zulassen, ist die Messung von verschiedenen Zytokinen im Zellkulturüberstand von unterschiedlich stimulierten peripheren mononukleären Zellen aus urämischem Blut aussagekräftiger. Durch Messung von IL-1, TNF- α , IL-6 und IL-10 im Überstand wurden deutliche Unterschiede zwischen gesunden Kontrollen und immunkompetenten Dialysepatienten sowie sogenannten Non-Respondern gefunden.

Es erscheint heute naheliegend - wenn auch bezüglich zugrundeliegender pathophysiologischer Mechanismen noch spekulativ - daß Eigenschaften von Dialysemembranen -insbesondere in der urämischen Situation- einen proatherogenen Effekt ausüben können. Es kann heute gezeigt werden, daß bei der Dialyse -in Abhängigkeit der Eigenschaften der eingesetzten Membran- biologisch relevante Mediatoren und inflammatorische Signalketten, die zu Gefäßläsionen und Sklerose führen können, offensichtlich ausreichend aktiviert sind.

1.4 Einführung in die Real Time PCR

Die Mitte der Achtziger Jahre entwickelte Polymerase Kettenreaktion (PCR) ist eine schnelle und sehr sensitive Methode in der DNA-Analytik [94]. Es handelt sich dabei um eine durch spezifische Primer-definierte enzymatische in vitro Replikation, bei der durch sich wiederholende Zyklen eine annähernd exponentielle Amplifikation der Zielsequenz erreicht wird. Die TaqMan PCR ermöglicht die Amplifikation und den Nachweis des PCR-Produktes simultan in einem Reaktionsgefäß.

Hierfür wird zusätzlich zu dem Primerpaar eine spezielle fluorogene Sonde eingesetzt, die aus einem Oligonukleotid besteht, dessen 5' –Ende mit einem fluoreszenten Reporter-Farbstoff (Fluoreszinderivat) markiert ist, während das 3' –Ende einen Quencher-Farbstoff (Rhodamin-Derivat) trägt und ausserdem mit einem Phosphatrest blockiert ist.

Wird die intakte Sonde bei einer speziellen Wellenlänge (488 nm) zur Fluoreszenz angeregt, so wird die Fluoreszenz des Reporter-Farbstoffes aufgrund der räumlichen Nähe zum Quencher durch einen Fluoreszenz-Energietransfer (FET) unterdrückt. Während der PCR hybridisiert die Sonde mit den Primern zunächst an den Matrizen-Strang. In der Extensiosphase trifft die Taq Polymerase nun auf diese Sonde und beginnt sie zu verdrängen. Es entsteht eine Y-förmige Sekundärstruktur, wodurch die 5'-3' –Exonuklease Aktivität der AmpliTaq DNA Polymerase aktiviert und die Sonde geschnitten wird. Eine freie nicht-hybridisierte Sonde wird hingegen nicht hydrolysiert. Kommt es jedoch zur Sondenhydrolyse, so wird die räumliche Nähe- und damit auch der FET- zwischen Reporter und Quencher unterbrochen. Entsprechend der Akkumulation von PCR-Produkten steigt die Fluoreszenz des Reporters also mit jedem PCR-Zyklus an. Das dabei gebildete Signal ist strikt sequenzspezifisch, da nicht 100%ig bindende Sondenmoleküle verdrängt werden noch bevor die Exonukleaseaktivität der Taq Polymerase aktiviert wird. Die Veränderung der Fluoreszenzen der verschiedenen Farbstoffe wird mit Hilfe des ABI PRISM 7700 Sequense Detectors im geschlossenen Reaktionsgefäß Zyklus für Zyklus erfasst.

Chemische Grundlagen von TaqMan PCR Sonden

Wie bereits oben beschrieben, besitzt eine TaqMan PCR Sonde die folgenden Charakteristika:

- 5' –Reporter-Farbstoff
- 3' –Quencher-Farbstoff
- 3' –OH-blockierendes Phosphat

Der fluoreszierende Reporterfarbstoff ist kovalent an das 5' –Ende der Sonde geknüpft. Standardmässig wird FAM als Reporter eingesetzt. Der Reporterfarbstoff wird jeweils durch den Quencher-Farbstoff TAMRA gequenched.

TAMRA wird über ein Linker-Arm-modifiziertes-Nukleotid (LAN) an das 3'-Ende der Sonde gebunden.

Schliesslich wird die Sonde noch chemisch phosphoryliert, um eine Extension des 3'-Endes während der PCR zu vermeiden.

| Farbstoff | chemische Bezeichnung | Typ | Anregung(nm) | Emission(nm) |
|-----------|-----------------------------|-----|--------------|--------------|
| FAM | 6-Carboxy-Fluorescein | R | 518 | 488 |
| TAMRA | 6-C.-tetramethyl-rhodamin Q | | 582 | 488 |
| ROX | 6-Carboxy-X-rhodamin | P | 602 | 488 |

(R= Reporter, Q= Quencher, P= passiver Referenzfarbstoff)

1.5 Ziele der Forschungsarbeit

In der klinischen Routine basieren Diagnostik und Risikovorhersage bezüglich Inflammation und kardiovaskulärem Risiko allein auf der Analyse von Serum- und Plasmaproteinen wie z.B. dem CRP oder der Leukozytenzahl. Immunologische Parameter wie Zytokinbestimmung auf m-RNA Ebene von peripheren Leukozyten oder Serumebene sind dagegen noch nicht als Routineuntersuchung etabliert. Zytokine können in den unterschiedlichsten Geweben vorkommen. Sowohl Endothelzellen als auch Fettzellen sind in der Lage, Zytokine zu sezernieren. Die Rolle der Leukozyten als Zytokinsezernierende Zellen ist dagegen weiter Grundlage der Forschung. Nun wurde vor einiger Zeit eine neue Technik beschrieben, die die Gentranskription von Zytokinen durch quantitative Real-time RT-PCR Technik zeigt. Dies erlaubt eine sensitive und äußerst zuverlässige Quantifikation von basaler mRNA-Expression in peripheren Leukozyten [95] und stellt so eine Möglichkeit der Untersuchung der systemischen Zeichen einer Inflammation dar.

Bis vor kurzem bestand die Schwierigkeit in der Stabilisierung, Isolierung und Aufbewahrung der m-RNA. Aus diesem Grunde benutzten wir ein neues Blutabnahmeröhrchen, mit dessen Substanz eine unmittelbare Stabilisierung der m-RNA nach Blutabnahme möglich war [96]. Mit dieser neuen Methode analysierten wir bei Patienten unter Hämodialyse die Zytokinexpression auf m-RNA Ebene im Vergleich zur Proteinkonzentration im Serum. Da die Erhöhung von Zytokinexpression mit der Art der Dialysemembran in Beziehung steht, haben wir uns für eine unsubstituierte Cellulose-Membran entschieden, die im Gegensatz zu syntetischen Membranen mit einer erniedrigten Zytokinausschüttung assoziiert ist.

Diese Patienten haben wie o.b. aufgrund von Inflammation und beschleunigter Progression der Arteriosklerose ein stark erhöhtes Risiko bezüglich kardiovaskulärer Mortalität.

Ziel unserer Forschungsarbeit war die Beschreibung der RNA-Zytokinmuster von Patienten vor und während der Dialyse. Desweiteren untersuchten wir, ob die Immunmediatoren auf m-RNA- und Protein-Ebene bei den Patienten ebenfalls vor und während der Dialyse zu vergleichen sind. Abschließend prüften wir die Hypothese, ob der Aktivitätszustand von peripheren Leukozyten die erhöhte Mortalität dieser Patienten reflektiert und vorhersagt.

2 Material und Methode

2.1 Patientenkollektiv

2.1.1 Dialysepatienten

Wir sammelten von allen Patienten (n=69) eines ambulanten Dialysezentrums periphere Blutproben. Wir nahmen jeweils vor und 2 Stunden nach Start der Dialyse das Blut ab. Bei all diesen dialysepflichtigen Patienten mit terminaler Niereninsuffizienz wurden unsubstituierte Dialysemembranen (Renak Ra 15- Cuprophan, Renak Ra 12 U-Cuprophan, Fresenius- Kawasumi; Tokyo, Japan) und standardisierte Dialyseflüssigkeiten (Bicarbonat HD, HDF, Fresenius, Bad Homburg, Germany) benutzt.

Anschließend wurde das Dialysezentrum nach 3 Jahren wieder aufgesucht und anhand der Patientenakten das Auftreten von vaskulären Ereignissen und eventueller Mortalität untersucht. Die initialen immunologischen Befunde wurden dann in Abhängigkeit der Ereignisse stratifiziert und ausgewertet.

Diese Studie wurde nach den Regeln der Erklärung von Helsinki durchgeführt und von der Ethikkommission der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf genehmigt. Von allen Patienten, die an der Studie teilgenommen haben, liegt eine Einverständniserklärung vor.

2.1.2 gesundes Kontroll-Kollektiv

(ausgewählter Bevölkerungsquerschnitt gesunder Pat.)

Aus einem zufällig ausgewählten Bevölkerungsquerschnitt gesunder Probanden wurden altersgematchte Stichproben ausgewählt und als „gesundes Kontrollkollektiv“ den anderen Kollektiven gegenübergestellt.

Dieses angesprochene Kollektiv wurde aus einer epidemiologischen Untersuchung des Deutschen Diabetes Zentrum unter der Leitung von Prof. Dr. S. Martin gewonnen, die im Rahmen einer Bevölkerungs-Querschnittsanalyse zufällige Bevölkerungsstichproben (Anschreiben an zufällig ausgewählte Personen aus einem Melderegister) hinsichtlich des Vorliegens eines Diabetes mellitus oder einer gestörten Glukosetoleranz untersuchte. Dabei wurden durch Fragebogen und Blutentnahmen verschiedene Personengruppen identifiziert.

Aus den vorliegenden Proben der Bevölkerungsgruppe ohne Vorliegen eines Diabetes mellitus oder einer gestörten Glukosetoleranz, die keine anamnestischen Hinweise auf das Vorliegen einer kardiovaskulären Erkrankung hatten, konnten wir zum Vergleich mit den zur Untersuchung stehenden Kollektiven eine Stichprobe von 40 altersgemachten Proben zur mRNA- und Serum-Zytokinbestimmung verwenden.

2.2 Real Time PCR zur Zytokinbestimmung

Nachfolgend wird die generelle Arbeitsanleitung für eine Real Time PCR vorgestellt, deren allgemeiner Ablauf bereits in Kap. 1.4 besprochen wurde. Für die Real Time PCR wurde der ABI Prism 7700 der Firma Perkin Elmer benutzt.

Kits und Reagenzien

Alle Chemikalien und Verbrauchsmaterialien für die TaqMan PCR sind bei APPLIED BIOSYSTEMS bestellt worden.

Firma: APPLIED BIOSYSTEMS
PE Deutschland GmbH
Brunnenweg 13
64331 Weiterstadt

1) Nukleotide:

GeneAmp dNTPs mit dUTP, dATP, dCTP, dGTP
Bestellnummer: N808 0095

2) Platte und Verschlüsse:

MicroAmp Optical 96-well Reaction Plate
Bestellnummer: N801 0560
MicroAmp Optical Caps
Bestellnummer: N801 0935

3) Enzyme:

TaqMan 1000 Reactions Gold with Buffer A
Bestellnummer: 430 4441

Primer und Sonden

Die Primer und die gelabelten Sonden für die TaqMan PCR sind ebenfalls alle bei APPLIED BIOSYSTEMS bestellt worden.

- 1) Primer: ABI PRISM PRIMER (Standard Oligo)
„Ready to use“, PCR/SEQ-Grade, incl. ScRP-Reinigung, gelöst in sterilem Minimalpuffer und quantifiziert in pmol/µl
Liefermenge: 20-40 nmol

- 2) Sonden: TAMRA / FAM, TET, VIC, SDS-Probes (TaqMan):
HPLC gereinigtes Produkt, Ready to use, gefriergetrocknet und quantifiziert in nmol
Medium Scale, MSc
Liefermenge: 15-25 nmol

β-Actin TaqMan PCR

Primersequenzen (nach Acession number X00351)

Forward Primer: 5' ATT GCC GAC AGG ATG CAG AA 3'

Reverse Primer: 5' GCCGAT CCA CAC GGA GTA CT 3'

TaqMan Sonde: 5' - FAM-CAA GAT CAT TGC TCC TCC TGA GCG CA- TAMRA3'

Größe des Amplikon: 102 bp

TNF-α TaqMan PCR

Primersequenzen (nach Acession number X01394; Locus HSTNFR1)

Forward Primer: 5' AGG CGG TGC TTGTTC CTC A 3'

Reverse Primer: 5' GTT CGA GAA GAT GAT CTG ACT GCC 3'

TaqMan Sonde: 5' - FAM-CCA GAG GGA AGA GTT CCC CAG GGA C- TAMRA3'

Größe des Amplikon: 167 bp

TGF- β 1 TaqMan PCR

Primersequenzen (nach Accession number X02812, Locus HSTGFB1)

Forward Primer: 5' GTG ACC TGG CCA CCA TTC AT 3'

Reverse Primer: 5' GTC AAT GTA CAG CTG CCG CA 3'

TaqMan Sonde: 5' FAM-CAC CAA CTA TTG CTT CAG CTC CAC GG -TAMRA 3'

Größe des Amplikon: 170 bp

IL-6 TaqMan PCR

Primersequenzen (nach Accession number M29150)

Forward Primer: 5' CTG ACC CAA CCA CAA ATG CC 3'

Reverse Primer: 5' CAT GTC CTG CAG CCA CTG G 3'

TaqMan Sonde: 5' - FAM - CTG TGC CTG CAG CTT CGT CAG CA - TAMRA - 3'

Größe des Amplikon: 69 bp

Probenverarbeitung:

Verschicken der PAXgene Blood RNA Tubes

Nach der Blutabnahme werden die PAXgene Blood RNA Tubes für 2h bei Raumtemperatur gelagert und anschließend in die Klinik gefahren. Bei Transportzeiten die länger als 2h. dauern, werden die Proben unter Verwendung von Kühllakkus transportiert, welche zuvor bei -20°C vorgekühlt wurden. Anschließend werden die Proben bei -20°C eingefroren und direkt vor der RNA-Isolierung bei Raumtemperatur aufgetaut.

RNA Isolierung aus PAXgene Blood RNA Tubes

Firma: PreAnalytix, Hilden/Rhld., Germany

Produkt: PAXgene Blood RNA Kit (Cat. No. 762134)

Die RNA Isolierung erfolgt nach dem Handbuch des Kits:

1. nach Blutabnahme oder nach dem Auftauen der Proben werden die PaxGene-Röhrchen noch ca. 1 Std. bei Raumtemperatur stehen gelassen.
2. Zentrifugieren der PaxGene- Röhrchen: 5000 xg/ 10 min. bei Raumtemperatur.
3. Überstand abgiessen und mit 5 ml. DEPC-Wasser versetzen.
4. Vortexen, dann wiederum Zentrifugation der Röhrchen: 5000 xg/ 10 min. bei Raumtemperatur.
5. Überstand wiederum abgiessen und mit 360 µl Resuspensionspuffer versetzen. Sofort wieder vortexen.
6. Überführung der gevortexten Flüssigkeit in ein Eppendorfgefäß.
7. Zusätzlich in das Eppendorfgefäß wird noch 300 µl RLT- Puffer und 40 µl. Proteinase K gegeben. Dies wird wiederum gevortext und dann 10 min. bei 55°C inkubiert.
8. Nach Inkubation 3 min. bei 14000 g zentrifugieren.
9. Den Überstand in ein neues Eppendorfgefäß geben und 350 µl Ethanol dazugeben. Vortexen.
10. Die ersten 700 µl in ein QIAamp Zentrifugationssäule überführen und 1 min. bei 10000 g zentrifugieren.
11. Die QIAamp Zentrifugationssäule auf ein neues Zentrifugationsröhrchen setzen und den Rest der Probe überführen und erneut 1 min. bei 10000 g zentrifugieren.

12. Die QIAamp Zentrifugationssäule auf ein neues Zentrifugationsröhrchen setzen.
13. Dazu werden 350 µl RW1 gegeben und 1min. bei 10000 g zentrifugiert.
14. Nun kommen noch 80 µl Dnase-Mix dazu und dies wird 15 min. bei Raumtemperatur stehengelassen.
15. Wiederum zusetzen von 350 µl RW1 und 1 min. bei 10000 g zentrifugieren.
16. Die QIAamp Zentrifugationssäule auf ein neues Zentrifugationsröhrchen setzen, 500 µl RPE dazugeben und 1 min. bei 10000 g zentrifugieren.
17. Erneute Zugabe von 500 µl RPE mit nachfolgender 3 min. Zentrifugation bei 14000 g.
18. QIAamp Zentrifugationssäule in ein sauberes 1,5 ml. Eppendorfgefäß geben.
19. Erste Eluierung mit 40 µl Elution Buffer und 1 min. Zentrifugation bei 10000 g.
20. Zweite Eluierung mit 40 µl Elution Buffer und 1 min. Zentrifugation bei 10000 g.
21. Inkubation bei 65°C über 5 min.

Die Elution der RNA erfolgt wie oben beschrieben in 2 x 40 µl. Dies wird, falls es nicht sofort weiterverarbeitet wird, bei -20°C eingefroren.

Reverse Transkription

Die Reverse Transkription erfolgt mit der Omniscript Reversen Transcriptase von Qia-gen und wird nach dem zugehörigen Handbuch durchgeführt. Pro Ansatz werden 10 µl der RNA Eluate als Template eingesetzt.

| Komponente | Volumen / Reaktion | Endkonzentrationen |
|--|-------------------------------|---------------------------|
| 10x Buffer RT | 2 µl | 1 x |
| dNTP Mix (5 mM each dNTP) | 2 µl | 0.5 mM each dNTP |
| Oligo-dT Primer (10 µM) | 2 µl | 1 µM |
| RNAse Inhibitor RNasin (Promega) (10 U/µl) | 1 µl | 10 U |
| Omniscript Reverse Transcriptase | 1 µl | 4 U |
| RNAse-free water | 2 µl | |
| Template RNA | 10 µl | variabel |
| Gesamtvolumen | 20 µl | |

Nach der RT erfolgt eine Hitze-Inaktivierung des Enzyms für 5 min bei 93C.

Nach der Reversen Transkription werden die Proben aliquotiert a 6,4 µl. Jedes Aliquot ist ausreichend für eine Triplikat-Bestimmung in einer nachfolgenden TaqMan PCR. (6,4µl Probe + 24,6 ml DEPC-Wasser. Also haben wir 31 µl für das Triplett (3 x 10 µl pro Monoplett).

TaqMan Analysen

Die TaqMan PCR Analyse wird für alle Proben in Triplikaten durchgeführt. Alle TaqMan Reaktionen werden in einem Volumen von 50 µl durchgeführt.

Pro Ansatz werden 2 µl der cDNAs eingesetzt.

β-Actin TaqMan PCR**1. β-Actin TaqMan Reaktionsansatz:**

| Komponente | Volumen / Reaktion | Endkonzentrationen |
|-------------------------------|--------------------|--------------------|
| β-Actin forward Primer (2 μM) | 5 μl | 200 nM |
| β-Actin reverse Primer (1 μM) | 5 μl | 100 nM |
| 10 x Puffer A | 5 μl | 1 x |
| β-Actin TaqMan Sonde (2 μM) | 5 μl | 200 nM |
| MgCl ₂ (25 mM) | 7 μl | 3,5 mM |
| dNTPs: | | |
| dATP (10mM) | 1 μl | 0,2 mM |
| dCTP (10mM) | 1 μl | 0,2 mM |
| dGTP (10mM) | 1 μl | 0,2 mM |
| dUTP (20 mM) | 1 μl | 0,4 mM |
| AmpliTaq Gold (5 U/μl) | 0,25 μl | 12,5 U/Ansatz |
| Template cDNA / Plasmid | 2 μl / 10 μl | |
| H ₂ O | ad 50 μl | |
| Gesamtvolumen | 50 μl | |

2. β-Actin TaqMan Reaktionsbedingungen:

- 95°C 10 min
- 40 Zyklen: 95°C 15 s
- 60°C 1 min
- 25°C 2 min

Data Collection nur während stage 3 (60°C).

TNF- α TaqMan PCR**1. TNF- α TaqMan Reaktionsansatz:**

| Komponente | Volumen / Reaktion | Endkonzentrationen |
|--|------------------------|--------------------|
| TNF- α forward Primer (1 μ M) | 5 μ l | 100 nM |
| TNF- α reverse Primer (1 μ M) | 5 μ l | 100 nM |
| 10 x Puffer A | 5 μ l | 1 x |
| TNF- α TaqMan Sonde (1 μ M) | 5 μ l | 100 nM |
| MgCl ₂ (25 mM) | 10 μ l | 5 mM |
| dNTPs: | | |
| dATP (10mM) | 1 μ l | 0,2 mM |
| dCTP (10mM) | 1 μ l | 0,2 mM |
| dGTP (10mM) | 1 μ l | 0,2 mM |
| dUTP (20 mM) | 1 μ l | 0,4 mM |
| AmpliTaQ Gold (5 U/ μ l) | 0,25 μ l | 12,5 U/Ansatz |
| Template cDNA / Plasmid | 2 μ l / 10 μ l | |
| H ₂ O | ad 50 μ l | |
| Gesamtvolumen | 50 μ l | |

2. TNF- α TaqMan Reaktionsbedingungen:

- 95°C 10 min
- 40 Zyklen: 95°C 15 s
- 60°C 1 min
- 25°C 2 min

Data Collection nur während stage 3 (60°C).

TGF-β1 TaqMan PCR**1. TGF-β1 TaqMan Reaktionsansatz:**

| Komponente | Volumen / Reaktion | Endkonzentrationen |
|------------------------------|---------------------------|---------------------------|
| TFG-β1 forward Primer (1 μM) | 5 μl | 100 nM |
| TFG-β1 reverse Primer (1 μM) | 5 μl | 100 nM |
| 10 x Puffer A | 5 μl | 1 x |
| TFG-β1 TaqMan Sonde (1 μM) | 5 μl | 100 nM |
| MgCl ₂ (25 mM) | 14 μl | 7 mM |
| dNTPs: | | |
| dATP (10mM) | 1 μl | 0,2 mM |
| dCTP (10mM) | 1 μl | 0,2 mM |
| dGTP (10mM) | 1 μl | 0,2 mM |
| dUTP (20 mM) | 1 μl | 0,4 mM |
| AmpliTaq Gold (5 U/μl) | 0,25 μl | 12,5 U/Ansatz |
| Template cDNA / Plasmid | 2 μl / 10 μl | |
| H ₂ O | ad 50 μl | |
| Gesamtvolumen | 50 μl | |

2. TFG-β1 TaqMan Reaktionsbedingungen:

- 95°C 10 min
- 40 Zyklen: 95°C 15 s
- 60°C 1 min
- 25°C 2 min

Data Collection nur während stage 3 (60°C).

IL-6 TaqMan PCR

1. IL-6 TaqMan Reaktionsansatz:

| Komponente | Volumen / Reaktion | Endkonzentrationen |
|----------------------------|--------------------|--------------------|
| IL-6 forward Primer (2 µM) | 5 µl | 200 nM |
| IL-6 reverse Primer (2 µM) | 5 µl | 200 nM |
| 10 x Puffer A | 5 µl | 1 x |
| IL-6 TaqMan Sonde (1 µM) | 5 µl | 100 nM |
| MgCl ₂ (25 mM) | 14 µl | 7 mM |
| dNTPs: | | |
| dATP (10mM) | 1 µl | 0,2 mM |
| dCTP (10mM) | 1 µl | 0,2 mM |
| dGTP (10mM) | 1 µl | 0,2 mM |
| dUTP (20 mM) | 1 µl | 0,4 mM |
| AmpliTaq Gold (5 U/µl) | 0,25 µl | 12,5 U/Ansatz |
| Template cDNA / Plasmid | 2 µl / 10 µl | |
| H ₂ O | ad 50 µl | |
| Gesamtvolumen | 50 µl | |

2. IL-6 TaqMan Reaktionsbedingungen:

- 95°C 10 min
- 40 Zyklen: 95°C 15 s
- 60°C 1 min
- 25°C 2 min

Data Collection nur während stage 3 (60°C).

Interne Kontrolle der TaqMan PCR Analysen

Parallel zu den zu analysierenden Proben wird eine Standardreihe amplifiziert, in der eine entsprechende c-DNA in definierte Kopienzahlen eingesetzt wird. Die Kopienzahlen der jeweiligen Transkripte in den zu untersuchenden Proben wird durch Abgleich der Ct-Werte der Standardreihen mit den Proben ermittelt. Für jede Kopienzahl wird eine Dreifachbestimmung im TaqMan Ansatz durchgeführt.

Für jede Standardreihe werden von 10 bis 10^7 Kopien der Plasmide eingesetzt (Verdünnung in 10er Schritten). Die Plasmide werden in linearisierter Form in die PCR eingesetzt.

Herstellung der Plasmide für den TaqMan-Standard

Das Gen des interessierenden Proteins wird mittels zweier Primer, die den ORF einrahmen, per PCR amplifiziert. Pre- bzw. Pro-Sequenzen können (in den meisten Fällen) außer acht gelassen werden, da bei der anschließenden Suche nach den geeignetsten Primer/TaqMan-Sonde-Kombinationen bevorzugt im 3'-Bereich des Gens gesucht wird.

Bei der Amplifikation des ORF wird als Template cDNA von Zellkulturen oder Geweben benutzt, bei denen man nachgewiesen hat, daß das interessierende Protein exprimiert wird (z.B. per ELISA). Nach der PCR (Standardprotokoll und Standardansatz s.u.) wird ein Aliquot von ca. $10 \mu\text{l}$ auf ein 1,5 %-iges Agarosegel aufgetragen, bei 100 V aufgetrennt und per UV betrachtet. Im Vergleich zum mitaufgetragenen 100 bp -Standard kann das amplifizierte Gen anhand seiner Größe identifiziert werden.

Der Rest des PCR-Ansatzes wird auf ein Gel aufgetragen, aufgetrennt und aus dem Gel extrahiert (mit QIAquick Gel Extraction nach Protokoll des Herstellers).

$2 \mu\text{l}$ des Eluates werden in den pCR-TOPO-Vektor subkloniert (TOPO TA Cloning Kit, Invitrogen; nach Angaben des Herstellers).

Von den auf den LB-Amp-Platten entstehenden Kolonien werden 10 Bakterienklone in 5 ml LB-Medium (supplementiert mit Ampicillin) überimpft, ü.N. bei $37 \text{ }^\circ\text{C}$ im Schüttler inkubiert und eine Plasmid-Mini-Prep (QIAprep Spin Miniprep Kit, nach Angaben des Herstellers) durchgeführt. Zur Ligationskontrolle werden $5 \mu\text{l}$ des Säuleneluates anschließend in $50 \mu\text{l}$ Gesamtvolumen mit einer Restriktionsendonuklease so restringiert, daß entweder der rekombinante Vektor linearisiert wird oder das Insert aus dem Vektor herausgeschnitten wird. Hier wiederum erfolgt eine Auftrennung auf einem Agarosegel und Vergleich des Restriktionsmusters.

Nachdem der ORF des interessierenden Gens in einen Vektor subkloniert worden ist, muß dieser sequenziert werden, um etwaige Punktmutationen, welche durch die Taq-Polymerase möglicherweise während der PCR-Amplifikation eingeführt worden sind, zu identifizieren. Diese Mutationen sind vor allem dann nachteilig, wenn sie in den Bereichen auftreten, in denen die Primer und die TaqMan-Sonde lokalisiert sind. Dies könnte zu geringerer Hybridisierungseffizienz während des TaqMan-Laufes führen und somit das Ergebnis der Messung negativ beeinflussen.

Nach der Sequenzierung sollte (zumindest) ein Klon identifiziert worden sein, dessen Sequenz mit der publizierten Sequenz übereinstimmt. Anschließend kann mit der Software „PrimerExpress 1.5“ ein geeignetes Primer-Paar und die dazu korrespondierende TaqMan-Sonde herausgesucht werden.

| PCR Standardprotokoll | |
|-----------------------|--------|
| 95 °C | 2 min |
| 95 °C | 30 sec |
| 35 Zyklen 50 °C | 30 sec |
| 72 °C | 45 sec |
| 72 °C | 10 min |
| 4 °C | inf. |

| PCR Standardansatz | | |
|-----------------------------|----------|-------------|
| 10x PCR-Puffer | 5 µl | 1 x |
| 10 mM dNTP-Mix | 1 µl | (je 0.2 mM) |
| 50 mM MgCl ₂ | 2 µl | (2 mM) |
| Primer Mix (je 10 µM) | 2.5 µl | 0.5 µM |
| Template | 5 µl | |
| Taq DNA Polymerase (5 U/µl) | 0.4 µl | 2 U |
| A. dest | ad 50 µl | |

Die Plasmide werden zunächst linearisiert, die Konzentration per OD₂₆₀ bestimmt und daraus die Kopienzahl / µl ermittelt.

Kopienzahlen der versch. Plasmide bei definierten Konzentrationen:

| Plasmid | Insert | Länge (gesamt) | Kopien pro ng Plasmid | pg Plasmid / 10 ⁷ Kopien |
|-----------------------------------|----------------------|-------------------|--------------------------|--|
| pCR 2.1-TOPO (3908 bp) | IL-6 (549 bp) | 4457 bp | 2,0475 x 10 ⁸ | 48,84 pg |
| pCR-Script Amp SK(+) (2961 bp) | β-Actin (1117 bp) | 4078 bp | 2,2378 x 10 ⁸ | 44,69 pg |
| pCR-Script Amp SK(+) (2961 bp) | TGF β1 (453 bp) | 3414 bp | 2,6760 x 10 ⁸ | 37,37 pg |
| pCR-Script Amp SK(+) (2961 bp) | TNF α (743 bp) | 3704 bp | 2,4638 x 10 ⁸ | 40,59 pg |

| Plasmid / Insert | Linearisiert mit Enzym | Fragmentlänge |
|--------------------------------|------------------------|---------------|
| pCR 2.1 TOPO - IL-6 | Bam H I | 4457 bp |
| pCR-Script Amp SK(+) – β-Actin | Eco R I | 4078 bp |
| pCR-Script Amp SK(+) – TGF-β1 | Eco R I | 3414 bp |
| pCR-Script Amp SK(+) – TNF α | Eco R I | 3704 bp |

Auswertung (Relative Quantifizierung) der TaqMan PCR Analysen

Für jede zu untersuchende Probe wird eine β-Actin TaqMan PCR durchgeführt. Die Kopienzahlen an β-Actin für die zu untersuchenden Proben werden wie oben beschrieben ermittelt (siehe Punkt 1.2.5). Zur relativen Quantifizierung werden die Kopienzahlen der untersuchten Transkripte auf die Anzahl der β-Actin Transkripte innerhalb derselben Probe bezogen.

2.3 ELISA-Zytokine der Zytokinbestimmung

Nachfolgend wird die generelle Arbeitsanleitung für einen ELISA vorgestellt. Die Antikörperkonzentration, die Standardreihe sowie Zytokinspezifische Änderungen werden in den speziellen Kapiteln beschrieben.

Durchführung und Messung der ELISA-Systeme

Prinzip der Methode

Alle genutzten ELISA-Systeme wurden als indirekte *Sandwich*-ELISAs aufgebaut [97]. Bei den hier verwendeten ELISAs wird am festphasenadsorbierten Beschichtungsantikörper gebundenes Zytokin durch einen korrespondierenden biotinylierten Antikörper nachgewiesen, der wiederum die Bindung eines Strept-Avidin-Enzymkonjugates ermöglicht. Somit kann die Anwesenheit des biotinylierten Antikörpers und damit die des Zytokins oder Immunglobulins durch die Bindung des Enzymkonjugates sichtbar gemacht werden, indem dessen enzymatische Aktivität zum Umsatz eines geeigneten chromogenen Substrates (TMB in Substratpuffer) genutzt wird. Die bis zu einem Endpunkt innerhalb des linearen Bereichs des Substratumsatzes resultierende Zunahme der optischen Dichte ist proportional der Menge des gebundenen Enzymkonjugates und damit der Konzentration des Zytokins oder Immunglobulins. Entsprechend einer interpolierten Eichkurve für die optische Dichte können so die in den Proben enthaltenen Konzentrationen bestimmt werden.

Vorbereitung der ELISA-Platten: Beschichtung

Die ELISA-Systeme wurden in Nunc MaxiSorp[®]-Immunoplaten durchgeführt. Die Beschichtung erfolgte in der Form, dass geeignete Mengen von Beschichtungsantikörpern in verschiedenen Puffern gelöst, und jeweils 100µl dieser Beschichtungslösung unter Verwendung eines Multichannel in die Kavitäten der Immunoplaten eingebracht wurden. Die beschichteten Platten wurden mit Abdeckfolien (Labsystem) abgedeckt und über Nacht bei 4 °C im Schüttler inkubiert, so dass die Beschichtungsantikörper an die Immunoplaten adsorbierten.

Nicht gebundene Antikörper wurden durch nachfolgende Waschschriffe und anschließendes Ausschlagen entfernt. Die Platten wurden für jeden ELISA frisch beschichtet.

Einsatz der biotinylierten Detektionsantikörper

Allgemein wurden die aliquotierten biotinylierten Detektionsantikörper nach dem Auftauen verdünnt. In jede Kavität der mit Ak beschichteten Immunoplaten wurden 100µl dieser verdünnten biotinylierten Antikörperlösung mittels Mehrkanalpipette vorgelegt.

Serumverdünnungen im ELISA

Aus diesen Platten wurden (nach gründlichem Durchmischen) 50µl der Proben mit der SLG-12-Kanalpipette entnommen und in die Kavitäten der beschichteten MaxiSorp[®]-Immunoplaten zu den biotinylierten Detektionsantikörpern pipettiert.

Erstellung der Standard-Verdünnungsreihen und Einsatz im ELISA

Die aliquotierten rekombinanten humanen Zytokine und humanen Immunglobuline wurden aufgetaut und mittels einer Assay-Verdünnung bearbeitet. Durch serielle Verdünnung (Faktor 2-3) wurde eine sechsstufige geometrische Verdünnungsreihe erstellt, deren Konzentration an entsprechendem Zytokin den zu erwartenden Bereich der korrespondierenden Konzentrationen in den Proben einschloss. Das dabei eingesetzte Standard-Volumen war grundsätzlich identisch dem applizierten Probenvolumen (50µl). Nach dem beendigten Auftragen aller Proben wurden die ELISA-Platten 30s intensiv geschüttelt und für die weiteren Inkubationen (auf dem Schüttler) vorbereitet. Am Ende der Inkubationszeit wurden die Immunoplaten ausgeschlagen und mit Zellstoff die Restflüssigkeit abgesaugt. Durch nachfolgende Waschschriffe (3x Waschen mit PBS/T / Kavität) wurden ungebundene biotinylierte Antikörper entfernt.

Herstellung der Konjugatverdünnung und Einsatz im ELISA

Das Enzymkonjugat wurde entsprechend der Vorversuche verdünnt. Von diesem verdünnten Enzymkonjugat wurden pro Kavität 100µl unter Verwendung der Mehrkanalpipette einpipettiert. Die Platten wurden dann für 1h bei Raumtemperatur auf einem Schüttler inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde ungebundenes Enzymkonjugat durch nachfolgende Waschschriffe (3x Waschen mit PBS/T / Kavität) und Ausschlagen der Immunoplaten entfernt.

Herstellung der Substratlösung und Einsatz im ELISA: Substratreaktion

Das Substrat wurde unmittelbar vor der Applikation aus dem Kühlschrank genommen und auf Eis gestellt. Das korrespondierende Substrat zum verwendeten Enzymkonjugat wurde dann unter Verwendung der Mehrkanalpipette in die Kavitäten der gewaschenen und ausgeschlagenen Immunoplaten pipettiert (100µl/Kavität). Danach wurden die ELISA-Platten 30s intensiv geschüttelt. Die durch Peroxidase katalysierte Umsetzung von *TMB* erfordert vor der Messung ein Abstoppen der enzymatischen Reaktion mit H_2SO_4 . Die Messung der Optischen Dichte (OD) der entsprechenden Immunoplaten wird ca. 10 min. nach dem Abstoppen gemessen.

Messung und Auswertung der ELISA-Systeme

Die ELISA-Systeme wurden entsprechend den Messungen der OD am ELISA-Reader ausgewertet. Die Messungen erfolgten bei einer Wellenlänge von 450nm für *TMB*. Anhand der aus den mitgeführten Standardwerten interpolierten Eichkurve erfolgte eine Kalkulation der in den Proben enthaltenen Konzentrationen des entsprechenden Zytokins. Für die jeweilige Erstellung der Eichkurve und die darauf basierende Kalkulation der Konzentration wurde die Log-Log-Interpolationsart der EasyFit-Software genutzt. Entsprechend der Testprotokolle wurde unmittelbar die Verdünnung der Proben berechnet, und aus den so erhaltenen Konzentrationen der Mittelwert der Replikate und die Standardabweichung ermittelt und ausgegeben.

ELISA-Konditionen für humane Serum-Assays

ELISA für TNF- α

Beschichtungspuffer: Carbonat-Puffer pH 9,6

- Der erste Antikörper wurde 1:1000 verdünnt in den Coating-Puffer aufgenommen. Die Inkubationszeit des ersten Antikörper fand über Nacht bei 4°C auf dem Schüttler statt.
- Die Blockierung mit 10% FCS/PBS findet 1 Stunde bei Raumtemperatur statt.
- Die Standardreihe reichte von 100 pg/ml bis 0.4 pg/ml mit einer Verdünnung von 1/3.
- Die 1/2 verdünnten Serumproben wurden ebenfalls über Nacht bei 4°C auf dem Schüttler inkubiert.
- Der zweite Antikörper wurde 1:2000 verdünnt. Die Inkubationszeit des zweiten Antikörpers betrug 1 Stunde bei Raumtemperatur.

- Die Avidinperoxidase wurde in einer Verdünnung von 1:4000 eingesetzt und hatte eine Inkubationszeit von 30 Minuten bei Raumtemperatur.

FIRMA: BD Pharmingen (AK-Paar)

1. mAK (mouse IgG1) Bestellnummer: 18631D
2. mAK (mouse IgG1) Bestellnummer: 18642D

ELISA für sTNF- α -R (60kD)

Beschichtungspuffer: PBS pH 7,4

- Der erste Antikörper wurde 1:33,3 verdünnt in den Coating-Puffer aufgenommen. Die Inkubationszeit des ersten Antikörper findet über Nacht bei 4°C auf dem Schüttler statt.
- Die Blockierung mit 0,5 BSA/PBS findet 2 Stunden bei Raumtemperatur statt.
- Die Standardreihe reichte von 5000 pg/ml bis 78.1 pg/ml mit einer Verdünnung von 1/2.
- Die 1/10 verdünnten Serumproben werden 2 Stunden bei Raumtemperatur + HRP auf dem Schüttler inkubiert.
- Die Avidinperoxidase wurde in einer Verdünnung von 1:15000 HRP eingesetzt und hatte eine Inkubationszeit von 2 Stunden bei Raumtemperatur (+ Probe).

FIRMA: Bender Med Systems (Module Set)

1. mAK (mouse IgG2a) Bestellnummer: BMS203MST
2. mAK (mouse IgG2a)

ELISA für sTNF- α -R (80kD)

Beschichtungspuffer: PBS pH 7,4

- Der erste Antikörper wurde 1:14,3 verdünnt in den Coating-Puffer aufgenommen. Die Inkubationszeit des ersten Antikörper findet über Nacht bei 4°C auf dem Schüttler statt.
- Die Blockierung mit 0,5 BSA/PBS findet 2 Stunden bei Raumtemperatur statt.
- Die Standardreihe reichte von 10000 pg/ml bis 150 pg/ml mit einer Verdünnung von 1/2.

- Die 1/10 verdünnten Serumproben werden 2 Stunden bei Raumtemperatur + HRP auf dem Schüttler inkubiert.
- Die Avidinperoxidase wurde in einer Verdünnung von 1:3000 HRP eingesetzt und hatte eine Inkubationszeit von 2 Stunden bei Raumtemperatur (+ Probe).

FIRMA: Bender Med Systems (Module Set)

1. mAK (mouse IgG) Bestellnummer: BMS211MST
2. mAK (mouse IgG)

ELISA für IL-6

Beschichtungspuffer: Carbonat-Puffer pH 9,6

- Der erste Antikörper wurde 1:100 verdünnt in den Coating-Puffer aufgenommen. Die Inkubationszeit des ersten Antikörper findet über Nacht bei 4°C auf dem Schüttler statt.
- Die Blockierung mit BI.-Agent Kit findet 1 Stunde bei Raumtemperatur statt.
- Die Standardreihe reichte von 150 pg/ml bis 0.6 pg/ml mit einer Verdünnung von 1/3.
- Die 1/2 verdünnten Serumproben werden ebenfalls über Nacht bei 4°C auf dem Schüttler inkubiert.
- Der zweite Antikörper wurde 1:200 verdünnt. Die Inkubationszeit des zweiten Antikörpers beträgt 1 Stunde bei Raumtemperatur.
- Die Avidinperoxidase wurde in einer Verdünnung von 1:10000 HRP eingesetzt und hatte eine Inkubationszeit von 30 Minuten bei Raumtemperatur.

FIRMA: Fa. HISS/ CLB (ELISA-Kit)

1. mAK Bestellnummer: M1916
2. mAK (sheep)

ELISA für sIL-6-R

Beschichtungspuffer: PBS pH 7,4

- Der erste Antikörper wurde 1:10 verdünnt in den Coating-Puffer aufgenommen. Die Inkubationszeit des ersten Antikörper findet über Nacht bei 4°C auf dem Schüttler statt.

- Die Blockierung mit 0,5 BSA/PBS findet während einer Dauer von 2 Stunden bei Raumtemperatur statt. Die Standardreihe reichte von 5000 pg/ml bis 78,1 pg/ml mit einer Verdünnung von 1/2. Die 1/250 verdünnten Serumproben werden 2 Stunden bei Raumtemperatur + HRP auf dem Schüttler inkubiert.
- Die Avidinperoxidase wurde in einer Verdünnung von 1:5000 HRP eingesetzt und hatte eine Inkubationszeit von 2 Stunden bei Raumtemperatur (+ Probe).

FIRMA: Bender Med Systems (Module Set)

1. mAK (mouse IgG1) Bestellnummer: BMS214MST
2. mAK (mouse IgG1)

ELISA für TGF- β

Beschichtungspuffer: PBS pH 7,4

- Der erste Antikörper wurde 1:180 verdünnt in den Coating-Puffer aufgenommen. Die Inkubationszeit des ersten Antikörper findet über Nacht bei 4°C auf dem Schüttler statt.
- Die Blockierung mit Sucrose/PBS/Tween findet 1 Stunde bei Raumtemperatur statt.
- Die Standardreihe reichte von 1000 pg/ml bis 31.25 pg/ml mit einer Verdünnung von 1/2.
- Die 1/2 verdünnten Serumproben werden 2 Stunden bei Raumtemperatur auf dem Schüttler inkubiert.
- Der zweite Antikörper wurde 1:180 verdünnt. Die Inkubationszeit des zweiten Antikörpers beträgt 2 Stunden bei Raumtemperatur.
- Die Avidinperoxidase wurde in einer Verdünnung von 1:5000 eingesetzt und hatte eine Inkubationszeit von 30 Minuten bei Raumtemperatur.

FIRMA: Fa. R&D (Duo Set)

1. mAK (mouse IgG1) Bestellnummer: DY240
2. mAK (chicken)

2.4 Statistische Analysen

Für die Datenanalyse benutzten wir das Statistikprogramm GraphPadPrism (GraphPadPrism version 3.0, San Diego, CA, USA). Die Verteilung der Transkriptions- und Proteinmenge wurde mit dem Kolmogorov-Smirnov Test analysiert. Für den Fall, dass sich bezüglich der Werte keine Gaussche Normalverteilung einstellte, benutzten wir für die unabhängigen Werte den Mann-Whitney Test, und für die abhängigen Werte den Wilcoxon matched pairs Test. Für die Vergleiche von Überlebenskurven benutzten wir den log-rank Test, nicht-parametrische Werte wurden durch den Fisher's exact Test analysiert.

3 Ergebnisse

3.1 Klinische Charakterisierung des Patientenkollektivs

Klinische Charakterisierung:

Alle 69 Patienten eines ambulanten Dialysezentrums und 40 altersgematchte gesunde Kontrollen wurden in diese Studie aufgenommen. Die klinischen Basisparameter der Dialysepatienten und der Kontrollen wurden erfasst und miteinander verglichen.

Wie in der Tabelle 3 ersichtlich gab es hinsichtlich des Alters und des Body-mass-Index (BMI) keine signifikanten Unterschiede im Vergleich der Hämodialysegruppe zu den Kontrollen. Ein signifikanter Unterschied ergab sich lediglich bei dem Vergleich der Geschlechterverhältnisse untereinander.

Bezüglich der kardiovaskulären Risikofaktoren zeigten sich ebenfalls bis auf den Diabetes mellitus Typ 2 keinerlei signifikante Unterschiede zwischen den beiden Gruppen. Weder der arterielle Hypertonus, noch die Hypercholesterinämie oder das Rauchen waren bei den Hämodialysepatienten signifikant häufiger vorhanden. Anders beim Diabetes, hier zeigte sich, dass 43 % der Hämodialysepatienten eine Diabeteserkrankung aufwiesen, wohingegen dies nur bei 8 % der Kontrollpersonen ($p < 0,0001$) der Fall war.

Der Grund für die terminale Niereninsuffizienz und somit die Indikation für die Hämodialyse bestätigte bei diesen Patienten die allgemein gültigen Daten. Von den 69 Patienten haben die Mehrzahl mit 38 % ($n = 26$) die terminale Niereninsuffizienz auf dem Boden eines Diabetes mellitus. Bei weiteren 25 % ($n = 17$) der Fälle lag eine Glomerulonephritis vor. Beim Rest ($n = 26$) dieses Patientenkollektivs waren andere Gründe (Nierenzell-Ca, Schrumpfnieren, Trauma) für die Dialysepflichtigkeit verantwortlich.

3 Ergebnisse

3.1 klinische Charakterisierung des Patientenkollektivs

Tab. 3:

Klinische Charakterisierung der Studienpatienten

| | Hämodialyse- patienten (n=69) | Kontrollen (n=40) | p- Werte |
|---|--|------------------------------|----------------------|
| Geschlecht | | | |
| • Männer | 32 (46%) | 27 (68%) | <0.03 [†] |
| • Frauen | 37 (54%) | 13 (32%) | <0.03 [†] |
| Alter (Jahre, mean ± [SD]) | 58 (20) | 59 (12) | 0.8 [*] |
| Body-mass index (kg/m ² , mean [SD]) | 26.4 (1.1) | 26.2 (0.6) | 0.6 [†] |
| • Männer | 27.3 (1.2) | 26.8 (0.7) | 0.4 [†] |
| • Frauen | 25.5 (0.9) | 25.6 (0.4) | 0.9 [†] |
| Kardiovaskuläres Risiko | | | |
| • Hypertonus ^a | 34 (49%) | 13 (33%) | 0.08 [†] |
| • Diabetes mellitus ^b | 30 (43%) | 3 (8%) | <0.0001 [†] |
| • Hypercholesterinämie ^b | 34 (49%) | 16 (40%) | 0.3 [†] |
| • Raucher | 25 (36%) | 19 (48%) | 0.2 [†] |
| Grund der terminalen Niereninsuffizienz | | | |
| • Diabetes | 26 (38%) | | |
| • Glomerulonephritis | 17 (25%) | | |
| • andere | 26 (37%) | | |

p-Werte zwischen Hämodialysepatienten und Kontrollen wurden mittels Fisher's exact test (†) oder the Mann-Whitney test (*) analysiert.

3.2 Immunmediatoren im Verlauf der Dialyse

3.2.1 Verhalten der proinflammatorischen (TH-1) Zytokine im Verlauf der Dialyse

Die Verteilungen der Immunmediatoren während der Dialyse wurden zum Vergleich graphisch dargestellt und die Mediane mit Hilfe des nicht-parametrischen Mann-Whitney-U-Tests verglichen. Als statistisch signifikant gilt dabei ein Wert von $p < 0.05$. Die Verteilungen wurden mit logarithmischer Skalierung aufgetragen, um der nicht-normalen Verteilung der Zytokine Rechnung zu tragen.

Die Analyse erfolgte getrennt nach pro- und antiinflammatorischen Immunmediatoren, und zwar sowohl auf Protein- als auch auf mRNA-Ebene. Zunächst wurde auf die Analyse von proinflammatorischen Immunmediatoren fokussiert. Von ihnen ist bekannt, dass sie ein immunregulatorisches Netzwerk bei Entzündungsvorgängen darstellen.

Proinflammatorische Immunmediatoren auf Protein-Ebene

(TNF- α , sTNF- α R80 sTNF- α R60 und IL-6, SIL-6-R)

Die auf Protein-Ebene geprüften proinflammatorischen Immunmediatoren umfassten Zytokine der akuten Phase (IL-6) mit dessen löslichem IL-6-Rezeptor (lösliche Form von IL-6). Dieser Rezeptor potenziert die IL-6 Bioaktivität, indem er die Bindung zu Zellen vermittelt, die die signaltransduzierende b-Kette gp 130 exprimieren.

Ebenfalls wurde der andere Bestandteil des proinflammatorischen Zytokin-Netzwerkes – das TNF- α – gemessen. Dessen Aktivität wird im Gegensatz zu IL-6 durch die löslichen TNF- α -Rezeptoren reguliert, indem sie die Bioaktivität von TNF- α antagonisieren.

In Bezug auf die Serumkonzentrationen von TNF- α konnte weder ein signifikanter Unterschied zwischen Kontrollpersonen und Patienten (2.7 ± 1.0 vs. 6.8 ± 4.3 ; $p=0.4$), noch ein Unterschied bei den dialysepflichtigen Patienten im Laufe der Dialyse (6.3 ± 4.4 vs. 6.8 ± 4.3 ; $p=0.7$) entdeckt werden.

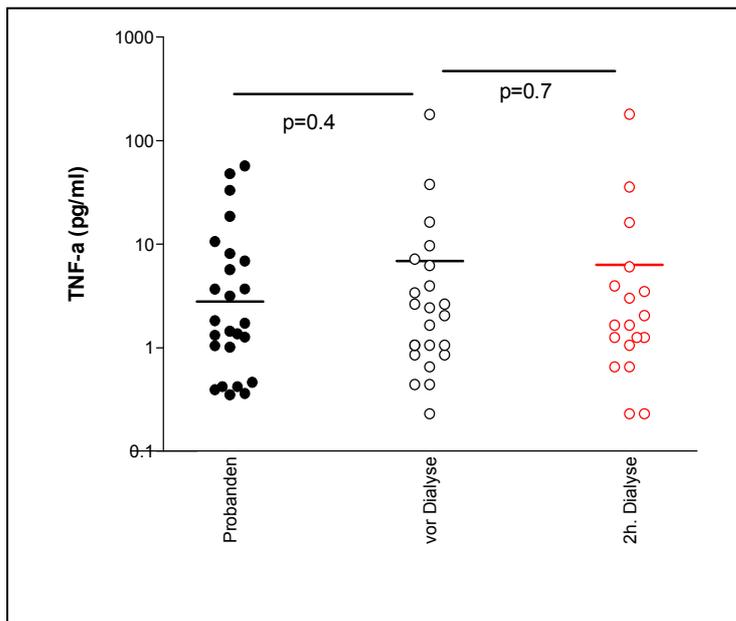
Wie in Abb. 4 und 5 zu erkennen, kam es bei beiden Rezeptoren zu einem signifikanten Anstieg im Vergleich von Kontrollpersonen zu Dialysepatienten (1.6 ± 0.5 vs. 37.2 ± 25 ; $p < 0.0001$) und (1.6 ± 0.5 vs. 37.5 ± 27 ; $p < 0.0001$).

3 Ergebnisse

3.2 Immunmediatoren im Verlauf der Dialyse

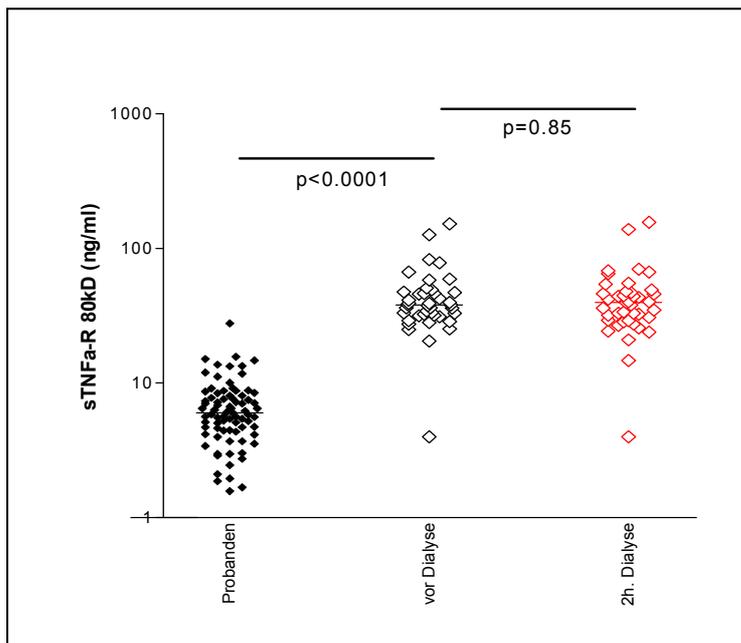
Jedoch ließ sich bei keinem der beiden Rezeptoren eine signifikante Erhöhung der Werte während der Dialyse erkennen (37.2 ± 25 vs. 37.5 ± 27 ; $p=0.85$) und (44.6 ± 26 vs. 44.0 ± 27 ; $p=0.7$).

Abb. 3



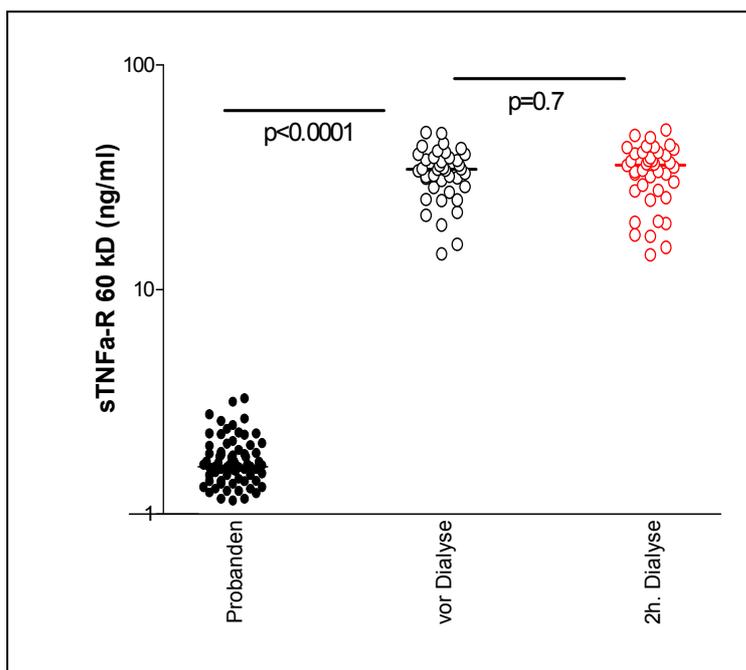
Vergleich der Serumkonzentration von TNF- α bei 41 Patienten vor Dialyse, während der Dialyse (2 Std. nach Beginn) und bei altersgematchten Probanden. Das Detektionslimit für TNF- α liegt bei 0.4 pg/ml, alle Werte, die unterhalb dieses Ranges lagen, wurden in die Berechnung der Statistik nicht mit einbezogen.

Abb. 4



Vergleich der Serumkonzentration des löslichen Rezeptors sTNF- α R 80 bei 41 Patienten vor Dialyse, während der Dialyse (2 Std. nach Beginn) und bei altersgematchten Probanden.

Abb. 5

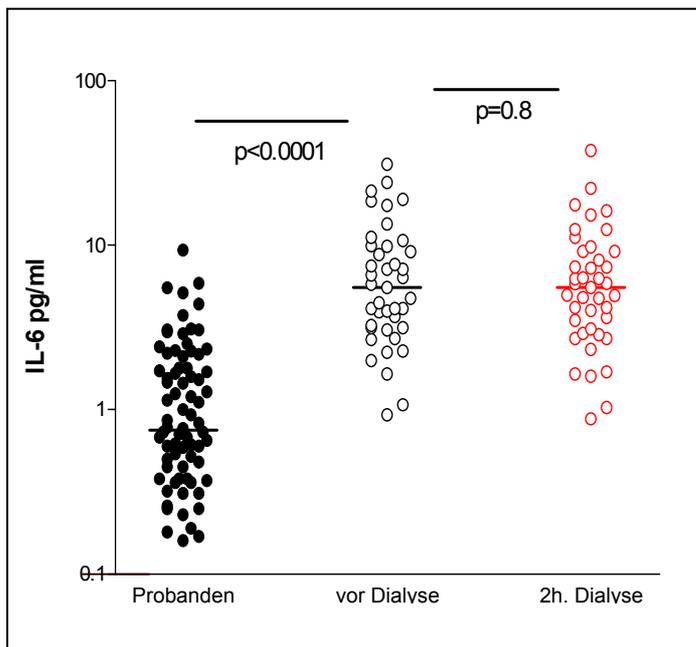


Vergleich der Serumkonzentration des löslichen Rezeptors sTNF- α -R60 bei 41 Patienten vor Dialyse, während der Dialyse (2 Std. nach Beginn) und bei altersgematchten Probanden.

Beim zweiten auf Proteinebene gemessenen proinflammatorischen Zytokin -dem IL-6- kam es (wie Abb. 6 zeigt) zu einem signifikanten Anstieg dieses Zytokins im Vergleich dialysepflichtiger Patienten zu Kontrollpersonen (0.75 ± 1.6 vs. 7.7 ± 6.8 ; $p < 0.0001$). Der Vergleich der dialysepflichtigen Patienten untereinander zeigte dagegen während der Dialyse keinerlei Signifikanz (7.7 ± 6.8 vs. 7.3 ± 6.8 ; $p = 0.8$).

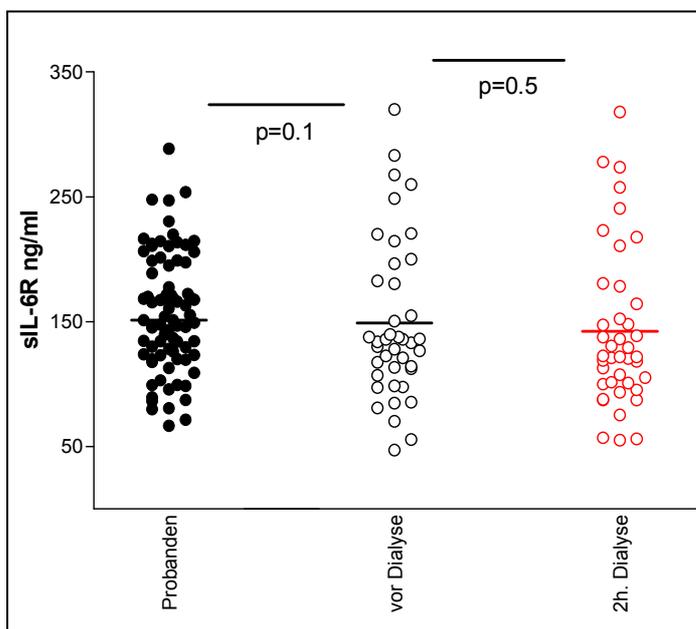
Seit bekannt ist, dass die Funktion von IL-6 im Serum von löslichen IL-6 Rezeptoren im Serum unterstützt wird, analysierten wir zusätzlich, ob niedrige sIL-6-R Spiegel möglicherweise der Erhöhung von IL-6 entgegenwirken. Wie Abb. 7 aber zeigt, waren weder zwischen den Patienten zu Kontrollen (151 ± 47 vs. 133 ± 63 ; $p = 0.1$), noch bei den Patienten untereinander im Verlauf signifikante Unterschiede zu erkennen (133 ± 63 vs. 121 ± 63 ; $p = 0.5$).

Abb. 6



Vergleich der Serumkonzentration von IL-6 bei 69 Patienten vor Dialyse, während der Dialyse (2 Std. nach Beginn) und bei altersgematchten Probanden.

Abb. 7



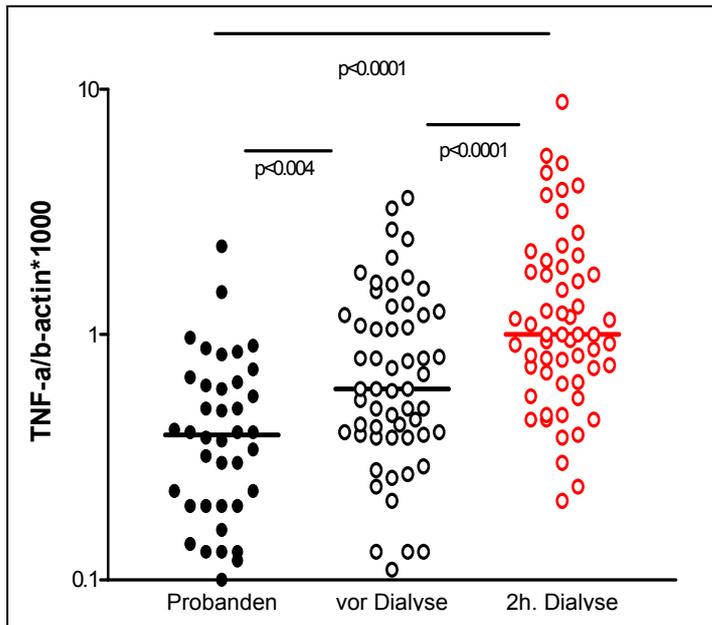
Vergleich der Serumkonzentration des löslichen Rezeptors sIL-6-R bei 69 Patienten vor Dialyse, während der Dialyse (2 Std. nach Beginn) und bei altersgematchten Probanden.

Proinflammatorische Immunmediatoren auf mRNA Ebene (TNF- α und IL-6)

Die geprüften proinflammatorischen Immunmediatoren auf mRNA-Ebene umfassten die beiden Zytokine der akuten Phase (IL-6) und (TNF- α).

Es zeigte sich, dass die mittlere basale mRNA Genexpression von TNF- α in peripheren Leukozyten bei 69 dialysepflichtigen Patienten im Vergleich zu Kontrollen (0.9 ± 0.1 vs. 0.5 ± 0.1 Moleküle von TNF- α pro 1000 Moleküle b-actin; $p < 0.004$) signifikant höher war.

Abb. 8

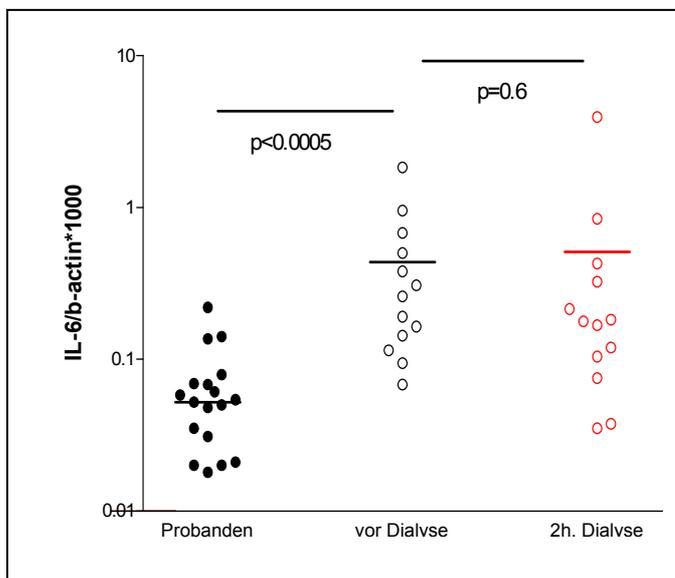


Vergleich der basalen mRNA-Expression von TNF- α von 69 Patienten vor Dialyse, während der Dialyse (2 Std. nach Beginn) und bei altersgematchten Probanden. Die Anzahl der TNF- α Moleküle bezieht sich jeweils auf 1000 Moleküle des house-keeping-genes b-actin.

Desweiteren kam es im Verlauf der Dialyse zu einem signifikanten Anstieg der mittleren TNF- α Genexpression (1.5 ± 0.2 vs. 0.9 ± 0.1 Moleküle TNF- α pro 1000 Moleküle b-actin; $p < 0.0001$).

Ähnliche Ergebnisse wurden auch für IL-6, dem weiteren proinflammatorischen Zytokin, erkannt. Auch hier waren, wie Abb. 9 zeigt, eine signifikant erhöhte basale mRNA Genexpression bei dialysepflichtigen Patienten im Vergleich zu den Kontrollen zu ermitteln (0.5 ± 0.5 vs. 0.05 ± 1.3 Moleküle von IL-6 pro 1000 Moleküle b-actin; $p < 0.0005$). Anders als bei TNF-a konnte bei IL-6 kein signifikanter Anstieg während der Dialyse analysiert werden (0.5 ± 0.5 vs. 0.5 ± 1.0 Moleküle von IL-6 pro 1000 Moleküle b-actin; $p = 0.6$).

Abb. 9



Vergleich der basalen m-RNA-Expression von IL-6 bei 13 Patienten vor Dialyse, während der Dialyse (2 Std. nach Beginn) und bei altersgematchten Probanden. Die Anzahl der TNF- α Moleküle bezieht sich jeweils auf 1000 Moleküle des house-keeping-genes b-actin.

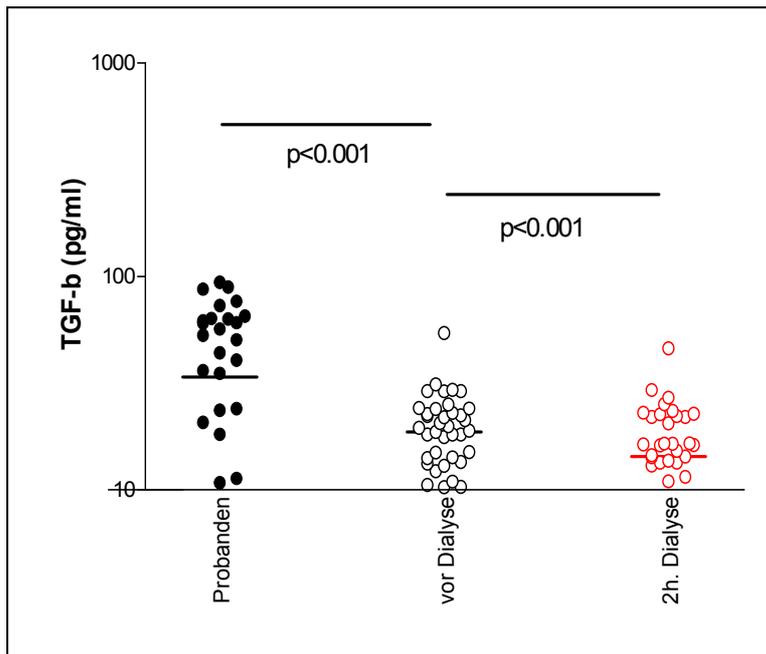
3.2.2 Verhalten der antiinflammatorischen (TH-2) Zytokine im Verlauf der Dialyse

Als antiinflammatorisches Zytokin wurde den transformierenden Wachstumsfaktor (TGF- β) ausgewählt, der ursprünglich in der Klassifikation nach Mosman zur Gruppe der Th-3 Zytokine zu zählen ist. Da aber aus der Literatur bekannt ist, dass TGF- β inhibitorisch auf das Wachstum von Th-1 Zellen wirkt, wird es nach neuesten Einteilungen den antiinflammatorischen Zytokinen (Th-2) zugerechnet. Wir konnten sowohl auf m-RNA Ebene, wie auch auf Proteinebene TGF- β bestimmen. In der Literatur ist seit längerem bekannt, dass dialysepflichtige Patienten im Vergleich zu Kontrollpersonen signifikant erniedrigte Spiegel antiinflammatorischer Zytokine auf Proteinebene aufweisen.

Antiinflammatorische Immunmediatoren auf Protein-Ebene

Wie in Abb. 10 erkennbar, waren die TGF- β Spiegel im Serum von dialysepflichtigen Patienten im Vergleich zu Kontrollen signifikant erniedrigt (19.1 ± 8.9 vs. 32.6 ± 6.8 ; $p < 0.001$). Ebenso kam es während der Dialyse zu einer signifikanten Abnahme der TGF- β Transkript-Spiegel (19.1 ± 8.9 vs. 14.2 ± 9.7 ; $p < 0.001$).

Abb. 10



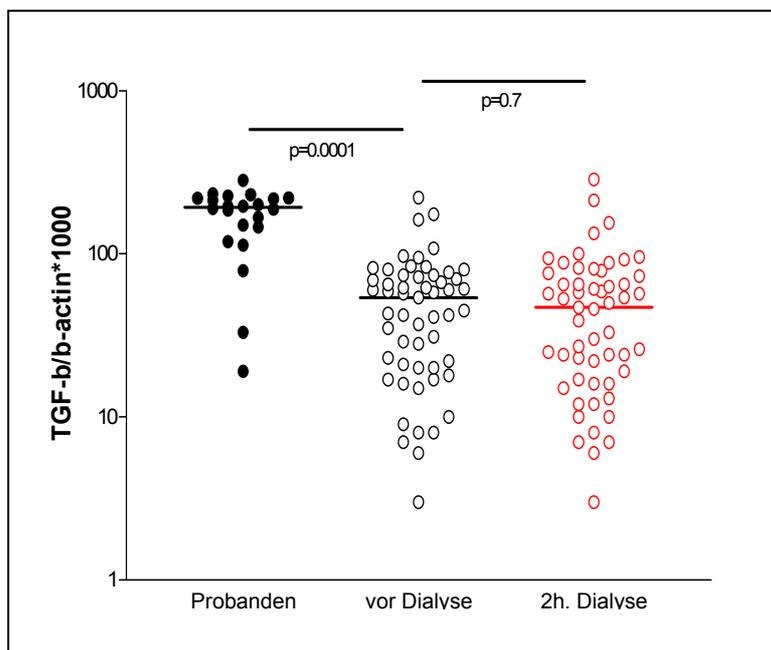
Vergleich der Serumkonzentration von TGF- β bei 69 Patienten vor Dialyse, während der Dialyse (2 Std. nach Beginn) und bei altersgematchten Probanden.

Antiinflammatorische Immunmediatoren auf mRNA-Ebene

Ebenfalls konnten signifikant erniedrigte Genexpressionsspiegel von TGF- β bei den dialysepflichtigen Patienten im Vergleich zu Kontrollpersonen analysiert werden (173 ± 14 vs. 54 ± 5 ; $p < 0.0001$).

Interessanterweise hatte aber die Dialyse selbst keinen Effekt auf die Genexpressionsspiegel von TGF- β in peripheren Leukozyten, denn es kam -wie Abb. 11 zeigt- zu keiner signifikanten Veränderung während der Dialyse (54 ± 5 vs. 54 ± 7 ; $p=0.8$).

Abb. 11



Vergleich der basalen m-RNA-Expression von TGF- β von 69 Patienten vor Dialyse, während der Dialyse (2 Std. nach Beginn) und bei altersgematchten Probanden. Die Anzahl der TGF- β Moleküle bezieht sich jeweils auf 1000 Moleküle des house-keeping-genes b-actin.

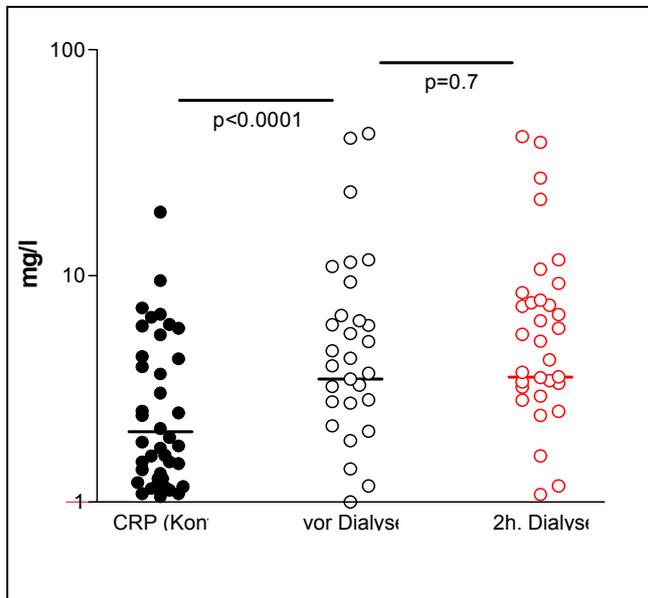
3.2.3 Veränderungen von akut Phase Protein Spiegeln (CRP und SAA) im Verlauf der Dialyse

In der klinischen Routine sind Diagnostik und Risikovorhersage bezüglich Inflammation und kardiovaskulärem Risiko allein basierend auf der Analyse von Serum-und Plasmaproteinen wie z.B. dem CRP oder der Leukozytenzahl. Um einen Vergleich dieser gängigen Parameter zu den Messungen der Zytokine zu bekommen, konnten wir sowohl das akute Phase Protein CRP als auch SAA bei allen dialysepflichtigen Patienten und den Kontrollpersonen analysieren.

Wie Abb. 12 zeigt, sind die Serumspiegel von CRP signifikant erhöht bei dialysepflichtigen Patienten im Vergleich mit Kontrollpersonen (6.6 ± 9.8 vs. 2.0 ± 2.7 ; $p < 0.0001$). Während der Hämolysse ist bezüglich des CRP keine signifikante Veränderung zu erkennen (6.6 ± 9.8 vs. 6.7 ± 9.4 ; $p = 0.7$).

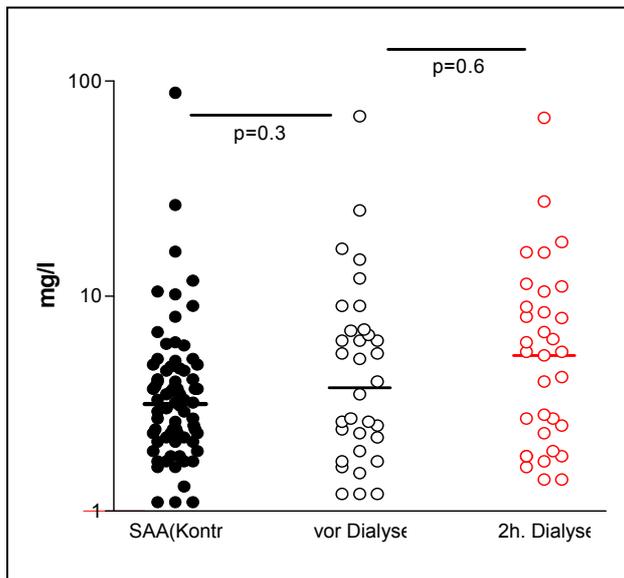
Im Vergleich dazu konnten wir bei dem akute Phase Protein SAA weder im Vergleich Patienten zu Kontrollpersonen (7.2 ± 12 vs. 5.1 ± 10 ; $p = 0.3$), noch bei Patienten während der Dialyse signifikante Veränderungen erkennen (8.0 ± 11.8 vs. 7.2 ± 12 ; $p = 0.6$). (siehe Abb. 13)

Abb. 12



Vergleich der Serumkonzentration von CRP bei 69 Patienten vor Dialyse, während der Dialyse (2 Std. nach Beginn) und bei altersgematchten Probanden.

Abb. 13



Vergleich der Serumkonzentration von SAA bei 69 Patienten vor Dialyse, während der Dialyse (2 Std. nach Beginn) und bei altersgematchten Probanden.

3.3 Korrelationen zwischen den Immunmediatoren

Um zu überprüfen, ob es zwischen den Serum- und mRNA-Konzentrationen bestimmter Immunmediatoren intraindividuelle Beziehungen gab, und um die Stärke der Assoziation der Zytokine untereinander zu untersuchen, wurden nach der verteilungsfreien Spearman'schen Rang-Korrelationsmethode Korrelationskoeffizienten für stetige, nicht-normalverteilte Variablen berechnet.

Im Gegensatz zum Pearsonschen Korrelationskoeffizienten nimmt die Methode keine Intervallskalierung und keine Normalverteilung der zu korrelierenden Parameter an. Der Spearman'schen Rang- Korrelationskoeffizienten(r_s) variiert zwischen -1 und $+1$. Ein r_s nahe $+1$ zeigt eine starke positive Assoziation zwischen zwei Variablen an, mit einer konkordanten gleichsinnigen Zunahme der Werte. Ein Korrelationskoeffizient von -1 zeigt eine starke negative Beziehung zwischen zwei Variablen an, mit einer Abnahme der einen und einer Zunahme der jeweils anderen (Diskordanz). Ein r_s von 0 zeigt keine Assoziation an.

Die verbundene Hypothesentestung zeigt durch den p-Wert die Wahrscheinlichkeit an, mit der fälschlicherweise eine Assoziation zwischen den Zytokinen verworfen wird. Eine Irrtumswahrscheinlichkeit von kleiner 5% ($p < 0.05$) galt in den hier durchgeführten Korrelationen als Ausdruck einer signifikanten Assoziation zwischen den Zytokinen im Kollektiv der Patienten.

3.3.1 Korrelationen auf Proteinebene

Ob zwischen den Serumkonzentrationen bestimmter Immunmediatoren bei Dialysepatienten intraindividuelle Beziehungen bestehen, zeigt ausführlich Tabelle 4.

Tabelle 4 ist auf einer extra Seite 67.

Diese gegen die Seite mit der Tabelle austauschen!!

Proinflammatorische Zytokine untereinander

Korrelierte man TNF- α , sTNF- α -R60 und sTNF- α -R80 getrennt für sich alleine, so erkannte man für alle drei Zytokine / Zytokinrezeptoren hoch signifikante Ergebnisse im Verlauf der Dialyse ($r = 0.8$, $p < 0.0001$ für TNF- α ; $r = 0.86$, $p < 0.0001$ für sTNF- α -R60; $r = 0.7$, $p < 0.0001$ für sTNF- α -R80).

Im nächsten Schritt wurde das Zytokin TNF- α mit den dazugehörigen Rezeptoren ,zum Zeitpunkt vor der Dialyse, miteinander korreliert. Zu erkennen war, dass es keinerlei signifikante Korrelationen zwischen TNF- α einerseits und den Rezeptoren sTNF- α R60 ($r = 0.16$, $p = 0.36$) und sTNF- α -R80 ($r = 0.18$, $p = 0.18$) andererseits gab. Das gleiche galt auch für die Kontrollpersonen. Auch hier waren keinerlei signifikante Korrelationen zu erkennen. Die Korrelationsergebnisse dieser Untersuchungen hinsichtlich des Zeitpunktes während der Dialyse ergaben ebenso wenig Signifikanzen.

Im Vergleich dazu konnte man sowohl bei Dialysepatienten vor der Dialyse, als auch während der Dialyse ein hochsignifikantes Ergebnis erkennen, wenn die beiden löslichen Rezeptoren sTNF- α -R60 und sTNF- α -R80 miteinander korreliert werden. Auch beim zweiten proinflammatorischen Zytokin auf Proteinebene, dem IL-6 und dem dazugehörigen löslichen Rezeptor sIL-6 R, konnten wir hochsignifikante Korrelationen analysieren. Ähnlich sah es bei dem löslichen Rezeptor sIL-6 R aus ($r = 0.78$, $p < 0.0001$). Korrelierte man IL-6 mit dem Rezeptor sIL-6 R jeweils zum Zeitpunkt vor der Dialyse, erkannte man keine Signifikanz. ($r = 0.27$, $p = 0.08$)

Korrelierte man die proinflammatorischen Zytokine IL-6 mit TNF- α miteinander, so ließ sich zum Zeitpunkt vor der Dialyse eine Signifikanz auf Proteinebene erkennen ($r = 0.31$, $p < 0.04$). Bei den Kontrollpersonen war dagegen keine signifikante Korrelation zwischen diesen beiden Zytokinen erkennbar ($r = 0.08$, $p = 0.47$).

Anders sah es bei der Korrelation des löslichen Rezeptoren sTNF- α -R80 gegen den Rezeptor sIL-6 R aus. Hier erkannte man weder bei den Kontrollen ($r = 0.26$, $p = 0.01$), noch bei den Dialysepatienten ($r = 0.26$, $p = 0.09$) irgendwelche Korrelationen. Genauso wenig kam es zu signifikanten Ergebnissen, wenn man das Zytokin TNF- α mit dem Rezeptor sIL-6 R, oder umgekehrt das Zytokin IL-6 mit dem Rezeptor sTNF- α -R60/80, korreliert. Das bezog sich sowohl auf den Zeitpunkt vor der Dialyse, als auch während der Dialyse.

Antiinflammatorisches Zytokine untereinander:

Das antiinflammatorische Zytokin TGF- β zeigte auf Proteinebene -zum Zeitpunkt vor der Dialyse in Korrelation zum Zeitpunkt während der Dialyse- keinerlei signifikante Ergebnisse ($r = 0.2$, $p=0.2$).

Korrelationen zwischen proinflammatorischen und antiinflammatorischen Zytokinen

Weder zwischen dem proinflammatorischen Zytokin TNF- α auf der einen Seite und dem antiinflammatorischen Zytokin TGF- β ($r = -0.001$, $p=0.9$) auf der anderen Seite, noch zwischen IL-6 (Th-1) und TGF- β (Th-2) ($r = 0.27$, $p=0.08$) waren irgendwelche Korrelationen zu erkennen. Das bezog sich sowohl auf den Zeitpunkt vor der Dialyse, als auch auf den Zeitpunkt während der Dialyse.

Korrelierte man TGF- β (Th-2) mit den löslichen Rezeptoren sTNF- α -R60/80 ($r = -0.23$, $p=0.15$) oder sIL-6 R ($r = -0.06$, $p=0.7$), kam es ebenfalls weder zum Zeitpunkt vor der Dialyse, noch während der Dialyse zu signifikanten Ergebnissen.

3.3.2 Korrelationen auf mRNA-Ebene

Ob zwischen den Serumkonzentrationen bestimmter Immunmediatoren bei Dialysepatienten intraindividuelle Beziehungen bestehen, zeigt ausführlich Tabelle 5.

| | TNF-a (0h) | TNF-a (2h) | IL-6 (0h) | IL-6 (2h) | TGF-b (0h) | TGF-b (2h) |
|---------------|---------------|---------------|--------------|--------------|---------------|---------------|
| TNF-a (0h) | 1,000 | 0,73 (**) | 0,23 | 0,21 | 0,36 (**) | 0,25 (*) |
| TNF-a (2h) | | 1,000 | 0,22 | 0,23 | 0,27 (*) | 0,30 (*) |
| IL-6 (0h) | | | 1,000 | 0,31 | -0,01 | -0,03 |
| IL-6 (2h) | | | | 1,000 | 0,21 | 0,24 |
| TGF-b (0h) | | | | | 1,000 | 0,9 (**) |
| TGF-b (2h) | | | | | | 1,000 |

Tab. 5: Pro- und Antiinflammatorische Zytokinverteilungsmuster auf mRNA-Ebene bei Dialysepatienten. Rangkorrelationen der mRNA-Zytokinkonzentrationen untereinander, angegeben sind die Spearman'schen Rangkorrelationskoeffizienten. (0h) vor der Dialyse, (2h) zum Zeitpunkt während der Dialyse.

(**) Die Korrelation ist auf dem 0,01 Niveau signifikant (zweiseitig),

(*) Die Korrelation ist auf dem 0,05 Niveau signifikant (zweiseitig)

Proinflammatorische Zytokine untereinander

Weitere Analysen wurden durchgeführt um zu erkennen, ob es zu einer Korrelation zwischen den einzelnen Zytokinwerten vor der Dialyse und während der Dialyse kam. Hier ließ sich eine signifikante Korrelation bezüglich TNF- α vor Dialyse und TNF- α nach der Dialyse erkennen ($r = 0.73$, $p < 0.0001$).

Bezogen auf IL-6 konnte keine signifikante Korrelation zwischen IL-6 vor der Dialyse und IL-6 nach der Dialyse analysieren ($r = 0.3$, $p = 0.3$).

Auch die Korrelation zwischen den beiden proinflammatorischen Zytokinen konnte weder zum Zeitpunkt vor der Dialyse noch im Verlauf der Dialyse Korrelationen zeigen.

Antiinflammatorische Zytokine untereinander:

Beim antiinflammatorischen Zytokin TGF- β ließ sich eine hoch signifikante Korrelation zwischen den Patienten vor der Dialyse und den Patienten während der Dialyse analysieren ($r = 0.9$, $p < 0.0001$).

Korrelation zwischen pro- und antiinflammatorischen Zytokinen.

Die Analyse der Korrelationen zwischen den pro- und antiinflammatorischen Zytokinen bei Patienten während der Dialyse ist ebenfalls in Tabelle 5 zu erkennen.

Hier konnten sowohl zum Zeitpunkt vor der Dialyse ($r = 0.36$, $p < 0.007$), als auch zum Zeitpunkt nach der Dialyse ($r = 0.30$, $p < 0.01$) signifikante Korrelationen zwischen den beiden unterschiedlichen Th-Qualitäten analysiert werden. Zusätzlich konnte festgestellt werden, dass es bezüglich der Probanden zu keinen signifikanten Korrelationen gekommen ist ($r = -0.15$, $p = 0.5$). Das zweite proinflammatorische Zytokin IL-6 wurde ebenfalls mit TGF- β korreliert. Hier konnten weder zum Zeitpunkt vor der Dialyse ($r = -0.01$, $p = 0.9$), noch zum Zeitpunkt nach der Dialyse ($r = 0.45$, $p = 0.11$) signifikante Korrelationen erkannt werden. Auch die Kontrollpersonen zeigten in Bezug auf diese beiden Zytokine keine signifikanten Korrelationen ($r = 0.003$, $p = 0.9$).

3.3.3 Korrelationen beim Vergleich Protein- zu mRNA-Ebene

Nach Untersuchung aller Korrelationen der nachweisbaren Zytokine auf entweder mRNA oder Protein- Ebene, wurde nun analysiert, ob es auch Korrelationen zwischen Zytokinen auf mRNA-Ebene und Proteinebene gab. Die Ergebnisse der Korrelationen sind in Tabelle 6 zu erkennen.

Tabelle 6 ist auf einer extra Seite 72.

Diese gegen die Seite mit der Tabelle austauschen!!

Korrelationen zwischen proinflammatorischen Zytokinen und den dazugehörigen löslichen Rezeptoren

Beim Vergleich TNF- α auf mRNA gegen TNF- α auf Proteinebene wurden jeweils die Zytokinwerte der Patienten vor Dialysebeginn miteinander korreliert. Es waren weder bei den Patienten ($r = -0.2$, $p=0.17$), noch bei den Kontrollpersonen ($r = 0.01$, $p=0.96$) signifikante Ergebnisse zu erkennen.

Genauso wenig kam es zu signifikanten Ergebnissen, als anstatt zum Zeitpunkt vor der Dialyse nun den Zeitpunkt während der Dialyse hinsichtlich der gleichen Zytokine untersucht wurde ($r = -0.07$, $p=0.6$).

Die Korrelationen zwischen den Zytokinergebnissen von TNF- α auf mRNA-Ebene mit denen der löslichen Rezeptoren sTNF- α -R60/80 auf Proteinebene ergab weder zum Zeitpunkt vor der Dialyse ($r = 0.1$, $p=0.5$ / $r = 0.1$, $p=0.5$), noch zum Zeitpunkt während der Dialyse ($r = 0.17$, $p=0.3$ / $r = -0.06$, $p=0.7$) signifikante Ergebnisse.

Die Ergebnisse hinsichtlich Korrelationen ergaben beim zweiten proinflammatorischen Zytokin, dem IL-6, ebenfalls keinerlei Signifikanzen. Weder der Vergleich IL-6, noch der Vergleich IL-6 zu dem dazugehörigen Rezeptor war signifikant.

Korrelationen des antiinflammatorischen Zytokin TGF- β

Die Analyse beim antiinflammatorischen Zytokin TGF- β in Bezug auf die Korrelationen m-RNA Ebene im Vergleich zur Proteinebene ergaben andere Ergebnisse. Ebenso wie bei den antiinflammatorischen Zytokinen untereinander -so auch zum Zeitpunkt vor der Dialyse- konnten keinerlei signifikante Ergebnisse ($r = 0.07$, $p=0.6$) analysiert werden. Auch die Kontrollpersonen zeigten keinerlei signifikante Korrelation ($r = -0.23$, $p=0.3$). Anders dagegen die Korrelation zum Zeitpunkt während der Dialyse. Hier zeigte sich eine signifikante Korrelation zwischen TGF- β auf mRNA Ebene und TGF- β auf Proteinebene ($r = 0.3$, $p=0.04$).

Korrelation der proinflammatorischen Zytokine mit dem antiinflammatorischen Zytokin TGF- β

Alle Korrelationsmuster, die beim Vergleich TGF- β mit TNF- α und den dazugehörigen Rezeptoren auf der eine Seite, und TGF- β im Vergleich zu IL-6 mit Rezeptoren auf der anderen Seite möglich waren, zeigten keinerlei signifikante Ergebnisse.

3.4 Mortalitätsdaten

Nach einer Beobachtungszeit von 36 Monaten verstarben von den 69 untersuchten Dialysepatienten 22. Dies entspricht mit 32 % in 3 Jahren ungefähr der allgemein beschriebenen 10 % Mortalitätsrate pro Jahr bei Dialysepatienten. 68 % verstarben aufgrund kardiovaskulärer Ereignisse, 14 % an einer Sepsis und die restlichen 18 % an anderen Ursachen.

3.4.1 Veränderung der auf Proteinebene gemessenen pro- und anti-inflammatorischen Zytokine in Bezug auf die Mortalitätsrate

Die Analyse der auf Proteinebene untersuchten Zytokine wurde nun hinsichtlich der Mortalitätsrate bei diesen Dialysepatienten im Rahmen der 36 monatigen Beobachtungszeit untersucht.

In Abb. 14 ist zu erkennen, dass es keinerlei signifikante TNF- α Erhöhungen bei den Dialysepatienten gab, die während der Beobachtungszeit verstarben, und zwar im Vergleich zu denen, die überlebten. Weder zum Zeitpunkt vor der Dialyse (5.4 ± 8.5 vs. 4.3 ± 9.0 TNF- α -Protein; $p= 0.3$), noch zum Zeitpunkt während der Dialyse (6.2 ± 8.1 vs. 3.3 ± 9.6 TNF- α -Protein; $p= 0.6$).

Ähnliche Ergebnisse gab es bei den Analysen hinsichtlich von TGF- β auf Proteinebene. Hier ergab sich keine signifikante Erniedrigung bei den verstorbenen Patienten im Vergleich zu den nicht verstorbenen. Nicht zum Zeitpunkt vor der Dialyse (18.4 ± 10 vs. 20 ± 11 TGF- β -Protein; $p= 0.4$), und auch nicht während der Dialyse (15.9 ± 6 vs. 17.4 ± 7 TGF- β -Protein; $p= 0.06$). (siehe Abb. 15)

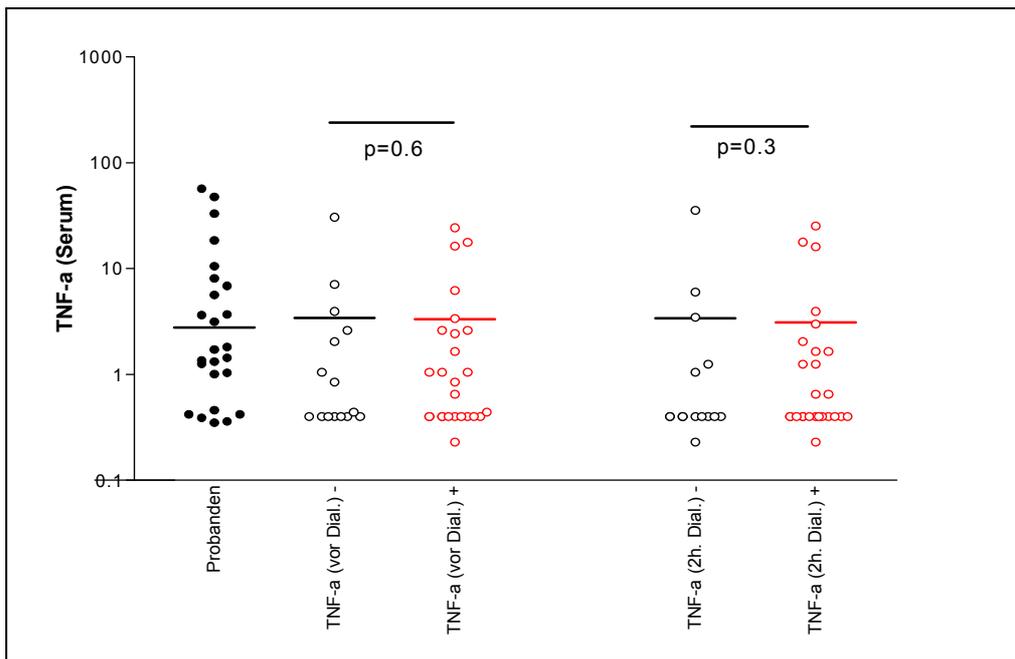


Abb. 14: Vergleich der auf Protein gemessenen Zytokinspiegel von TNF-a von verstorbenen (-) zu nicht verstorbenen (+), und zwar jeweils zum Zeitpunkt vor der Dialyse und während der Dialyse.

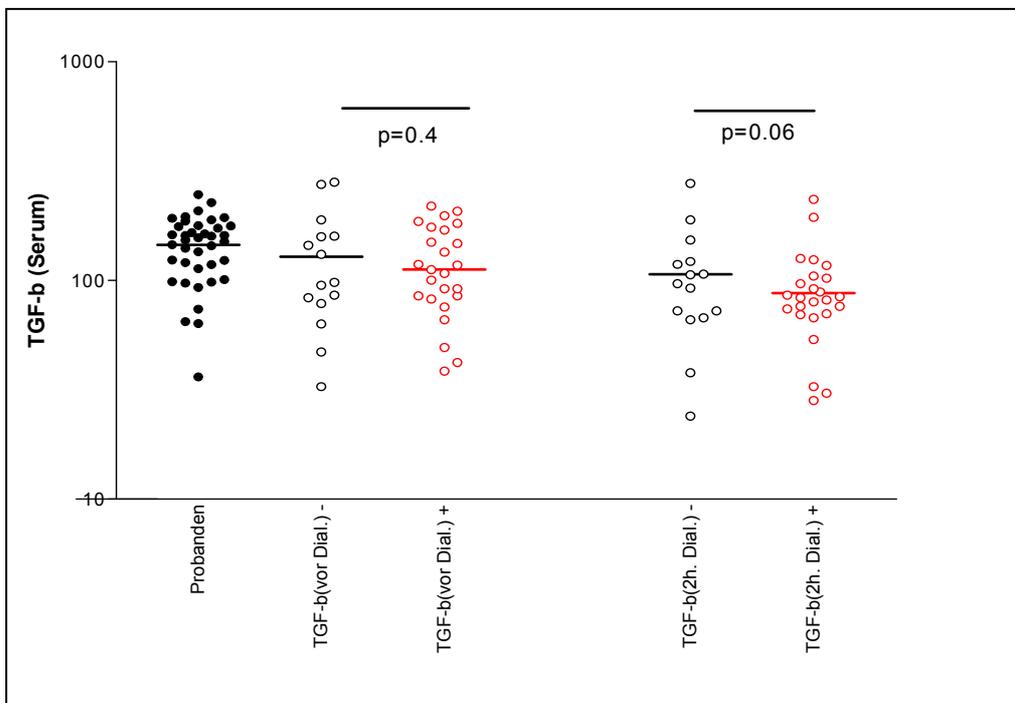


Abb. 15: Vergleich der auf Protein gemessenen Zytokinspiegel von TGF-b von verstorbenen (-) zu nicht verstorbenen (+) Dialysepatienten, und zwar jeweils zum Zeitpunkt vor der Dialyse und zum Zeitpunkt während der Dialyse.

Zusätzlich wurde analysiert, was auf Genexpressionsebene nicht durchführbar war, also auch das Zytokin IL-6 und das akute Phase Protein CRP hinsichtlich der Mortalität der Dialysepatienten.

Auch hier kam es bei den Dialysepatienten, die während der Beobachtungszeit verstarben, im Vergleich zu denen, die überlebten, zu keinerlei signifikanten Unterschieden im Bezug auf eine IL-6 Erhöhung. Weder zum Zeitpunkt vor der Dialyse (6.3 ± 1.1 vs. 8.6 ± 1.5 IL-6 -Protein; $p= 0.8$), noch zum Zeitpunkt während der Dialyse (6.7 ± 1.4 vs. 7.7 ± 1.4 IL-6 -Protein; $p= 0.9$) konnten signifikante Unterschiede analysiert werden.

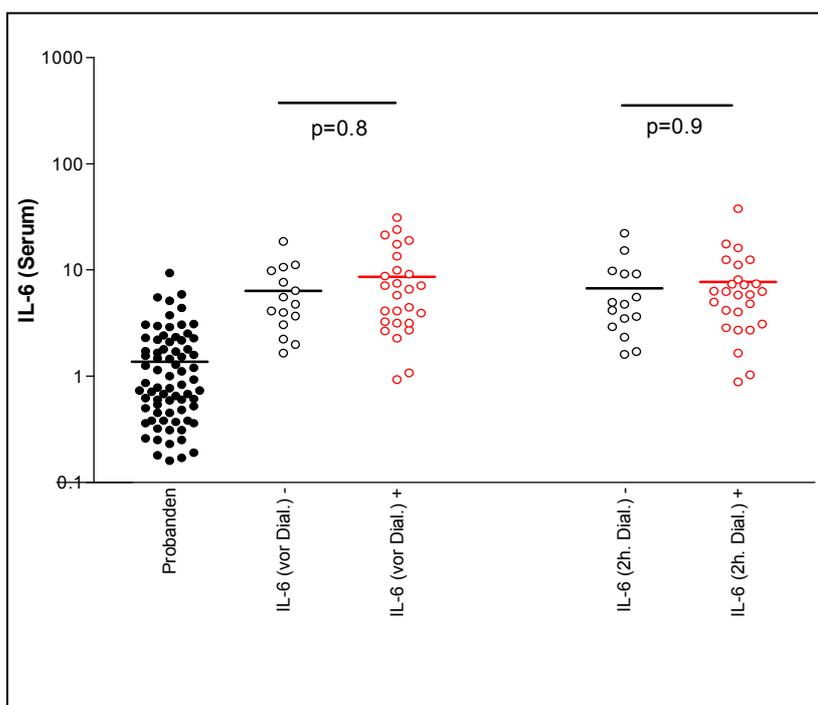


Abb. 16: Vergleich der auf Protein gemessenen Zytokinspiegel von IL-6 von verstorbenen (-) zu nicht verstorbenen (+) Dialysepatienten, und zwar jeweils zum Zeitpunkt vor der Dialyse und zum Zeitpunkt während der Dialyse.

Ein ähnliches Bild zeigte sich auch in Abb. 17 bei der Analyse des CRP. Hier kam es ebenfalls zu keinerlei signifikanten CRP Erhöhungen bei den Dialysepatienten, die während der Beobachtungszeit verstarben im Vergleich zu denen, die überlebten. Auch hier konnte weder zum Zeitpunkt vor der Dialyse (5.4 ± 8 vs. 8.9 ± 11 CRP - Protein; $p= 0.4$), noch zum Zeitpunkt während der Dialyse (6.2 ± 8 vs. 7.9 ± 11 CRP - Protein; $p= 0.7$) ein signifikanter Unterschied erkannt werden.

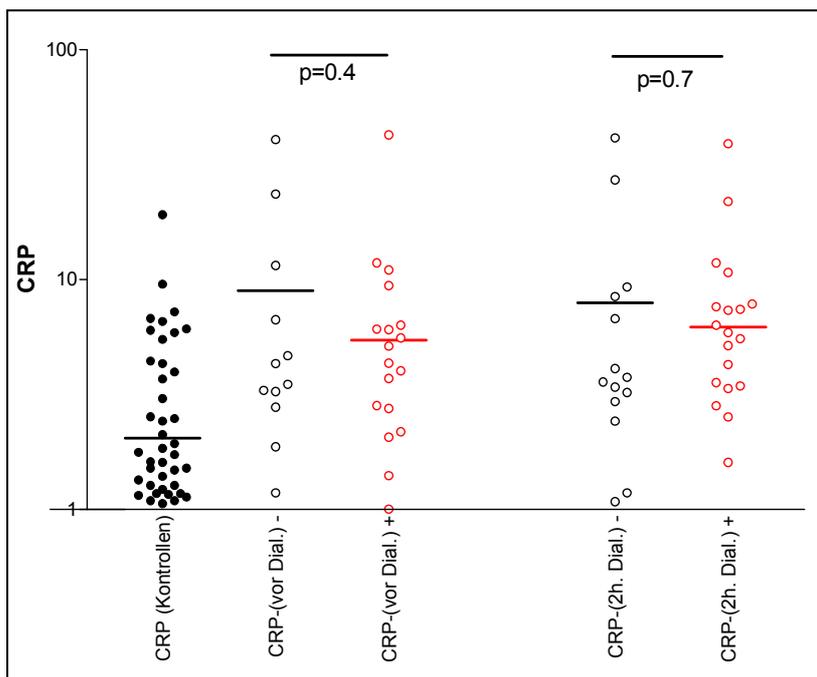


Abb. 17: Vergleich der auf Protein gemessenen Spiegel von CRP von verstorbenen (-) zu nicht verstorbenen (+) Dialysepatienten, und zwar jeweils zum Zeitpunkt vor der Dialyse und zum Zeitpunkt während der Dialyse.

3.4.2 Veränderung der auf mRNA-Ebene gemessenen pro- und antiinflammatorischen Zytokine in Bezug auf die Mortalitätsrate

Ebenfalls wurde hinsichtlich der Mortalitätsrate ein proinflammatorisches (Th1) und ein antiinflammatorisches Zytokin (Th2) auf mRNA-Ebene untersucht, und zwar jeweils zum Zeitpunkt vor der Dialyse und zum Zeitpunkt nach der Dialyse.

Wie Abb. 18 und 19 zeigen, konnten signifikant erhöhte TNF- α Genexpressionsspiegel bei den Dialysepatienten analysiert werden, die während der 36 Monate Beobachtungszeit verstarben. Dies galt sowohl für den Zeitpunkt vor der Dialyse (1.3 ± 0.2 vs. 0.6 ± 0.07 Moleküle von TNF- α pro 1000 Moleküle b-actin; $p < 0.001$), als auch für den Zeitpunkt nach der Dialyse (2.2 ± 0.2 vs. 1.2 ± 0.15 Moleküle von TNF- α pro 1000 Moleküle b-actin; $p < 0.02$).

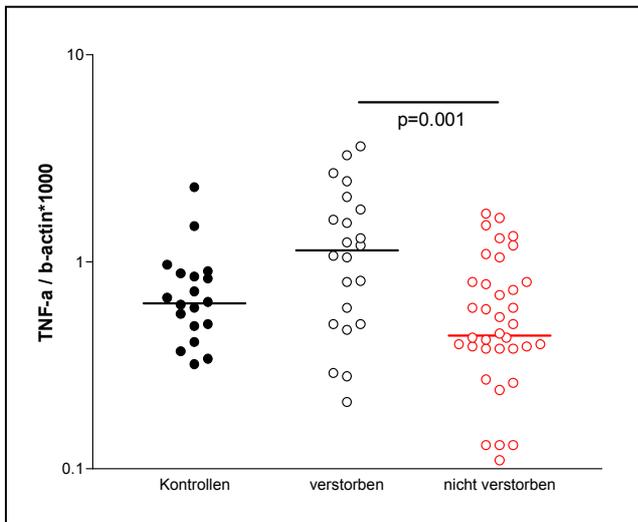


Abb. 18: Vergleich der auf mRNA gemessenen Zytokinspiegel von TNF-a von verstorbenen zu nicht verstorbenen Dialysepatienten, und zwar jeweils zum Zeitpunkt vor der Dialyse.

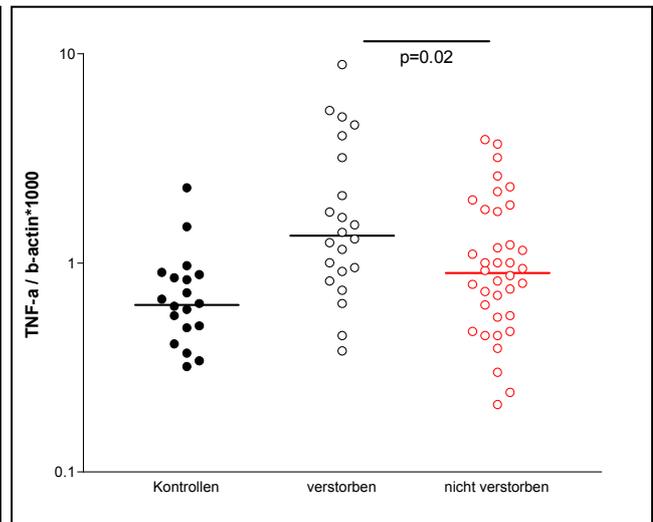


Abb.19: Vergleich der auf mRNA gemessenen Zytokinspiegel von TNF-a von verstorbenen zu nicht verstorbenen Dialysepatienten, und zwar jeweils zum Zeitpunkt während der Dialyse.

Auf der anderen Seite konnten signifikant erniedrigte TGF- β Genexpressionsspiegel bei den Dialysepatienten analysiert wrden, die während der 36 Monate Beobachtungszeit verstarben. Dies galt ebenfalls sowohl für den Zeitpunkt vor der Dialyse (68 ± 8 vs. 48.5 ± 10 Moleküle von TGF- β pro 1000 Moleküle b-actin; $p < 0.04$), als auch für den Zeitpunkt nach der Dialyse (65 ± 9 vs. 47 ± 11 Moleküle von TGF- β pro 1000 Moleküle b-actin; $p < 0.02$).

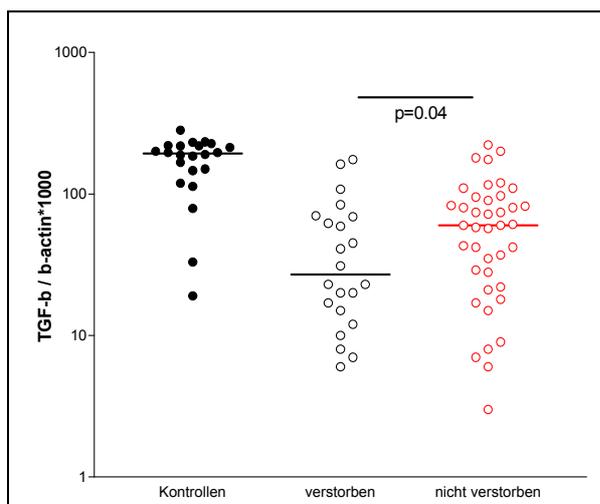


Abb. 20: Vergleich der auf mRNA gemessenen Zytokinspiegel von TGF-b von verstorbenen zu nicht verstorbenen Dialysepatienten, und zwar jeweils zum Zeitpunkt vor der Dialyse.

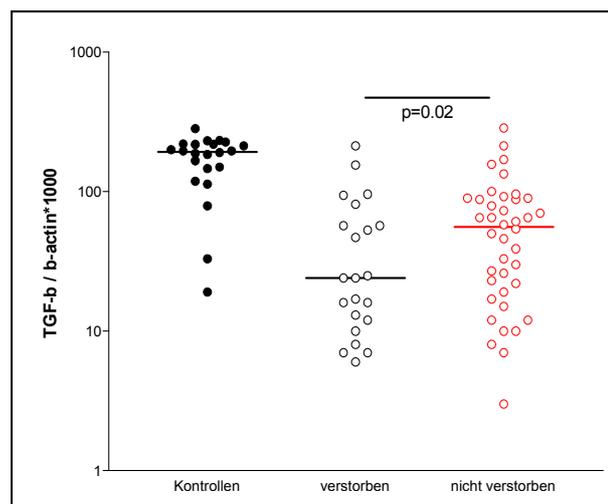


Abb. 21: Vergleich der auf mRNA gemessenen Zytokinspiegel von TGF-b von verstorbenen zu nicht verstorbenen Dialysepatienten, und zwar jeweils zum Zeitpunkt während der Dialyse.

Nach den signifikanten Analysen der Genexpressionen von dem proinflammatorischen Zytokin TNF- α und dem antiinflammatorischen Zytokin TGF- β wurde in einem nächsten Schritt untersucht, in wie weit das Verhältnis TNF- α / TGF- β einen weiteren Risikofaktor in Bezug auf die Mortalität bei Dialysepatienten darstellt.

Wie Abb. 22 und 23 zeigen, war dieses Verhältnis bei den Dialysepatienten, die während der 36 Monate verstarben, signifikant erhöht, im Vergleich zu den Dialysepatienten, die überlebt haben. Beide, sowohl das Verhältnis der TNF- α / TGF- β Genexpression vor der Dialyse (59.7 ± 16.5 vs. 19.8 ± 3.7 Moleküle von TNF- α / TGF- β pro 1000 Moleküle b-actin; $p < 0.02$), als auch das Verhältnis während der Dialyse (57.6 ± 48 vs. 19.1 ± 5.2 Moleküle von TNF- α / TGF- β pro 1000 Moleküle b-actin; $p < 0.002$) stellen somit weitere Risikofaktoren für die Mortalität dar.

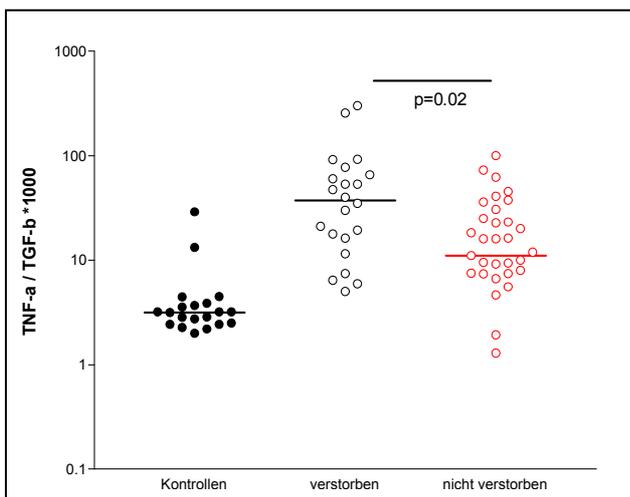


Abb. 22: Vergleich des auf mRNA gemessenen Zytokinverhältnisses von TNF- α /TGF- β bei verstorbenen zu nicht verstorbenen Dialysepatienten, und zwar jeweils zum Zeitpunkt vor der Dialyse.

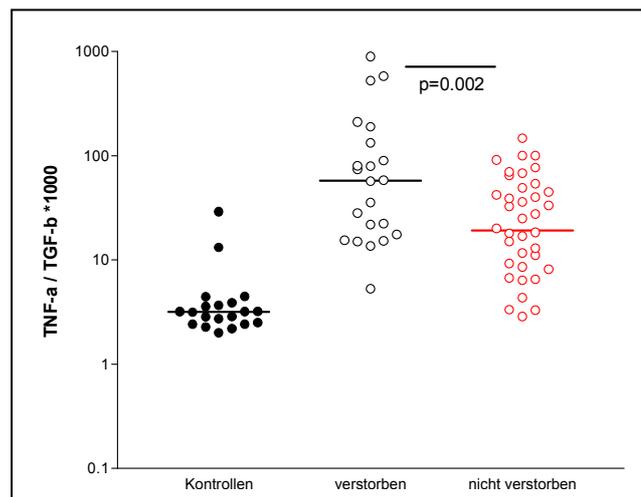


Abb. 23: Vergleich des auf mRNA gemessenen Zytokinverhältnisses von TNF- α /TGF- β bei verstorbenen zu nicht verstorbenen Dialysepatienten, und zwar jeweils zum Zeitpunkt während der Dialyse.

3.4.3 Mortalitätsrate der Dialysepatienten auf Proteinebene

Anhand der Kontrollpersonen wurden ebenfalls die Referenzwerte (siehe 3.5) der beiden Zytokine TNF- α und TGF- β auf Proteinebene definiert. Die Mortalitätsrate wurde bei den Dialysepatienten analysiert, die über dem definierten Normwert (TNF- α , TNF- α / TGF- β) oder unter dem Normwert (TGF- β) lagen. In keinem der Fälle zeigte sich,

dass nicht normale Serumkonzentrationen mit einer erhöhten Mortalität assoziiert sind (Abb. 24).

**Hämodialysepatienten, die während des Beobachtungszeit verstarben
(% der Untergruppen)**

| Protein | Normalwerte | Nicht Normalwerte | p-Wert |
|------------------------------|-------------|-------------------|--------|
| TNF- α | 54 | 50 | > 0.1 |
| TGF- β | 38 | 38 | > 1.0 |
| TNF- α / TGF- β | 52 | 48 | > 0.2 |
| CRP | 43 | 66 | > 0.2 |

Abb. 24: Mortalitätsrate der Hämodialysepatienten auf Proteinebene.

3.4.4 Mortalitätsrate der Dialysepatienten auf mRNA- Ebene

Um einen Referenzwert der spontanen mRNA Expression in peripheren Leukozyten zu definieren, wurden die Daten der Kontrollpersonen benutzt. 57 % der Dialysepatienten lagen entweder mit Ihren TNF- α Werten über oder bezüglich der TGF- β Werte unter diesem definierten Durchschnittswert. Bei Kontrollpersonen konnte diese Konstellation nur bei 18 % ($p < 0.005$) beobachtet werden.

Die Mortalitätsrate bei Hämodialysepatienten , bei denen die TNF- α Spiegel über dem definierten Wert lagen, liegt bei 61 %, im Vergleich zu 30 % Mortalitätsrate bei denjenigen mit erniedrigten Spiegeln ($p < 0.05$).

Anders ist die Situation für das Zytokin TGF- β . Hier sind die Spiegel, die unter dem definierten Normalwert liegen, mit einer Mortalitätsrate von 44 % assoziiert. Im Vergleich zu 33 % Mortalitätsrate für die Dialysepatienten, deren TGF- β Spiegel über dem Normalwert lagen ($p < 0.7$).

Bei den Dialysepatienten, deren mRNA Verhältnis TNF- α / TGF- β über dem definierten Normalwert lag, zeigte sich eine Mortalitätsrate von 77 % im Vergleich zu 27 % bei denen mit einem erniedrigten Verhältnis ($p < 0.01$).

3.5 Überlebenskurven

Abb. 25 zeigt die Kaplan–Meier Kurven für die Mortalität von Hämodialysepatienten mit erhöhten Werten im Vergleich zu Normalwerten bezüglich von TNF- α , TGF- β und dem Verhältnis TNF- α / TGF- β . TNF- α und TNF- α / TGF- β Erhöhung ist dabei definiert als $> 2SD$ der Resultate von gesunden Kontrollen.

Für TGF- β gilt $< 2SD$. Die Überlebenskurven von Hämodialysepatienten mit erhöhten TNF- α und TNF- α / TGF- β Werten veränderten sich kontinuierlich während der Beobachtungszeit im Vergleich zu Patienten mit Normalwerten.

Für TGF- β Werte wurde in dieser Hinsicht kein Unterschied gesehen. Damit zeigt sich, dass Hämodialysepatienten mit einem erhöhten TNF- α Wert ($p < 0.02$) oder einem erhöhten TNF- α / TGF- β Verhältnis ($p < 0.005$) signifikant häufiger verstorben sind.

Die p Werte wurden mittels eines log-rank test erstellt.

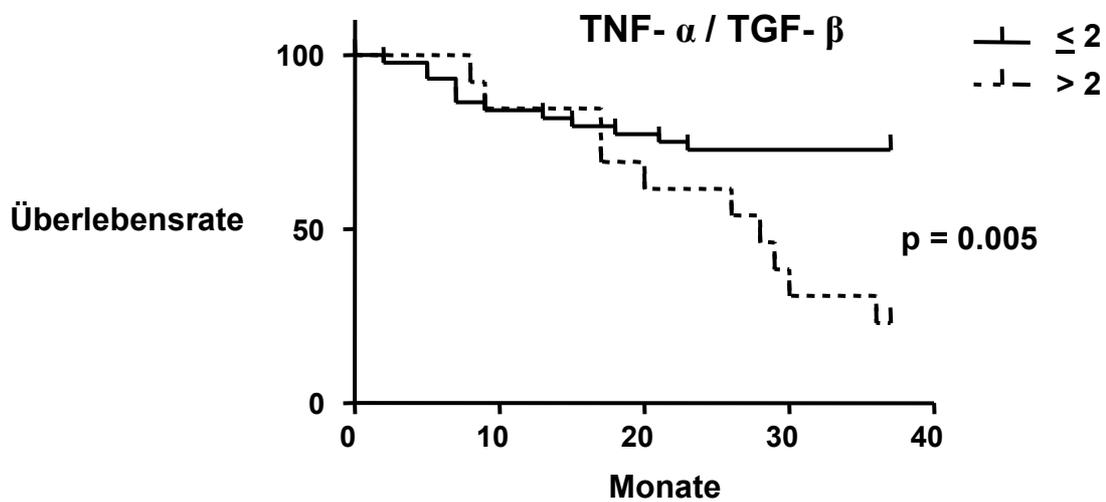
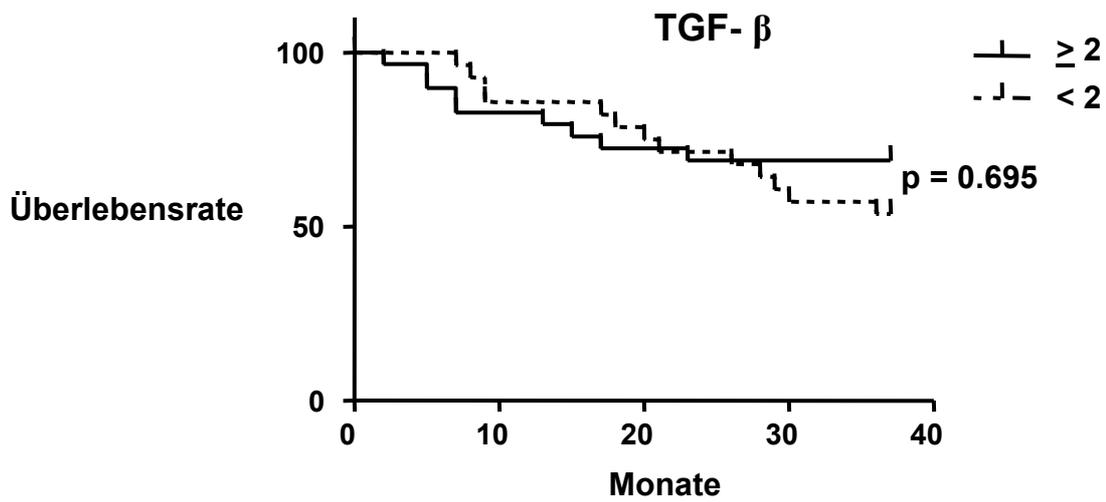
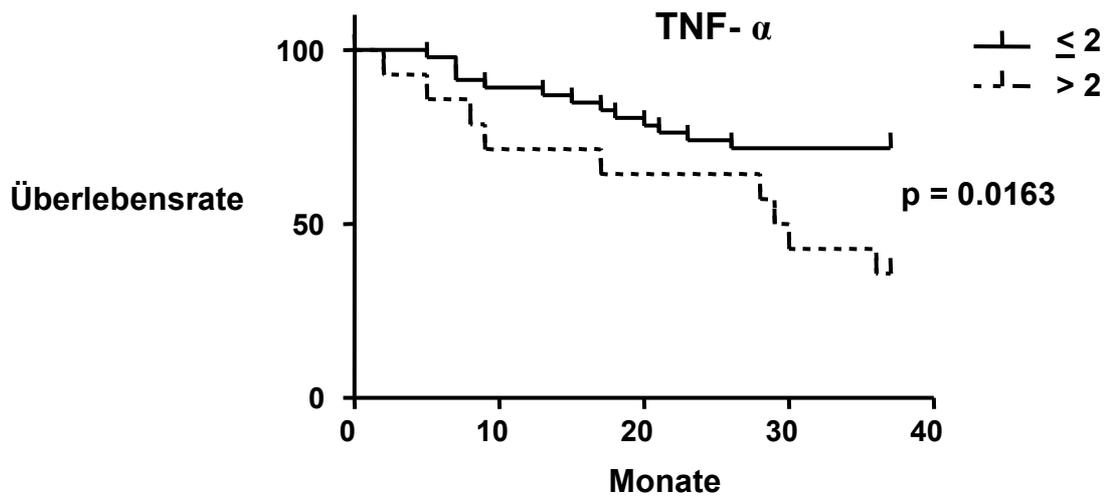


Abb. 25: Kaplan-Meier Überlebenskurven

4 Diskussion

In dieser Arbeit wurden systematisch Zytokinmuster auf Serum- und mRNA-Ebene beschrieben, um bei Dialysepatienten die Rolle des Immunsystems als Mediator der progressiven Arteriosklerose zu untersuchen.

Aufbauend auf Erkenntnissen der vaskulären Biologie über pro- und antiinflammatorische Wechselbeziehungen im Zytokinnetzwerk erfolgte in der vorliegenden Untersuchung eine Beschreibung der Zytokinkonstellationen sowohl auf Serum- wie auch auf mRNA-Ebene.

Dabei wurde bewusst ein klinisch-beschreibender methodischer Ansatz gewählt, um die neueren biologischen Studienergebnisse auf die klinische Situation zu übertragen. Die Beschreibung der Zytokinmuster erfolgte in dieser Arbeit als Ausgangspunkt für pathogenetische Überlegungen und dient mittelfristig dem Ziel, die Immunmechanismen der progressiven Arteriosklerose bei Dialysepatienten besser zu verstehen. Langfristig soll sie zu einer Hypothesengenerierung bezüglich adjuvanter Krankheitsmechanismen und Therapieverfahren beitragen.

Die vorliegende Arbeit geht von der von Ross fortentwickelten Erkenntnis aus, dass es sich bei der Arteriosklerose um eine chronische Entzündungsreaktion handelt. Gemäß der „Response-to-Injury“-Hypothese wird hiernach eine rasche Progression der Arteriosklerose sowie die Schwere der Erkrankung (Ausmaß, Plaque-load) durch das Verhältnis von endothelialer Schädigung und genetisch determiniertem Muster der Immunantwort, d.h. die Freisetzung von pro- und antiinflammatorischen wirkenden Immunmediatoren bestimmt.

Ziel dieser Arbeit war die Prüfung, ob die Hämodialyse das Gleichgewicht zwischen Th1- und Th2-Immunität verändern wird. Durch die Bestimmung der Zytokine auf mRNA-Ebene sollte erstmals beschrieben werden, ob es zu einer Veränderung der Genexpression von pro- und antiinflammatorischen Zytokine bei Dialysepatienten kommt. Im Vergleich dazu wurden die im Serum zirkulierenden Zytokinspiegel gemessen.

Desweiteren war das Ziel dieser Arbeit herauszufinden, ob veränderte Zytokine auf mRNA-Ebene eine mögliche prognostische Bedeutung bezüglich der Mortalität bei Dialysepatienten reflektiert und vorhersagt.

Die neue Methode zur Quantifizierung der Zytokine auf Genexpressionsebene

Die Quantifikation von mRNA im Vollblut wurde immer als zu schwierig für die klinische Routine bezeichnet. Der Grund dafür lag einerseits in der Abschwächung der Gentranskription, und andererseits in der unkontrollierten Geninduktion während der Aufreinigungsschritte von peripheren Leukozyten, zu denen es bei den bisher herkömmlichen Stabilisierungs- und Aufarbeitungsmöglichkeiten gekommen war. In dieser Studie benutzten wir erstmals eine neuartige Stabilisierungslösung, die sowohl zu einer reduzierten RNA-Abschwächung führt, als auch die Geninduktion in sofort abgenommenen Blutproben inhibiert bzw. eliminiert [95].

Kommt es bei der RNA nicht zu einer sofortigen Stabilisierung, scheint es zu einer kräftigen Hochregulation der Genexpression von Zytokinen zu kommen [96]. Da dies zu unklaren Unterschieden zwischen den Genexpressionsspiegeln der einzelnen Zytokine führen kann, ist die sofortige m-RNA Stabilisierung, nach Blutabnahme, von diagnostischem und therapeutischem Interesse.

Mit dieser neuartigen Technik, konnten wir erstmalig prospektiv in einer Kohorte bei Dialysepatienten verschiedene Zytokine auf mRNA-Genexpressionsebene messen.

Immunmediatoren im Verlauf der Dialyse

Um eine Vorstellung von der Verteilung pro- und antiinflammatorischer Zytokine beim Verlauf der Dialyse zu gewinnen, wurden die Zytokinmessungen aus dem Patientenkollektiv zum Vergleich gegenübergestellt.

Die Referenzwerte für die einzelnen Zytokine ergaben sich aus den gemessenen Zytokinpiegeln im Kollektiv gesunder Probanden, die uns als Vergleichswerte für alle weiteren Messungen dienten. Sie wurden als „normales Zytokinprofil“ gedeutet.

Den Zytokinverteilungen des Probandenkollektivs wurden im nächsten Schritt die gemessenen Zytokine der Dialysepatienten -sowohl auf Protein- als auch auf Genexpressionsebene- gegenübergestellt.

Es zeigte sich, dass die basale mRNA Genexpression von TNF- α in peripheren Leukozyten der 69 Dialysepatienten signifikant erhöht ist, und zwar im Vergleich zu den Kontrollen. Dieser signifikante Anstieg war ebenfalls im Verlauf der Dialyse zu erkennen.

4 Diskussion

Die basale mRNA Genexpression des Th-1 Zytokin IL-6 zeigte ebenfalls einen signifikanten Anstieg im Vergleich zu den Kontrollen, der aber im Verlauf der Dialyse nicht nachweisbar war.

So bestätigte diese Studie, dass Hämodialysepatienten eine signifikant erhöhte Genexpression der proinflammatorischen (Th-1) Zytokine TNF-a und IL-6 zeigen [98,99]. Ausserdem zeigte diese Studie erstmals, dass die Genexpressionsspiegel des antiinflammatorischen Zytokins TGF-b bei Dialysepatienten signifikant erniedrigt sind.

Ebenfalls noch nicht in Veröffentlichungen beschrieben ist die Aussage, dass das Verhältnis der TNF-a / TGF-b Genexpression ebenfalls bei Dialysepatienten signifikant erhöht ist.

Im Vergleich dazu waren die Veränderungen der im Serum zirkulierenden Zytokinspiegel -hinsichtlich dieser Zytokinmuster- weniger ausgeprägt.

Wir konnten keinerlei signifikante Erhöhungen der Serumkonzentrationen von TNF-a bei den Dialysepatienten analysieren. Hinsichtlich TGF-b Spiegeln im Serum konnten wir zwar erniedrigte Konzentrationen bei Dialysepatienten erkennen, es zeigte sich aber im Vergleich zu den mRNA Spiegeln, dass es zu vermehrten Überlappungen zwischen Dialysepatienten und Kontrollpersonen kam.

Es ist allgemein bekannt, dass Immunmediatoren im Serum sowohl an die extrazelluläre Matrix von Proteinen als auch an deren zugehörige Rezeptoren gebunden werden kann. Deshalb repräsentieren die im Serum zirkulierenden Zytokine nicht den aktuellen Stand der Immunaktivierung.

Im Serum zirkulierende Immunmediatoren müssen ihren Ursprung nicht unbedingt aus den peripheren Leukozyten haben, denn sie können ebenso von den Gefäßwänden, von anderen lymphatischen Geweben oder von nicht lymphatischen Zellen, wie den Hepatozyten oder Adipozyten, ihren Ursprung haben.

Ebenso wichtig zu bemerken ist, dass die Genexpression wahrscheinlich viel einfacher und schneller bereitgestellt werden kann, als systemische Zytokinspiegel.

Dies ist der Grund dafür, dass zwei Stunden nach Beginn der Dialyse bei Patienten erhöhte TNF-a mRNA Genexpressionenspiegel festgestellt werden können, während es bei Serum TNF-a Spiegeln noch zu keinerlei Veränderungen gekommen ist.

Veränderung der Immunmediatoren in Bezug auf die Mortalitätsrate

Bei diesem weiteren Ziel unserer Studie galt es herauszufinden, ob veränderte Immunmediatoren eine mögliche prognostische Bedeutung bei Dialysepatienten haben. Aus diesem Grunde überprüften wir bei allen 69 Patienten des ambulanten Dialysezentrums die klinischen Parameter der Patienten während eines follow up Zeitraums von 36 Monaten.

Die bekannt hohe Mortalitätsrate bei Dialysepatienten erlaubte es uns, diesen harten Endpunkt als Definition von überlebten im Vergleich zu verstorbenen Patienten zu nutzen. Ausserdem war diese hohe Mortalitätsrate von Bedeutung, um unserer Ergebnisse zu demonstrieren.

So konnten wir signifikant erhöhte TNF-a Genexpressionsspiegel, sowohl vor der Dialyse als auch während der Dialyse bei all denen Dialysepatienten analysieren, die während der 36 Monate follow up verstarben.

Auf der anderen Seite konnten wir signifikant erniedrigte TGF-b Genexpressionsspiegel bei den Dialysepatienten analysieren, die während der 36 Monate follow up verstarben. Auch hier war sowohl vor als auch während der Dialyse diese Signifikanz zu erkennen.

Auch bei dem Verhältnis TNF-a / TGF-b auf Genexpressionsebene konnten wir zeigen, dass es zu einem signifikanten Anstieg dieses Verhältnisses bei den Dialysepatienten kam, die während der 36 Monate verstarben.

So konnte erstmalig gezeigt werden, dass sowohl erhöhte TNF-a Genexpressionsspiegel, als auch ein erhöhtes Verhältnis von TNF-a / TGF-b Genexpressionsspiegeln mit einer signifikant erhöhten Mortalität bei Dialysepatienten assoziiert ist.

Während des follow up Zeitraumes von 36 Monaten verstarben 22 der 69 Dialysepatienten (32 %). Die häufigste Todesursache dieser Patienten waren mit 68 % kardiovaskuläre Ereignisse, gefolgt von Sepsis (14%) und anderen (18 %) Ursachen. Diese Mortalitätsrate ist vergleichbar mit den Ergebnissen von anderen Studien. So zeigt die Studie von Zimmermann et al. [36] bei 280 Dialysepatienten eine jährliche Mortalitätsrate von 13 %. Auch der Prozentsatz von 58 % kardiovaskulärer Ereignisse als Todesursache ist vergleichbar mit den von uns entdeckten Ergebnissen. In dem U.S. Renal Data System, in dem über 250.000 Patienten verwaltet werden, liegt die jährliche Todesrate von Dialysepatienten bei ca. 16 % [48].

4 Diskussion

Einen weiteren Versuch, um unsere Theorie zu bestärken, bestand darin, dass wir die mRNA Spiegel der Dialysepatienten quantifizierten und diese mit einem durch das Kontrollkollektiv ermittelten Referenzwert verglichen.

Tatsächlich konnten wir erkennen, dass bei Konzentrationen von TNF-a mRNA oder dem Verhältnis TNF-a / TGF-b mRNA, die über dem Referenzwert lagen, das Überleben der Dialysepatienten signifikant erniedrigt war.

Anders verhielt es sich bezüglich des Zytokins TGF-b in Bezug auf diese Art der Analyse. Denn es erklärte sich weder der schützende Effekt von TGF-b auf mRNA-Ebene, noch sagt diese Art der Analyse etwas über die Mortalitätsrate innerhalb der Beobachtungszeit auf.

Diese Analysen bezüglich der Überlebensrate wiederholten wir anhand der Serumkonzentrationen von TNF-a und TGF-b.

In keinem der Fälle konnten wir eine signifikante Assoziation bezüglich der Überlebensrate feststellen.

Zusammenfassend lässt sich damit sagen, dass der Aktivitätsgrad von zirkulierenden Leukozyten um ein vielfaches enger mit dem Mortalitätsrisiko bei Dialysepatienten assoziiert ist, als die systemischen Zytokinspiegel im Serum.

Für die Interpretation dieser Resultate, ist es wichtig zu wissen, dass die Arteriosklerose die am häufigsten vorkommende Erkrankung bei Dialysepatienten ist, und außerdem zeigen diese Patienten Merkmale eines inflammatorischen Prozesses [23,24].

Im Moment ist immer noch unklar, ob entweder die erhöhten Konzentrationen der Immunmediatoren die Konsequenz der beginnenden intravasalen Inflammation ist, oder ob extravasale Stimuli für die chronische, leichte Aktivität der Inflammation verantwortlich sind [100].

Unsere Ergebnisse der erhöhten proinflammatorischen Zytokin Genexpression bei Patienten während der Dialyse legen nahe, dass diese neueste Hypothese zumindest teilweise dazu beiträgt, eine Erklärung zur erhöhten Inflammation bei diesen Patienten zu geben.

Der Aktivitätsgrad der peripheren Leukozyten bei Patienten während der Dialyse könnte möglicherweise der Grund für die beschleunigte Gefäßinflammation sein.

4 Diskussion

Gleichzeitig könnte er aber auch der Grund für das erhöhte Risiko der kardiovaskulären Mortalität sein.

Seit einiger Zeit ist bekannt, dass einige pharmakologische Präparate, wie Statine oder ACE-Hemmer, neben ihres eigentlichen Wirkmechanismus, zusätzlich noch einen immunmodulierenden Effekt aufweisen [35,101].

Man könnte sich nun vorstellen, dass die induzierte Zytokin-Genexpression während der Dialyse möglicherweise ein interessantes Modell repräsentieren könnte, um ein schnelles Screening von Medikamenten mit potentiellen Effekten auf das Immunsystem zu erreichen.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass die Genexpressionsmuster von peripheren Leukozyten wahrscheinlich die Immunqualität bei Hämodialysepatienten besser reflektieren, als die systemischen Spiegel zirkulierender Immunmediatoren.

Vor allem ist dies auf Genexpressionsebene durch eine bessere Assoziation mit späterer Mortalität verbunden.

Aufgrund der verbesserten Technik, die nun eine zuverlässige mRNA Isolation erlaubt, repräsentiert diese Analyse der mRNA Muster der peripheren Leukozyten eine vielversprechende Vorhersage für den Verlauf entzündlicher Erkrankungen.

Aus diesem Grund könnte dieses neue Analyseverfahren auch in der klinischen Routine durchführbar sein und als wertvolle Ergänzung zu den gängigen bisherigen Diagnostiken auf Proteinebene fungieren.

5 Zusammenfassung

In der klinischen Praxis basiert die Diagnose und die Risikovorhersage bezüglich der inflammatorischen Komponente bei Arteriosklerose bisher auf der Analyse von Serum oder Plasmaproteinen. Genexpressionsanalysen haben dagegen bisher keinen routinemäßigen Stellenwert in der klinischen Routine.

Um einen Vergleich von Serumproteinen zu peripheren Blut mRNA Spiegeln bezüglich diagnostischer und prädiktiver Relevanz zu bekommen, bestimmten wir die Zytokinspiegel bei Patienten mit Nierenversagen während der Dialyse. Bei diesen Patienten kommt es zu einer erhöhten Mortalität, die vorwiegend mit der Beschleunigung der Arteriosklerose in Zusammenhang steht, und in deren späterem Verlauf es häufig zu harten kardiovaskulären Ereignissen kommt. Diese Ereignisse haben nach neuesten Erkenntnissen ihre Grundlage in den veränderten Immunqualitäten bei Dialysepatienten.

Die mRNA Genexpressionspiegel des proinflammatorischen Zytokin TNF-a waren bei Dialysepatienten im Vergleich zu Kontrollpersonen signifikant erhöht. Im Verlauf der Dialyse stiegen diese TNF-a Spiegel noch weiter signifikant an. Im Vergleich dazu zeigte sich, dass die Genexpressionsspiegel des antiinflammatorischen Zytokins TGF-b signifikant erniedrigt waren.

Die Dialysepatienten, die während einer Beobachtungszeit von 36 Monaten verstarben, hatten einerseits signifikant erhöhte mRNA Spiegel von TNF-a und andererseits signifikant erniedrigte Spiegel der Genexpression von TGF-b.

Die durchgeführten Überlebensanalysen zeigen eindeutig, dass sich sowohl wegen der erhöhten TNF-a Genexpressionspiegel ($p < 0.02$) als auch wegen des erhöhten Verhältnis TNF-a / TGF-b auf Genexpressionsebene ($p < 0.005$) eine Vorhersage bezüglich der Mortalität bei Dialysepatienten machen lässt.

Obwohl es sich zeigte, dass auf Serumebene gemessene Immunmediatoren ebenfalls in Zusammenhang mit Hämodialysepatienten stehen, konnten wir weder signifikante Veränderungen auf Serumkonzentrationsebene während der Hämodialyse analysieren, noch war es möglich, eine Vorhersage über die Mortalität zu treffen.

5 Zusammenfassung

Diese Studie zeigte, dass Genexpressionsmuster von zirkulierenden peripheren Leukozyten eine neue wichtige Diagnostikmöglichkeit darstellt, um den klinischen Verlauf von Patienten mit Arteriosklerose und anderen Erkrankungen vorherzusagen.

6 Literaturverzeichnis

1. Roit IM, Brostoff J, Male DK (1997) Kurzes Lehrbuch der Immunologie. Thieme Verlag, Stuttgart
2. Peter HH (Hrsg.) (1991) Klinische Immunologie. Urban und Schwarzenberg, München
3. Wright TM (1997) Cytokines in acute and chronic inflammation. *Frontiers in Bioscience* 2:d12-26
4. CD antigens 1996. *Immunol Today* 1997; 18:100-101
5. Mosmann TR, Schumacher JH, Street NF, Budd R, O'Garra A, Fong TAT, Bond MW, Moore KWM, Sher A, Fiorentino DF: Diversity of cytokine synthesis and function of mouse CD4 + T cells. *Immunol Rev* 123: 209-229 (1991)
6. Fiorentino DF, Bond MW, Mosmann TR: Two types of mouse T helper cell: IV. Th2 clones secrete a factor that inhibits cytokine production by Th1 clones. *J Exp Med* 170: 2081-2095 (1989)
7. MacDonald TT: Effector and regulatory lymphoid cells and cytokines in mucosal sites. *Curr Top Microbiol Immunol* 236: 113-135 (1999)
8. Liblau R, Singer SM, McDevitt HO: Th1 and Th2 CD4 T-cells in the pathogenesis of organ specific autoimmune diseases. *Immunol. Today* 16: 34 (1995)
9. Abbas AK, Murphy KM, Sher A: Funktional diversity of helper T-lymphozytes. *Nature* 383: 787-793 (1996)
10. Vassalli P: The pathophysiology of tumor necrosis factors. *Annu Rev Immunol* 10: 411-452 (1992)

6 Literaturverzeichnis

11. Fiorentino DF, Zlotnik A, Vieira P, Mosmann TR, Howard M, Moore KW, O'Garra A: IL-10 acts on the antigen-presenting cell to inhibit cytokine production by Th1 cells. *J Immunol* 146: 3444-3451 (1991)
12. Wurster et al. STAT6 and IRS-2 cooperate in IL-4 induced. Proliferation and Differentiation but are Dispensable for IL-4 Dependent Rescue from Apoptosis. *Molecular and Cellular Biology*, 2002(22)1: p.117-126
13. Mosmann TR: Properties and functions of interleukin-10. *Adv Immunol* 56: 1-26, (1994)
14. Lawrence DA: Transforming growth factor b: a general review. *Eur Cytokine Netw* 7: 363-374 (1996)
15. Lafaille JJ: The role of helper T cells in autoimmune diseases. *Cytokine Growth Factor Rev* 9: 139-151 (1998)
16. Letterio JJ, Roberts AB: Regulation of immune responses by TGF-b. *Annu Rev Immunol* 16: 137-161 (1998)
17. Prud'homme GJ, Piccirillo CA : The inhibitory effects of transforming growth factor b1 (TGF b1) in autoimmune diseases. *J Autoimmunity* 14: 23-42 (2000)
18. Wick G, Schett G, Amberger A, Kleindienst R, Xu Q (1995) Is atherosclerosis an immunologically mediated disease? *Immunol today* 16:27-33
19. Hansson GK, Jonasson L, Seifert PA, Stemme S (1989) Immune mechanisms in atherosclerosis. *Arteriosclerosis* 9:567-578
20. Posten RN, Davies DF (1974) Immunity and inflammation in the pathogenesis of atherosclerosis. *Arteriosclerosis* 19:353-367
21. Watanabe T, Haraoka S, Shimokana T (1996) Inflammatory and immunological nature of atherosclerosis. *Int J Cardiol* 54:51-60

6 Literaturverzeichnis

22. Virchow R (1856) Der atheromatöse Prozess der Arterien. Wien Med Wochenschr 6:825-830
23. Ross R (1999) Atherosclerosis- an inflammatory disease. N Engl J Med 340(2):115-126
24. Ross R (2003) Does exercise without weight loss improve insulin sensitivity? Diabetes Care.;26(3):944-5.
25. Gerrity, The role of the monocyte in atherogenesis: I. Transition of bloodborne monocytes into foam cells in fatty lesions. Am J Pathol, 1981 (103), 181-190
26. Ross R (1986) The pathogenesis of atherosclerosis-an update. N Engl J Med 314:488-500
27. Ross R (1993) The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. Nature 362:801-809
28. Davies MJ, Gordon JL, Gearing AJH, Pigott R, Woolf N, Katz D, Kyriakopoulos A (1993) The Expression of the Adhesion Molecules ICAM-1, VCAM-1, PECAM, and E-Selectin in Human Atherosclerosis. J Pathol 171:223-229
29. van der Wal AC, Das PK, Tigges AJ, Becker AE (1992) Adhesion molecules on the endothelium and mononuclear cells in human atherosclerotic lesions. Am J Pathol 141:1427-1433
30. Gown AM, Tsukada T, Ross R (1986) Human atherosclerosis II. The immunocytochemical composition of human atherosclerotic lesions. Am J Pathol 125:191-207
31. Hansson GK, Holm J, Jonasson L (1989) Detection of activated T-lymphocytes in the human atherosclerotic plaque. Am J Pathol 13:169-175

6 Literaturverzeichnis

32. Salonen JT, Ylä-Herttuala, Yamamoto R, Butler S, Korpela H, Salonen R, Nyssönen K, Palinski et al. (1992) Autoantibody against oxidised LDL and progression of carotid atherosclerosis. *Lancet* 339:883-887
33. Xu Q, Willeit J, Marosi M, Kleindienst R, Oberhollenzer F, Kiechl S, Stulnig T, Luef G et al. (1993) Association of serum antibodies to heat-shock protein 65 with carotid atherosclerosis. *Lancet* 341:255-259
34. van der Wal AC, Becker AE, van der Loos CM, et al.
Fibrous and lipid-rich atherosclerotic plaques are part of interchangeable morphologies related to inflammation: a concept.
Coron Artery Dis (United States), Jun 1994, 5(6) p463-9
35. Ridker PM, Cushman M, Stampfer MJ, Tracy RP, Hennekens CH (1997) Inflammation, aspirin, and risk of cardiovascular disease in apparently healthy men.
N Engl J Med 336:973-979
36. Zimmermann J, Herrlinger S, Pruy A, Metzger T, Wanner C (1999) Inflammation enhances cardiovascular risk and mortality in hemodialysis patients. *Kidney Int* 55:648-658
37. Ridker PM, Rifai M, Clearfield M, Downs JR, Weis SE, Miles JS et al. (2001) Measurement of C-reactive protein for the targeting of statin therapy in the primary prevention of acute coronary events. *N Engl J Med* 344:1959-1965
38. Lowe GD, Machado SG, Krol WF, et al.
White blood cell count and haematocrit as predictors of coronary recurrence after myocardial infarction.
Thromb Haemost (Germany, West), Oct 30 1985, 54(3) p700-3
39. Cole RJ, Taylor NA, Cole J, et al.
Transplacental effects of chemical mutagens detected by the micronucleus test.
Nature (England), Jan 25 1979, 277(5694) p317-8

6 Literaturverzeichnis

40. Stille W (1997) Arteriosklerose – eine Infektion durch Chlamydia pneumoniae. Dtsch med Wschr 122:1086-1091
41. Ramirez JA (1996) Isolation of Chlamydia pneumoniae from the coronary artery of a patient with coronary atherosclerosis. The Chlamydia pneumoniae/Atherosclerosis Study Group. Ann Intern Med 125:979-982
42. Munro JM, v.d.W.J., Munro CS, Chalmers JA, Cox EL (1987) An immunohistochemical analysis of human aortic fatty streaks. Hum. Pathol. (18): p.375-380
43. Gerrity, The role of the monocyte in atherogenesis: I. Transition of bloodborne monocytes into foam cells in fatty lesions. Am J Pathol, 1981 (103), 181-190
44. Palinski W, Yla HS, Gurtner GC, Socher SS, Butler SW, Carew TE, Steinberg D, Witztum JL: Low density lipoprotein undergoes oxidative modification in vivo. Proc Natl Acad Sci USA, 1989 (86): p.1372-1376
45. Palinski W, Plump AS, Breslow JL, Steinberg D, Witztum JL: ApoE-deficient mice are a model of lipoprotein oxidation in atherogenesis. Arterioscler Thromb, 1994(14):p.605-616
46. Salonen JT, Yamamoto R, Butler S, Korpela H, Salonen R, Nyysönen K, Palinski W, Witztum JL, Autoantibody against oxidised LDL and progression of carotid atherosclerosis. Lancet 1992(339): p.883-887
47. Palinski W, Horkko S, Miller E, Steinbrecher UP, Powell HC, Curtiss LK: Cloning of monoclonal autoantibodies to epitopes of oxidized lipoproteins from apolipoprotein E-deficient mice. Demonstration of epitopes of oxidized low density lipoprotein in human plasma. J Invest, 1996(98): p.800-814
48. Yla-Herttuala S, Butler S, Picard S, Witztum JL, Steinberg D: Rabbit and human atherosclerotic lesions contain IgG that recognizes epitopes of oxidized LDL. Arterioscler Thromb, 1994(14): p.32-40

6 Literaturverzeichnis

49. Stemme S et al.: T lymphocyte from human arteriosclerotic plaque recognize oxidized low density lipoprotein. Proc Natl Acad Sci USA, 1995(92)9: p.3893-7
50. Dong ZM, Brown AA, Frenette PS, Hynes RO, Wagner DD: The combined role of P-and E-selectins in arteriosclerosis. J Clin Invest, 1998(102): p.145-152
51. Dong ZM, Wagner DD: Prominent role of P-selectin in the development of advanced atherosclerosis in Apo-E-deficient mice. Circulation 2000(101): p.2290-2295
52. McEver: Selectins. Curr Opin Lipidol, 1994(6): p.75-84
53. Lüscher, Pathophysiologie des Herzens. 1999: Zürich p.15-17
54. Napoli C, Mancini FP, Postiglione A, Witztum JL, Palinski W. Fatty streak formation occurs in human fetal aortas and is greatly enhanced by maternal hypercholesterolemia. J Clin Invest, 1997(100): p.2680-2690
55. Zhou X, Stemme S. Evidence for a local immune response in arteriosclerosis. Am J Pathol, 1996(149): p.359-366
56. Stemme S, Hansson GK. T lymphocyte in human arteriosclerotic plaque are memory cells expressing CD45RO and the integrin VLA-1. Arterioscler Thromb, 1992(12): p.206-211
57. Dinarella CA, Pomerantz BJ. Proinflammatory cytokines in heart disease. Blood Purif, 2001(19)3: p.314-21
58. Mosmann TR, Sad S: The expanding universe of T-cell subsets: Th1, Th2 and more. Immunol today 17: 138-146 (1996)
59. Romangnani. Lymphokine produktion by human T-cell in disease states. Annu Rev Immunologie, 1994 : p.227-257
60. Del P. Clin Invest, 1991(88): p.346

6 Literaturverzeichnis

61. Seder RA. Annu Rev Immunol., 1994(12): p.635
62. Romagnani. Immunol. Today, 1997(18): p.263
63. Zhai. Crit. Rev Immunol., 1999(19): p.155
64. Gajewski TF, Nau G, Fitch FW. Regulation of T-cell activation: Differences among T-cell subsets. Immunol Rev, 1989(111): p.543-552
65. Ramshaw AL. Immunohistochemical characterization of inflammatory cells associated with advanced atherosclerosis. Histopathology, 1990(17): p.543-552
66. US Renal Data System:USRDS 1998 annual data report. Am. j. Kidney Dis. 32 suppl.,9 (1998)
67. Ritz E, Deppisch R, Stier E, and Hansch G: Atherogenesis and cardiac death: are they related to dialysis procedure and biocompatibility? Nephrol. Dial. Transplant. 9 Suppl 2, 165 (1994)
68. Wanner C, Krane V, Marz W, et al.
Atorvastatin in patients with type 2 diabetes mellitus undergoing hemodialysis. N Engl J Med (United States), Jul 21 2005, 353(3) p238-48
69. Deppisch R, Schmitt V, Bommer J, Hänsch G, Ritz E and Rauterberg E,: Fluid phase generation of terminal complement complex as a novel index of biocompatibility. Kidney Int. 37, 696 (1990)
70. Lonnemann G, Linnenweber S, Burg M, and Koch KM,: Transfer of endogenous pyrogens across artificial membranes? Kidney Int. Suppl. 66, S43 (1998)
71. Deppisch R, Haug U, Göhl H, Ritz E: Role of proteinase/antiproteinase disequilibrium in the bioincompatibility induced by artificial surfaces. Nephrol Dial. Transplant. Suppl. 3: 17-23 (1994)

6 Literaturverzeichnis

72. Schindler R, Linneweber S, Schulze M, Oppermann M, Dinarello CA, Shaldon S, Koch KM: Gene expression of IL-1b during hemodialysis. *Kidney Int.* 43: 712-721 (1993)
73. Oppermann M, Kurts C, Zierz R, Quentin E, Weber MH, Götze O: Elevated plasma levels of the immunosuppressive complement fragment Ba in renal failure. *Kidney Int.* 40: 939-947 (1991)
74. Stier E, Deppisch R, Nawroth PP, Bierhaus A, Hänsch GM, Ritz E: Release of mediators and activation of protooncogenes in mononuclear cells is dependent of the physicochemical structures of dialyses membranes. *J Am. Soc. Nephrol.* 1:379 (1990)
75. Jahn B, Betz M, Deppisch R, Janssen O, Hänsch GM, Ritz E: Stimulation of b2-microglobulin synthesis in lymphocytes after exposure to Cuprophan dialyzer membranes. *Kidney Int.* 40: 285-290 (1991)
76. Meißner C, Deppisch R, Hug F, Schulze M, Ritz E, Ludwig H, Hänsch GM: L-Fucose residues on cellulose-based dialyse membranes: quantifikation of membrane-association L-Fucose and analysis of specific lectin binding. *Glycoconjugate J.* 12:632-638 (1995)
77. Kay NE, Raj L: Differential effects of hemodialysis membranes on human lymphocyte natural killer function. *Artif Organs* 11:165-167 (1987)
78. Deppisch R, Betz M, Hänsch GM, Rauterberg EW, Ritz E: Biocompatibility of the Polyamide membranes. *Contrib. Nephrol* 96: 26-46 (1992)
79. Mulzer SR, Brash JL: Identification of plasma proteins absorbed to hemodialyzers during clinical use. *J Biomed Mat Res* 23: 1483-1504 (1989)
80. Anderson JM, Bonfield TL, Ziats NP: Protein absorption and cellular adhesion and activation on biomedical polymers. *Int J Artif Organs* 13: 375-382 (1990)

6 Literaturverzeichnis

81. Lemke HD : Synthesis of intracellular IL-1 β and protein oxidation with cellulose acetate (CA) dialyzers reused with peracetic acid in vitro. *J Am Soc Nephrol* 5: 519 (1994)
82. Klinkmann H, Grassmann A, Vienken J: Dilemma of membran biocompatibility and reuse. *Artif Organs* 20: 426-432 (1996)
83. Henderson LW, Koch KM, Dinarello CA, Shaldon S: Hemodialysis hypotension: The interleukin hypothesis. *Blood Purif* 1: 3-8 (1983)
84. Baz M, Durand C, Ragon A, Jaber K, Andrieu D, Merzouk T, Purgus R, Olmer M, Reynier JP, Berland Y : Using ultrapure water in hemodialysis delays carpal tunnel syndrom. *Int J Artif Organs* 14: 681-685 (1991)
85. Quellhorst E, Hildebrand U, Solf A : Long-term morbidity. Hemofiltration vs. Hemodialysis. *Contrib Nephrol.* 113: 110-119 (1995)
86. Arend WP, Massoni RJ, Niemann MA, Giclas PC: Absence of induction of IL-1 production in human monocytes by complement fragments. *J Immunol.* 142: 173-178 (1989)
87. Lonnenmann G, Behme TC, Lenzner B, Floege J, Schulze M, Colton CK, Koch KM, Shaldon S: Permeability of dialyzer membranes to TNF- α -inducing substances derived from water bacteria. *Kidney Int* 42: 61-68 (1992)
88. Köhler H, Girndt M, Dumann H, Klingel R. Immundefekt bei Niereninsuffizienz. Teil II: Mechanismen des 'urämischen' Immundefekts. *Dtsch med Wschr.* 118:790-795 (1993)
89. Hörl WH. Genesis of the uraemic syndrome: role of uraemic toxins: *Wiener Klin Wochenschr*; 110:511-520 (1998)
90. Haag-Weber M, Mai B, Hörl WH. Isolation of a granulocyte inhibitory protein from uraemic patients with homology of β 2-microglobulin. *Nephrol Dial Transplant* 1994; 9:382-388.

6 Literaturverzeichnis

91. Oppermann M, Kurts C, Zierz R, Quentin E, Weber MH, Götze O. Elevated plasma levels of the immunosuppressive complement fragment Ba in renal failure. *Kidney Int* 1991; 40:939-947.
92. Zimmermann J, Herrlinger S, Pruy A, Metzger T, Wanner C. Inflammation enhances cardiovascular risk and mortality in hemodialysis patients. *Kidney Int* 1999; 55:648-658.
93. Girndt M, Sester U, Sester M, Deman E, Ulrich C, Kaul H, Köhler H: The IL-10 promoter genotype determines clinical immune function in hemodialysis patients. *Kidney Int.* 60: 2385 (2001)
94. Mullis K, Faalona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H: Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 51 Pt 1: 263-73 (1986)
95. Kruse N, Pette M, Toyka K, Rieckmann P. Quantification of cytokine mRNA expression by RT PCR in samples of previously frozen blood. *J Immunol Methods* 210: 195-203 (1997)
96. Rainen L, Oelmüller U, Jürgensen S, Wyrich R, Ballas C, Schram J et al.: Stabilisation of mRNA expression in whole blood samples. *Clin Chemie* 48 (11):1883-1890 (2002)
97. Müller S, Martin S, Koenig W, Hanifi-Moghaddam P, Rathmann W, Haastert B, et al. Impaired glucose tolerance is associated with increased serum concentrations of IL-6 and co-regulated acute-phase proteins but not TNF- α or its receptors. *Diabetologia* 2002;45:805-12
98. Hartel C, Bein G, Müller-Steinhard M, Kluter H. Ex vivo induction of cytokine mRNA expression in human blood samples. *J Immunol Methods* 249(1-2):63-71 (2001)

6 Literaturverzeichnis

99. Roccatello D, Menegatti E, Alfieri V, Rossi D, DeLuca A, Pignone E et al. Intra-dialytic cytokine gene expression. *Blood Purif* 16:30-6 (1998)
100. Riemsdijk-van Overbeeke IC, Baan CC, Hesse CJ, Loonen EH, Niesters HG, Zietse R. TNF-alpha: mRNA, plasma protein levels and soluble receptors in patients on chronic hemodialysis, on CAPD and with end-stage renal failure. *Clin Nephrol* 53(2):115-123 (2000)
101. Munford RS. Statins and the acute phase response. *N Engl J Med* 344 (26):2016-2018 (2001)
102. FÜth R, Herder C, Förster S, Müller-Scholze S, Kruse N, Rieckmann P, Heinig H, Koenig W, Scherbaum WA, Kolb H, Martin S Evaluation of diagnostic relevance of mRNA levels in peripheral blood: predictive value for mortality in hemodialysis patients. *Cytokines* 27: 166-172 (2004)

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Stephan Martin für die Überlassung des Themas. Seine Begeisterung für das Thema, seine Geduld und schier unermüdlicher Enthusiasmus haben in einem ganz erheblichen Maß zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Desweiteren danke ich dem gesamten Team der „Immunologie“ am Deutschen Diabetes Zentrum. Sie alle waren mir eine unermüdliche Unterstützung in der Versuchsdurchführung, der Datenanalyse sowie in Fragen der komplizierten Laborlogistik. Ohne Euch wäre meine Freude an der Wissenschaft nie geweckt worden.

Der größte Dank gilt aber meinen Eltern und meiner Schwester. Ohne Ihre ausdauernde und vielseitige Unterstützung wäre die Umsetzung meiner Promotion und meines Studiums nicht möglich gewesen. Besonders bei Ihnen möchte ich mich von ganzem Herzen für alles das bedanken, was Sie in der Vergangenheit, der Gegenwart und der Zukunft für mich geleistet haben und noch weiterhin leisten werden.

Meinen Freunden Olaf Cordt und Mark Lankisch danke ich für die geleistete Korrekturarbeit, das geduldige Zuhören und die immer notwendige menschliche Ablenkung.

Lebenslauf

PERSÖNLICHE DATEN

- | | |
|-----------------------|------------------------------|
| ▪ Name | Füth |
| ▪ Vorname | Reiner |
| ▪ Geburtsdatum/-ort | 27.05.1970 in Hilden (Rhld.) |
| ▪ Familienstand | ledig |
| ▪ Staatsangehörigkeit | deutsch |
| ▪ Konfession | römisch-katholisch |

SCHULAUSBILDUNG

- | | |
|-----------------------------|--|
| ▪ August 1977 bis Juli 1981 | Kath. Grundschule Langenfeld |
| ▪ August 1981 bis Juni 1983 | Konrad-Adenauer-Gymnasium in Langenfeld |
| ▪ August 1983 bis Juni 1991 | Landrat-Lukas-Gymnasium in Leverkusen-Opladen |

WEHR-/ERSATZDIENST

- | | |
|--------------------------------|--|
| ▪ September 1991 bis Juli 1992 | Freiwilliges Soziales Jahr im Klinikum Leverkusen |
|--------------------------------|--|

HOCHSCHULAUFBILDUNG

- | | |
|----------------------------------|---|
| ▪ September 1992 bis August 1994 | Studium der Humanmedizin an der Semmelweis Universität zu Budapest |
| ▪ September 1994 bis März 1999 | Studium der Humanmedizin an der Heinrich-Heine Universität zu Düsseldorf. |

PRAKTISCHES JAHR

- | | |
|----------------------------|--|
| ▪ April 1998 bis März 1999 | I.Tertial: Abteilung für Pädiatrie II.Tertial: Abteilung für Chirurgie III.Tertial: Medizinische Klinik Städt. Kliniken Krefeld |
|----------------------------|--|

ARZT IM PRAKTIKUM

- | | |
|-------------------------------|---|
| ▪ Juli 1999 bis Dezember 2000 | Deutsches Diabetes Forschungs- institut in Düsseldorf. |
|-------------------------------|---|

Direktor: Prof. Dr. W. Scherbaum

ASSISTENTSARZTZEIT

- Januar 2001 bis April 2002
Deutsches Diabetes Forschungs-
institut in Düsseldorf.
Direktor: Prof. Dr. W. Scherbaum

- Mai 2002 bis April 2006
Herzentrum Wuppertal
Abteilung für Kardiologie
Direktor: Prof. Dr. H. Gülker

FACHARZT FÜR INNERE MEDIZIN

- seit April 2006
Herzentrum Wuppertal
Abteilung für Kardiologie
Direktor: Prof. Dr. H. Gülker