

Aus dem Universitätsklinikum Münster
Medizinische Klinik und Poliklinik D
Direktor: Univ.-Prof. Dr. K.-H. Rahn

**Untersuchung zur Expression des Hitze-Schock Proteins 70 in
Monozyten bei Patienten mit terminaler Niereninsuffizienz**

INAUGURAL-DISSERTATION

Zur

Erlangung des doctor medicinae

der Medizinischen Fakultät

der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

Vorgelegt von Philip Bangen

Aus Hiltrup jetzt Münster

2003

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

Dekan: Univ.-Prof. Dr. H. Jürgens

1. Berichterstatter: Prof. Dr. S. Heidenreich

2. Berichterstatter: Prof. Dr. K. Kisters

Tag der mündlichen Prüfung: 07.08.2003

Aus dem Universitätsklinikum Münster
Medizinische Klinik und Poliklinik D
Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. K.-H. Rahn
Referent: Prof. Dr. med. S. Heidenreich
Koreferent: Prof. Dr. K. Kisters

ZUSAMMENFASSUNG

Untersuchung zur Expression des Hitze-Schock Proteins 70 in Monozyten
bei Patienten mit terminaler Niereninsuffizienz

Philip Bangen

Es ist bekannt, dass terminal niereninsuffiziente Patienten im Verlauf der Dialyse ein erhöhtes Risiko von Infektionen haben. Nach kardiovaskulären Komplikationen sind die Infektionen die häufigste Todesursache.

In dieser Studie wurden Monozyten als wichtige Vertreter des Immunsystems des Menschen untersucht. Es erfolgte ein Vergleich von dialysepflichtigen Patienten mit einem gesunden Kontrollkollektiv. Hitze-Schock Proteine (Hsp) spielen bei der Faltung von Proteinen, der Antigenpräsentation, der Abwehr oxidierender Substanzen und Immunregulation eine herausragende Rolle. Sie können die Lebenszeit von Monozyten verändern und so die Immunantwort verändern. Eines der wichtigsten Hitze-Schock-Proteine ist Hsp70. Hsp70 Proteine sind eine ubiquitär vorkommende Klasse von molekularen Chaperonen, die unter Stressfaktoren vermehrt zellulär exprimiert werden. Mittels FACS-Analyse und Western Blot wurde Hsp70 in den Zellen gemessen. Eine Induktion von Hsp 70 erfolgte mittels Hitze, indem die Zellen für 40 Minuten einer Temperatur von 47°C ausgesetzt wurden.

Dabei zeigte sich, dass die Zellen der Patienten nicht in der Lage waren auf einen zusätzlich auftretenden Stress mit einem adäquaten Anstieg der hsp70-Expression zu antworten. Während bei der Kontrollgruppe 88,1% der Monozyten hsp70 positiv waren, fanden sich bei den Patienten nur 63,5% hsp70 positiv Zellen.

Um zu untersuchen, auf welcher Ebene sich die Unterschiede finden, wurde die hsp70-Expression durch Actinomycin D, Cycloheximid und SB203580 inhibiert.

Bei Actinomycin D und Cycloheximid zeigte sich kein Unterschied in der Hemmung der hsp70-Expression bei Kontrolle und Patient.

Signifikante Unterschiede wurde bei der kinasespezifischen Hemmung der p38MapKinase durch SB203580 gefunden. Während bei den Kontrollmonozyten nur noch 26,4% der Zellen hsp70 positiv waren, zeigten sich bei den Patienten 44,3% hsp70 positive Zellen.

Dieser signifikante Unterschied deutet auf eine verschiedene Regulation der hsp70-Antwort auf der Ebene der Kinasen bei Kontrolle und Patient.

Durch diese Studie ergeben sich Hinweise, dass die hohe Infektionsneigung der chronisch niereninsuffizienten Patienten auch auf die mangelnde Induzierbarkeit der hsp70-Proteinexpression zurückzuführen sein kann. Dies kann zu einem verkürzten Überleben der Monozyten führen.

Termin der mündlichen Prüfung: 07.08.2003

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Die chronische Niereninsuffizienz und Dialyse	1
1.2	Die Monozyten	14
1.3	Hitze-Schock-Proteine (Hsp)	18
1.4	Zielsetzung dieser Arbeit	21
2	Material	22
2.1	Kulturmedium	22
2.2	Puffer	22
2.3	Reagentien und Antikörper	23
2.3.1	allgemeine Reagenzien	23
2.3.2	Reagenzien und Antikörper für Western Blot	24
2.3.3	Reagenzien und Antikörper für FACS	25
2.4	Stimulantien	25
2.5	Geräte	25
3	Methoden	28
3.1	Präparation der Monozyten	28
3.1.1	Ficoll-Dichtezentrifugation	28
3.1.2	Stimulieren der Zellen	30
3.1.3	Abnehmen der Zellen	31
3.2	Durchflusszytometrische Messverfahren (FACS)	32
3.2.1	Prinzip des FACS	32
3.2.2	Färben der Zellen	33
3.2.3	Vorgang der Messung	34
3.2.4	Auswertung der Messergebnisse	35
3.3	Western Blot	36
3.3.1	Zellen lysieren	36
3.3.2	Proteinmessung	36
3.3.3	Gelelektrophorese	37
3.3.4	Der Blot	39
3.3.5	Proteinmarkierung und Antigendetektion	40
3.3.6	Anfärbungsreaktion	41

3.4	Patienten und Kontrollen	42
3.5	Statistische Methoden	42
4	Ergebnisse	43
4.1	Zeitkinetiken und Konzentrationsabhängigkeiten	43
4.1.1	Die hsp70-Expression basal und nach Erhitzung	43
4.1.2	Die Temperatur und Zeitabhängigkeit hsp70-Expression	45
4.1.3	Die Zeitabhängigkeit der hsp70-Expression bei SB203580- Behandlung	47
4.1.4	Die Konzentrationsabhängigkeit der hsp70-Expression bei Behandlung mit SB203580	48
4.1.5	Die Zeitabhängigkeit der hsp70-Expression bei Actinomycin D - Behandlung	49
4.1.6	Die Konzentrationsabhängigkeit der hsp70-Expression bei Behandlung mit Actinomycin D	50
4.1.7	Die Zeitabhängigkeit der hsp70-Expression bei Cycloheximid - Behandlung	51
4.1.8	Die Konzentrationsabhängigkeit der hsp70-Expression bei Behandlung mit Cycloheximid	52
4.2	Basale Werte	54
4.2.1	Die basale hsp70-Expression beim Patienten vor und nach der Dialyse	54
4.2.2	Die hsp70-Expression beim Gesunden und Patienten vor und nach der Dialyse: Hitzestimulation und Hitzestimulation mit SB203580-Behandlung.	55
4.2.3	Die basale hsp70-Expression beim Gesunden und Patienten direkt nach Abnahme der Zellen und nach Präparation	56
4.3	Regulation der hsp70-Expression beim Patienten und Gesunden nach Stimulation	57
4.3.1	Die hsp70-Expression nach Erhitzung	57
4.3.2	Die hsp70-Expression nach Erhitzung und der Effekt von SB203580	59
4.3.3	Die hsp70-Expression und der Effekt von Actinomycin D	64
4.3.4	Die hsp70-Expression und der Effekt von Cycloheximid	65

5	Diskussion	66
5.1	Die basale Expression von hsp70	66
5.1.1	Der Einfluss der Dialyse auf die basale hsp70-Expression	67
5.1.2	Der Einfluss der Zellpräparation auf die basale hsp70-Expression	68
5.2	Induzierbarkeit der hsp70-Expression	68
5.2.1	Induzierbarkeit unter Hitze	68
5.2.2	Der Einfluss der Dialyse auf die Induktions der hsp70-Expression	70
5.3	Hemmung der Induktion durch Cycloheximid, Actinomycin D und SB 203580	70
5.3.1	Cycloheximid	70
5.3.2	Actinomycin D	71
5.3.3	SB203580	71
5.4	Zusammenfassung	74
5.5	Ausblick	75
6	Literaturverzeichnis	76
7	Lebenslauf	95

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Anteile der jeweiligen Dialyseverfahren [51]	2
Abbildung 2: Diagnoseverteilung bei Therapiebeginn [51]	2
Abbildung 3: Ein Monozyt - mikroskopische Ansicht	14
Abbildung 4: Ein Monozyt - elektronenmikroskopische Aufnahme	15
Abbildung 5: Hsp70 Induktion [84]	19
Abbildung 6: Ficoll-Dichtezentrifugation - Auftrennung der Blutbestandteile	29
Abbildung 7: Prinzip der FACS	33
Abbildung 8: Ergebnisdarstellung im Dotplot	34
Abbildung 9: Histogrammische Darstellung der Ergebnisse	35
Abbildung 10: SDS-Broad-Range-Standard	38
Abbildung 11: Novex NuPage XCell MiniCell	38
Abbildung 12: Novex NuPage BlotModule	39
Abbildung 13: Zeitkinetik basal und nach Hitze	44
Abbildung 14: Abhängigkeit der hsp70-Expression von der Dauer	45
Abbildung 15: Abhängigkeit der hsp70-Expression von der Temperatur	46
Abbildung 16: Zeitkinetik SB203580	47
Abbildung 17: Konzentrationsabhängigkeit SB203580	48
Abbildung 18: Zeitkinetik Actinomycin D	50
Abbildung 19: Konzentrationsabhängigkeit Actinomycin D	51
Abbildung 20: Zeitkinetik Cycloheximid	52
Abbildung 21: Konzentrationsabhängigkeit Cycloheximid	53
Abbildung 22: hsp70-Expression vor und nach der Dialyse basal	54
Abbildung 23: hsp70-Expression vor und nach Dialyse nach Hitze und SB203580	55
Abbildung 24: Expression vor und nach Adhärenz	56
Abbildung 25: Expression beim Patienten und Kontrolle nach Hitze stimulation	57
Abbildung 26: Vergleich Patient Kontrolle bei SB203580-Behandlung	59
Abbildung 27: FACS-Analyse der hsp70-Expression beim Patienten und der Kontrolle basal, Hitze, SB203580, Dotplot-Darstellung.	60

Abbildung 28: FACS-Analyse der hsp70-Expression beim Patienten und der Kontrolle basal, Hitze, SB203580, Histogramm	61
Abbildung 29: Hsp70-Expression beim Gesunden und Patienten (exemplarischer Western Blot) basal, Hitze, SB203580	62
Abbildung 30: Vergleich Patient mit Kontrolle basal, Hitze, Hitze+SB203580. Western Blot.	63
Abbildung 31: Vergleich Patient Kontrolle bei Actinomycin D-Behandlung	64
Abbildung 32: Vergleich Patient / Kontrolle bei Cycloheximid-Behandlung	65

1 Einleitung

1.1 Die chronische Niereninsuffizienz und Dialyse

Die chronische Niereninsuffizienz ist Folge einer dauernden Verminderung der glomerulären, tubulären und endokrinen Funktion beider Nieren.

Die Abnahme der physiologischen Aufgaben der Nieren ist verbunden mit einer

- verminderten Exkretion von Stoffwechselabbauprodukten,
- gestörter Ausscheidung von Elektrolyten und Wasser, die mit der Nahrung zugeführt oder im Stoffwechsel freigesetzt werden,
- beeinträchtigter Sekretion von Hormonen wie Erythropoetin, Renin, der aktiven Form des Vitamin D und Prostaglandinen.

Die eingeschränkte glomeruläre Filtrationsrate ist erkennbar an einer Verminderung der Kreatinin-Clearance oder im weiter fortgeschrittenen Stadium am Anstieg des Serum-Kreatinins.

Die tubuläre Funktionseinbuße äußert sich in einer verminderten Exkretion von H^+ und K^+ , auf welche die urämische metabolische Azidose und später die Hyperkaliämie zurückzuführen sind [86]. Im weiteren Verlauf führt die chronische Niereninsuffizienz zur Dialysepflicht.

Aus dem Bericht der „Qualitätssicherung Niere (Quasi Niere)“ [51], der jährlich die Versorgung der Patienten mit Nierenersatzverfahren beobachtet und analysiert, geht hervor, dass in Deutschland im Jahr 1998 ca. 63.000 Patienten sich in chronischer Nierenersatztherapie befanden, was einer Prävalenz von 764 pro Mio. Einwohner entspricht. Die Gesamtzahl der Dialysepatienten beträgt etwa 48.000. Dies ist eine Prävalenz von 585 pro Mio. Einwohner in Deutschland. 12.000 Neuaufnahmen gab es 1998 in der BRD, was eine Inzidenz von 148 pro Mio. Einwohner ist. 8.200 Patienten versterben pro Jahr.

Der Anteil der Hämodialyse (HD) an den Nierenersatzverfahren beträgt 80%, im Vorjahr betrug er noch 82%. 12% (vorher 10%) Hämodiafiltration (HDF), 2% Hämofiltration (HF), CCPD (continuous cyclic peritoneal dialysis) 2%, IPD (intermittend peritoneal dialysis) >1%, CAPD (continuous ambulatory peritoneal dialysis) 4% [51].

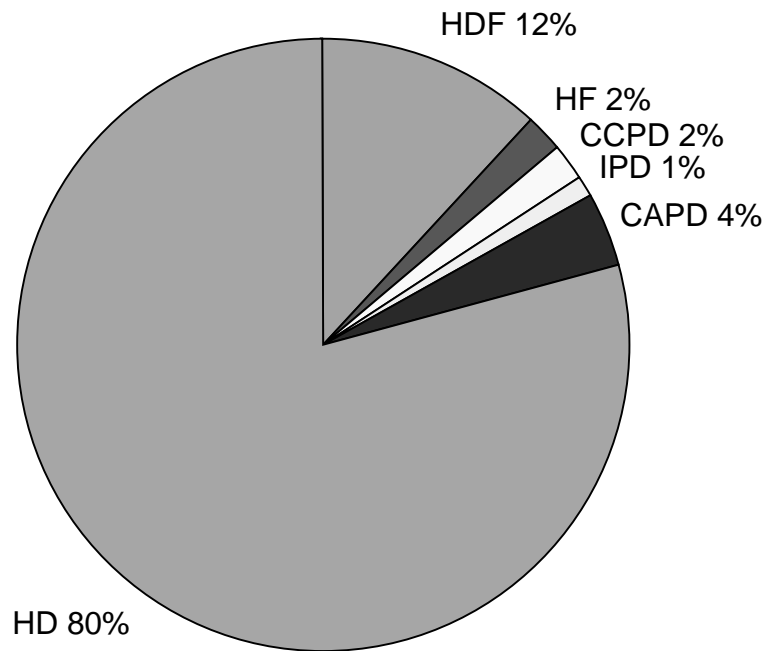


Abbildung 1: Anteile der jeweiligen Dialyseverfahren [51]

Zahlreiche erworbene und angeborene Nierenerkrankungen münden in die chronische Niereninsuffizienz.

Die folgende Abbildung zeigt die zur Dialysepflichtigkeit führenden Grunderkrankungen [51].

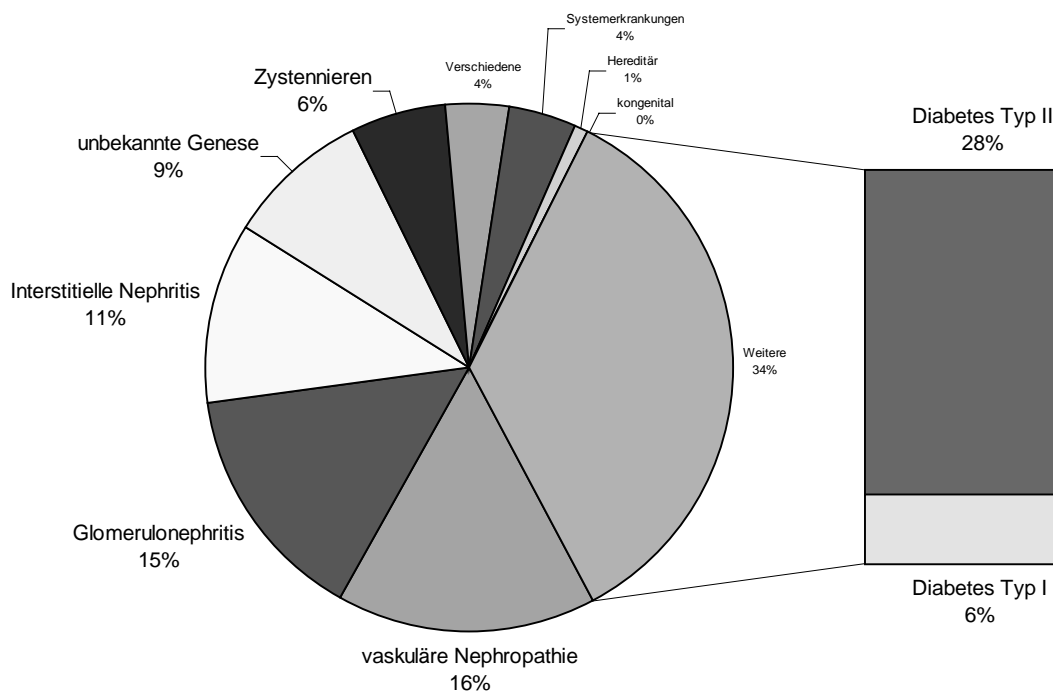


Abbildung 2: Diagnoseverteilung bei Therapiebeginn [51]

In den letzten Jahren scheint der Anteil von Patienten mit diabetischer Nephropathie am Gesamtkollektiv der Dialysepatienten erheblich gestiegen zu sein [129;151] .

Am häufigsten führen gegenwärtig folgende Nierenerkrankungen zur terminalen Niereninsuffizienz:

- Primäre und sekundäre (vor allem die diabetische) Nephropathie
- Chronische tubulointerstitielle Erkrankungen (z.B. Analgetikanephropathie)
- Vaskuläre Nephropathien (nach Hypertonie)
- Kongenitale Zystennieren.

Diese Erkrankungen führen zur Urämie, der Retention oder verminderten Exkretion von Urämietoxinen. Letztere sind chemisch nicht alle eindeutig identifizierbar. Vor allem die Toxine mittleren oder kleinen Molekulargewichts werden für die urämischen Symptome verantwortlich gemacht [69] .

Die wichtigsten zur Zeit in der Diskussion stehenden Urämietoxine [126] sind:

- Cyanat und Isocyanat
- AGE (advanced glycosilation end-products)
- Granulozyteninhibierende Proteine (GIP I und II)
- Degranulationsinhibierende Proteine (DIP)
- Indoxylsulfat
- Guanididerivate
- Polyamine
- Phenole
- Arylat
- Oxalat
- Parathormon (PTH)

Die Beobachtung, dass die Dialyse die Symptome verbessert gibt einen indirekten Hinweis auf die Bedeutung der Toxine, sowie auch die Tatsache, dass Serum urämischer Patienten in vitro Zellen in ihrer Funktion schädigt oder hemmt.

Klinische Auswirkungen bei Urämie haben besonders die verminderte Erythropoetinsekretion, die gestörte Hydroxylierung des Vitamins D und die vermehrte Reninsekretion (über Angiotensin den Blutdruck steigernd).

Die chronische Niereninsuffizienz wird in vier Stadien eingeteilt [66] :

Stadium I: Kompensiertes Dauerstadium:

Leichte Einschränkung der Kreatinin-Clearance und der Konzentrationsfähigkeit, normale Retentionsparameter.

Stadium II: Kompensierte Retention:

(Azotämie) Kreatininerhöhung auf bis zu 6mg/dl, keine klinischen Urämiesymptome.

Stadium III: Präterminale Niereninsuffizienz:

Kreatininerhöhung >6mg/dl, ab 8mg/dl treten urämische Syndrome auf. Man spricht von dekompensierter Retention.

Stadium IV: Terminale Niereninsuffizienz:

(Urämie) Kreatininerhöhung >10mg/dl, Fortschreiten der urämischen Erscheinungen. Behandlung durch Dialyse oder Transplantation erforderlich.

Bei leicht eingeschränkter Nierenfunktion sind die Patienten häufig symptomlos oder klagen über uncharakteristische Beschwerden wie Leistungsschwäche und Müdigkeit. Häufig wird die Niereninsuffizienz durch zufälliges Feststellen eines pathologischen Urinbefundes (Serumkreatinin) oder in Rahmen einer Hypertonie- oder Anämieabklärung erstmals diagnostiziert.

Mit fortschreitender Niereninsuffizienz treten zunehmende Beschwerden wie Appetitlosigkeit, Juckreiz, gastrointestinale und neuromuskuläre Symptome und Knochenschmerzen auf.

Die bei nahezu allen Patienten auftretende renale Anämie ist heute gut zu behandeln. Bei einem Serumkreatininanstieg auf 3-4mg/dl entwickeln die Patienten eine normochrome, normozytäre Anämie. Trotz ausgeprägter Anämie sind einige Patienten erstaunlich beschwerdefrei. Dies ist zurückzuführen auf die langsame Entwicklung der Anämie und eine Verschiebung der Sauerstoff-Bindekurve nach rechts (durch die sich bei der Niereninsuffizienz entwickelnde metabolischen Azidose und die Anhäufung von Diphosphoglycerat in den Erythrozyten) mit Erleichterung der Sauerstoffabgabe an das Gewebe.

Zu der Anämie tragen die verkürzte Lebenszeit der Erythrozyten, die mangelnde Bildung von Erythropoetin und der durch die urämische Blutungsneigung [39;122;133] gesteigerte Blutverlust bei [159] .

Die mangelnde Bildung von Erythropoetin wird heute mit rekombinantem humanem Erythropoetin behandelt, was sich in vielen Studien sowie im Alltag als sehr gute Therapiemöglichkeit erwiesen hat [93] .

Winearls und Mitarbeiter [159] und Eschbach und Mitarbeiter [41] konnten zeigen, dass eine Korrektur der renalen Anämie durch Erythropoetin möglich war. Die Studien zeigten, dass durch Erythropoetin die Anämie korrigiert wird, der Transfusionsbedarf (und damit das Infektionsrisiko) zurückgeht, die Gefahr der Sensibilisierung durch Blutübertragungen mit Bildung zytotoxischer Antikörper beseitigt wird, eine Reihe von Symptomen sich bessert (u.a. Juckreiz, sexuelle Dysfunktion) und somit die Lebensqualität der Patienten deutlich gesteigert wird.

Bei akuter und chronischer Niereninsuffizienz ist die Blutungszeit verlängert. Diese urämische Blutungsneigung manifestiert sich häufig in Form von Epistaxis, Ekchymosen, Zahnfleischbluten seltener als gastrointestinale Blutungen, Menorrhagien oder lebensbedrohlichen intraperitonealen Blutungen, Hämoperikard oder Subduralhämatomen [39;122] .

Ursache der gesteigerten Blutungsneigung ist die gestörte Thrombozytenfunktion [53] , die gesteigerte vaskuläre Prostglandinfreisetzung und die veränderten Strömungsbedingungen durch die renale Anämie.

Nach Anstieg des Hämatokrits auf Werte um 30% normalisiert sich laut Moia und Mitarbeiter [106] sowie Huraib und Mitarbeiter [71] und Vigano und Mitarbeiter [156] die Blutungszeit.

Der Natriumhaushalt ist zu Beginn der Niereninsuffizienz durch die vermehrte Ausscheidung von Natrium pro intaktem Nephron ausgeglichen. Erst bei weiterem Abfall der glomerulären Filtrationsrate ist die Adaptionfähigkeit der Niere beeinträchtigt. Ödeme, Gewichtszunahme und renale Hypertonie sind die durch die positive Natriumbilanz hervor gerufenen klinischen Symptome.

Lange Zeit ist die Niere in der Lage, das anfallende Kalium durch vermehrte Sekretion pro Einzelnephron, Umverteilung des extrazellulären Kalium in die Zellen [134] und glucoseabhängige, insulinstimulierte zelluläre Kaliumaufnahme [3] zu kompensieren.

Erst bei terminaler Niereninsuffizienz ist mit dem Auftreten von Hyperkaliämie zu rechnen. Dazu führt unter anderem eine vermehrte Zufuhr an Kalium, eine verminderte Sekretion (Oligurie, Natriumrestriktion, kaliumsparende Diuretika, ACE-Hemmer, nichtsteroidale Antirheumatika) und die Verteilungsstörung zwischen Intra- und

Extrazellulärraum (bei metabolischer Azidose, kataboler Stoffwechsellage, sowie bei Infektionen und Steroidmedikation, schwerer Hämolyse oder Rhabdomyolyse).

Die Fähigkeit der Niere, den im Proteinstoffwechsel anfallenden Wasserstoff (H^+) zu eliminieren ist bei Niereninsuffizienz gesenkt. Diese überschüssigen H^+ -Ionen tragen zu einer metabolischen Azidose bei, die sich häufig aber erst ab einer glomerulären Filtrationsrate von weniger als 20% der Norm entwickelt. Mögliche Folgen sind:

- Kalziumfreisetzung aus dem Knochen (Osteopathie)
- Gastrointestinale Beschwerden wie Übelkeit und Erbrechen
- Hyperkaliämieneigung
- Subjektives Empfinden der Dyspnoe (respiratorische Kompensation der metabolischen Azidose)
- Zunahme des Eiweisskatabolismus
- Dekompensation mit lebensbedrohlichen Zuständen

Die anfängliche Azidose kann durch Blutpuffer abgefangen werden, sind diese aber gesättigt, entsteht die manifeste Azidose.

Weitere Folgen sind eine Erhöhung des Harnstoffs, des organischen Phosphates, der Harnsäure und des Magnesiums im Serum des Patienten.

Patienten mit fortgeschrittener Niereninsuffizienz und vor allem dialysepflichtige Patienten entwickeln zu einem hohen Prozentsatz kardiovaskuläre Komplikationen: urämische Perikarditis, koronare Herzerkrankung, Herzinsuffizienz, Lungenödem, akzelerierte Arteriosklerose der peripheren Gefäße, renale Hypertonie.

Die urämische Perikarditis und Pleuritis sind typischerweise Komplikationen, bei fortgeschrittener Niereninsuffizienz. Ursächlich sind hier die Urämietoxine, der sekundäre Hyperparathyreoidismus und immunologische Faktoren mit zunehmender hämodynamischer Instabilität des Patienten.

Die häufigste Todesursache sind kardiovaskuläre Komplikationen, an zweiter Stelle stehen Infektionen – zum größten Teil verursacht durch *Staphylococcus aureus* und *Staphylococcus epidermidis*.

Koronare Herzkrankheit und Herzinsuffizienz sind, wie oben beschrieben, für einen Grossteil der Todesfälle unter Dialysepflichtigen verantwortlich [30]. 15% der Todesfälle sind Myokardinfarkte. Die Risikofaktoren für terminal niereninsuffiziente Patienten sind die Hypertonie, Fettstoffwechselstörungen, renale Anämie, myokardiale

Dysfunktion [131] , linksventrikuläre Hypertrophie [59] , erhöhter Plasmahomocysteinspiegel [9;147] , Urämietoxine und nicht biokompatible Dialysemembranen.

Ursache für die Herzinsuffizienz sind vorzeitige Koronarsklerose, die Druckbelastung des linken Ventrikels durch die renale Hypertonie und die erhöhte kardiovaskuläre Belastung durch Anlage einer arteriovenösen Fistel zur Hämodialyse [59] . Dieses fördert auch das Auftreten von Lungenödemen.

Langzeitdialysebehandelte haben eine akzelerierte Arteriosklerose [98] aller Gefäßregionen mit claudicatio intermittens, Aortenaneurysmata, zerebralen Durchblutungsstörungen und koronarer Herzkrankheit (KHK)

Auch im Nervensystem der Niereninsuffizienten kommt es zu Veränderungen [50;62;123;124] . Die urämische Polyneuropathie ist durch einen segmentalen Myelinverlust und eine Axondegeneration der peripheren Nerven gekennzeichnet. Beschuldigt hierfür werden die Urämietoxine und der sekundäre Hyperparathyreoidismus [101] . Vor allem distal treten sensomotorische Neuropathien auf, vorwiegend an den unteren Extremitäten mit abgeschwächten Reflexen, gestörtem Vibrationsempfinden, restless legs und burning-feet-syndrome. Muskelatrophie und Lähmungen können die Folge sein. Vor allem bei Diabetikern mit chronischer Niereninsuffizienz wird der Befall des autonomen Nervensystems beobachtet.

Die Symptome der urämischen Enzephalopathie [100] reichen im Frühstadium von Konzentrationsschwierigkeiten und Schlaflosigkeit bis zu Krampfanfällen und Koma im Endstadium. Sie soll auch Folge des sekundären Hyperparathyreoidismus sein. Charakteristisch ist ein Auftreten der Symptome erst bei Kreatininwerten ab 5mg/dl. Die Beschwerden sind unter adäquater Dialysetherapie reversibel.

Ein weiteres häufiges Symptom der terminalen Niereninsuffizienz [128] ist die generalisierte Muskelschwäche bei vorwiegendem Befall der proximalen Muskelgruppen.

Vitamin D-Mangel, der sekundäre Hyperparathyreoidismus, Elektrolytverteilungsstörungen und Mangelernährung sind an der Pathogenese beteiligt. Häufig werden schwere urämische Myopathien mit renaler Osteopathie angetroffen.

Für viele Dialysepatienten ist der Pruritus ein grosses Problem [105;118] . 80% der terminal Niereninsuffizienten leiden unter Juckreiz unterschiedlichen Schweregrades. Etwa die Hälfte der Betroffenen klagt über einen generalisierten Juckreiz, andere vor allem über Pruritus an Shuntarm, Gesicht und Rücken.

Besonders Parathormon und Histamin sollen für den Juckreiz verantwortlich sein [18]. Bei Niereninsuffizienz wird Histamin akkumuliert und könnte hauptverantwortlich für das Jucken sein. Eine andere kontrovers diskutierte Theorie ist die der möglichen Rezeptorproliferation der juckreizvermittelnden Zellen (μ -Rezeptoren) [5;111].

Eine gute und effektive Dialyse ist ein bedeutender therapeutischer Ansatz zur deutlichen Minderung des Juckreizes [67].

Urochrome und der erhöhte Plasmacarotinspiegel lassen die Haut des Niereninsuffizienten an den lichtexponierten Stellen abnorm braun aussehen (Melanose). Auch wird eine vermehrte Melaninbildung angenommen [11].

Ein weiteres grosses Thema der Komplikationen bei der Niereninsuffizienz ist die renale Osteopathie [70].

In der Frühphase der Niereninsuffizienz sind die Patienten von Seiten des Skelettsystems praktisch immer beschwerdefrei, die Symptome der renalen Osteopathie entwickeln sich erst nach länger dauernder Dialysebehandlung.

Es werden drei Krankheitsentitäten unterschieden: die Ostitis fibrosa, die Osteomalazie, (low-turnover Osteopathie) und aplastische Knochenerkrankungen (dead-bone disease).

Wichtigste pathogenetische Faktoren bei der Entwicklung der renalen Osteopathie sind (nach [37]):

- Gestörter Vitamin D-Metabolismus
- Über- oder Unterproduktion von PTH
- Erhöhte Serumphosphatkonzentrationen
- Ossäre Aluminiumablagerungen infolge Verabreichung von aluminiumhaltigen Phosphatbindern oder Kontakt zu aluminiumhaltigem Dialysat.

Grunderkrankungen wie chronische Polyarthrit oder Wegner-Granulomatose begünstigen das Auftreten von Gelenkbeschwerden genauso wie Kristallablagerungen in den periartikulären Strukturen. Diese Gelenkerkrankungen [68] befallen vor allem das Schulter und Hüftgelenk des Langzeithämodialysierten.

Nach 5-10 Jahren kommt es zusätzlich durch unter anderem unzureichende renale Metabolisierung bzw. Exkretion von β 2-Mikroglobulin zur Entwicklung einer Dialyse assoziierten Amyloidose mit zystischen Knochenveränderungen und degenerativer Arthropathie [42;85].

Nach 12-jähriger Hämodialysebehandlung entwickeln ca. 50% der Patienten eine Amyloidose, nach 20 Jahren Dialyse sind fast 100% der Niereninsuffizienten betroffen.

Klinisch manifestiert sich die dialyseassoziierten Amyloidose als:

- Karpaltunnelsyndrom (am häufigsten) [78]
- Schulter-Arm-Syndrom
- Destruktive Arthropathie mit Ergussbildung
- Spondylarthropathie
- Knochenzystenbildung mit Frakturneigung
- Kolonamyloidose

Einzig erfolgreiche Therapie sind die effiziente Dialyse oder im besten Fall die Nierentransplantation, unter der die Symptome verschwinden.

Zahlreiche Symptome treten von Seiten des Gastrointestinaltraktes auf: Die Patienten haben den für Urämiker typischen foetor uraemicus (durch Abbau von Ammoniak und Harnstoff im Speichel), klagen über Erbrechen und Sodbrennen, neigen zu Obstipation (durch Phosphatbindereinnahme) und haben gastrointestinalen Blutungen.

Bei terminal Niereninsuffizienten und unter Dialysebehandlung treten Infektionen bakteriellen und viralen Ursprungs gehäuft auf (70% durch Staphylococcus aureus). Diese beeinträchtigen das Überleben der Patienten massiv [12;15;45] . Nach den kardiovaskulären Komplikationen sind die Infektionen mit 12%-22% die häufigsten Todesursachen [120] und gehören zu den häufigsten Gründen für eine stationäre Aufnahme des Patienten sowie die Verlängerung der Hospitalisationsdauer.

44% aller Patienten mit Staphylococcus-aurerius-Infektionen (dem häufigsten Erreger von Bakteriämien) haben ernsthafte Komplikationen wie Osteomyelitiden oder Endokarditiden [102] .

Die Urämie ist ein Grund für die Immundefizienz [152;153] . Mangelernährung, Alter, Diabetes, sowie die Unterbrechung der dermalen Schutzfunktion durch die häufig nötig gewordenen venösen Zugänge für die Durchführung der Dialyse [20;34;79] erhöhen das Risiko für Infektionen zusätzlich [32] .

Die Art der Infektion hängt auch von der Wahl des Zugangs, Mehrfachverwendung von Dialysat oder der Auswahl der Dialysemembran ab [44;47;57;64] .

Die erhöhte Infektionsrate mit Gram negativen Keimen lässt sich durch eine mögliche Kontamination der Dialysemaschinen erklären [1] .

Die Immunkompetenz der Dialysepflichtigen ist gestört oder beeinträchtigt. [87;88;154] Einerseits ist dies auf das urämische Milieu, andererseits auf die therapeutische Interventionen (Hämodialyse, Eisenüberladung) zurückzuführen. Die zelluläre und

humorale Abwehr ist geschwächt, was sich in einer mangelnden Antikörperbildung (z.B. nach Impfungen), einer eingeschränkten Interferonproduktion, verzögertem Erscheinen der Leukozyten am Entzündungsort, gestörter Phagozytose von Monozyten und einer eingeschränkten Makrophagen-FC-Rezeptorfunktion zeigt [154] .

Die Niereninsuffizienten haben in 70-80% der Fälle eine Störung des Lipid- und Kohlenhydratstoffwechsels mit nachfolgender Insulinresistenz bzw. Hypertriglyceridämie mit daraus resultierender gesteigerter Arteriosklerose.

Zur Therapie der chronischen Niereninsuffizienz stehen heutzutage mehrere Verfahren zur Auswahl.

Die Hämodialyse ist die am weitesten verbreitete Nierenersatztherapie (80% Anteil an den Dialyseverfahren 1998 [51]).

1812 entdeckte Nicolaus Wolfgang Fischer (1782-1850), ein deutscher Arzt und Chemiker, die Hydrodiffusion durch organische Scheidewände. Er erkannte als erster den Einfluss, den die Beschaffenheit der Membran, die chemische Affinität und die Konzentration der Lösung auf die Hydrodiffusion hatte. Im Jahr 1854 wurde der Ausdruck „Dialyse“ von Thomas Graham (1805-1869) erstmals erwähnt. Er war der Erste, der verschiedene Gifte nicht nur aus Lösungen sondern auch aus defibriniertem Blut mittels verschiedener Membranen herausfilterte.

Die extrakorporale Hämodialyse geht auf John J. Abel zurück. Als Membranmaterial benutzte er Kollodium und aus Blutegelköpfen gewonnenes Hirudin zur Antikoagulation des Blutes. Seine „künstliche Niere“ waren von Kochsalzlösung umschlossene Kollodiumröhren. Das Blut eines Kaninchens wurde somit dialysiert.

1926 benutzten Lim und Necheles erstmals Heparin (zunächst als Antithrombin bezeichnet) in ihren Dialyseversuchen.

Der Durchbruch zur Entwicklung leistungsfähiger Dialysatoren gelang 1937, als Wilhelm Thalhimer das Zellophan als semipermeable Membran entdeckte.

Am 11.September 1945 geschah es das erste Mal in der Geschichte der Entwicklung der künstlichen Niere, dass ein Patient durch eine Dialyse ein akutes Nierenversagen überlebte: Dr. Wilhelm Kolff aus Groningen dialysierte die 68jährige Sophia Schafstadt bis ihre eigene Nierenfunktion wieder einsetzte.

Die erste erfolgreiche und klinisch effektive Dialyse in Deutschland wurde am 8.März 1950 von Dr. Curt Moeller durchgeführt. Er hatte das Prinzip des Gegenstroms verwirklicht.

Ein ungelöstes Problem blieb der Gefäßzugang bei den zu dialysierenden Patienten. Die Weiterentwicklung des Gefäßanschlusses von James Cimino im Jahre 1966 [16] bedeutete für die Patienten nicht nur einen länger funktionierenden Gefäßzugang sondern auch weniger persönliche Einschränkungen.

Dieser Hämodialysehunt wird durch eine chirurgische Anastomose zwischen A.radialis und V.cephalica im Bereich des Unterarms des nicht-dominanten Armes angelegt. Kunststoffprothesen (z.B. Goretex®) werden implantiert, wenn keine geeigneten venösen Gefäße vorliegen. Leider neigen diese häufig punktierten Stellen zur Thrombosebildung, zu Infektionen und Aneurysmaausbildung (vor allem bei Prothesen) [19].

Die Akutbehandlung des Nierenversagens wird mit einem Shaldon-Katheter in einer zentralen Vene (z.B. V.jugularis interna) durchgeführt. Jeder extrakorporale Kreislauf macht eine Antikoagulation des Blutes erforderlich, vorwiegend mit niedermolekularem Heparin.

Die Hämodialyse funktioniert nach dem Prinzip der Diffusion entlang einer semipermeablen Membran um die nicht gewollten Substanzen aus dem Blut zu entfernen, während gewollte Substanzen (Kalzium, Glucose, Bikarbonat) zugeführt werden. Das Gerät besteht aus drei Komponenten: Dem anströmenden Blut in den dafür vorgesehenen Schläuchen, dem Dialysat und dem Dialysator selbst.

Blut wird durch die Schläuche in den Dialysator gepumpt und mit einem Blutfluss von 300 bis 450ml/min. Dort werden die Membranen von dem Dialysat umspült (500ml/min) und entlang des Diffusionsgradienten die erwünschten Stoffe aus dem Blut entfernt. Das Dialysat wird einmal benutzt und dann verworfen. Der Dialysator ist meist ein Kapillardialysator. Tausende feine Kapillaren aus Dialysemembran werden zu einem Bündel zusammengelegt. Durch die feiner Kapillaren fließt das Blut, aussen zirkuliert das Dialysat.

Bei der Wahl der Membranen spielt die Biokompatibilität eine grosse Rolle. Biokompatibilität bedeutet, dass die Materialien keine klinisch signifikante Empfängerreaktion hervorrufen [140]. Natürliche werden von semisynthetischen und synthetischen Membranen unterschieden. Zellulose ist der Trägerstoff der natürlichen Membranen (Cuprophan®). Diese sind schlecht biokompatibel aber billiger als andere Membranen. Semisynthetisch sind die sogenannten Zellulosederivate wie Zellulosediazetat, Zellulosetriazetat oder Diäthylaminoäthylsubstituierte Zellulose

(Hämophan®) die alle besser biokompatibel sind als natürliche Membranen. Die synthetischen Membranen bestehen aus Polymeren wie Polyacrylnitrilmethallylsulfonat-Copolymer (PAN/AN69), Polymethylmetacrylat (PMMA) oder Polysulfon (PS). Diese sind am besten biokompatibel aber auch die teuersten Membranen.

Der Kontakt des Blutes mit der Membran des Dialysator aktiviert die Gerinnungskaskade, was eine Heparinisierung des Blutes erfordert. Wechselwirkungen der Thrombozyten mit der Membranoberfläche aktiviert die Plättchen, was zur Freisetzung von Prostaglandinen, Thromboxan sowie einer Thrombozytopenie führt.

Des weiteren wird durch die nichtbiologische Oberfläche das Komplementsystem über den alternativen Weg aktiviert [21] . Die Generierung der Komplementkomponenten C3a und C5a ist am höchsten bei nichtmodifizierten Zellulosemembranen (Cuprophan®), deutlich geringer ist sie bei modifizierten Zellulosemembranen und praktisch nicht erhöht bei synthetischen Membranen, was zum Teil daran liegt, dass die aktivierenden Komponenten mit dem Dialysat eliminiert werden [76] .

Der Kontakt der Zellen mit der Membran und die Komplementaktivierung führen zu einer Aktivierung der peripheren Leukozyten, vor allem der Monozyten. Diese produzieren, einmal stimuliert, Entzündungsmediatoren wie Interleukin 1, Interleukin 6 und TNF α (Tumornekrosefaktor α) [56] .

Der Übertritt von Bakterien (sehr selten), eher von Bruchstücken von Bakterien (Pyrogenen) sind ein weiteres Problem. Lipopolysaccharide (LPS) als Bruchstücke von Endotoxinen sind in der Lage, zusammen mit den Komplementfaktoren die Zytokinproduktion im Körper zu induzieren [56] .

Mit den heutigen Techniken benötigen die meisten Patienten zwischen 9 und 12 Stunden Dialyse pro Woche, auf mehrere Tage verteilt.

In den 40er Jahren wurde die Peritonealdialyse erstmals erprobt, war aber unpraktisch. Der permanente Peritoneal-Katheter (Tenckhoff-Katheter) machte die Peritonealdialyse praktikabel.

Die IPD (intermittend peritoneal dialysis) war die erste angewandte Peritonealdialyse gefolgt von der CAPD (continuous ambulatory peritoneal dialysis), bei der dem Patienten Dialysat instilliert wird, 4-6h im Bauchraum verbleibt und dann ausgetauscht wird . Bei der CCPD (continuous cyclic peritoneal dialysis) wird das Dialysat automatisch konstant ausgetauscht, zum Beispiel während der Nacht. CAPD und CCPD können zuhause durchgeführt werden.

Die nach wie vor effektivste Behandlung der chronischen Niereninsuffizienz ist die Transplantation von Nieren. Als Spender kommen zum einen verstorbene Organspender und zum anderen Lebendspender in Betracht. Durch die verbesserte Patientenauswahl, erweiterte immunologische Kriterien der Spender-Empfänger-Zuordnung, optimierte Nierentnahmetechnik und wirksame immunsuppressive Therapie konnten die Überlebenszeiten der Transplantierten erheblich verlängert werden. Die Abstossung des Transplantats ist eines der größten Probleme. Insbesondere im ersten Jahr nach der Transplantation ist der Patient durch bakterielle und virale Infektionen gefährdet, was unter anderem auch auf die Immunsuppression zurückzuführen ist [23] .

1.2 Die Monozyten

Die Monozyten gehören zu den Leukozyten, haben ungranuliertes Plasma und einen Durchmesser von etwa 12-20 μ m. Im Mittel stellen sie 4-8% (400-500 Zellen pro μ l) der Blutleukozyten. Im Vergleich zu allen übrigen Leukozyten besitzen sie den höchsten Gehalt an Esterase und übertreffen unter anderem deshalb die Phagozytosekapazität aller anderen Blutzellen.

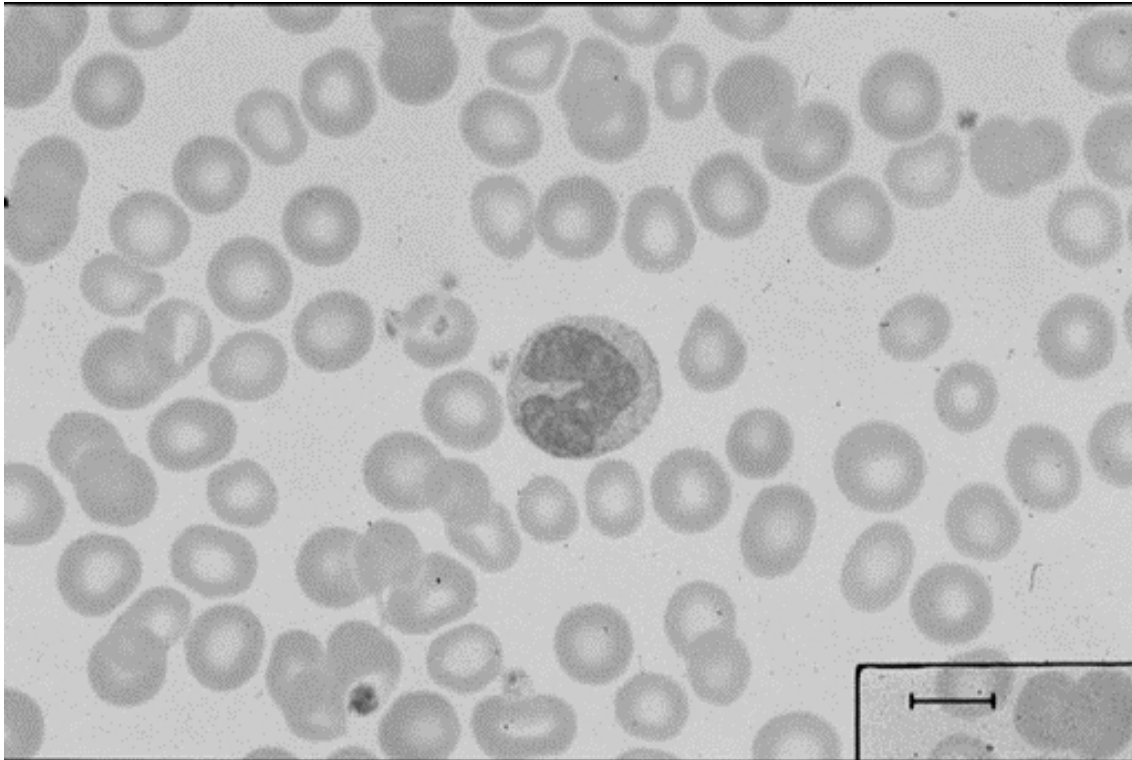


Abbildung 3: Ein Monozyt - mikroskopische Ansicht

Monozyten haben einen hufeisenförmigen Nukleus und schwach azurophile Granula, gewundene Membranen sowie einen gut entwickelten Golgiapparat.

Kennzeichnend sind die vielen intrazytoplasmatischen Lysosomen, die Peroxidase und Säurehydrolasen zur Abtötung von Mikroorganismen enthalten.

Im Knochenmark entstehen die Monozyten aus pluripotenten Stammzellen, die sich unter Einfluss von CFU-GEMM (colony-forming-unit granulocyte erythrocyte monocyte megakaryocyte) zu myeloischen Vorläuferzelle und unter CFU-GM-Einfluss weiter zu Promonozyten entwickeln.

In diesem Stadium verlassen die Monozyten das Knochenmark und gelangen in die Blutbahn. Reife Monozyten und Makrophagen werden CD34 negativ, behalten aber im Gegensatz zu Neutrophilen den CD33 und die membranständigen MHC-II-Moleküle

(major histocompatibility complex) [130] . Dieser MHC-Komplex ist für die Antigenpräsentation (siehe unten) gegenüber T-Zellen von entscheidender Bedeutung.

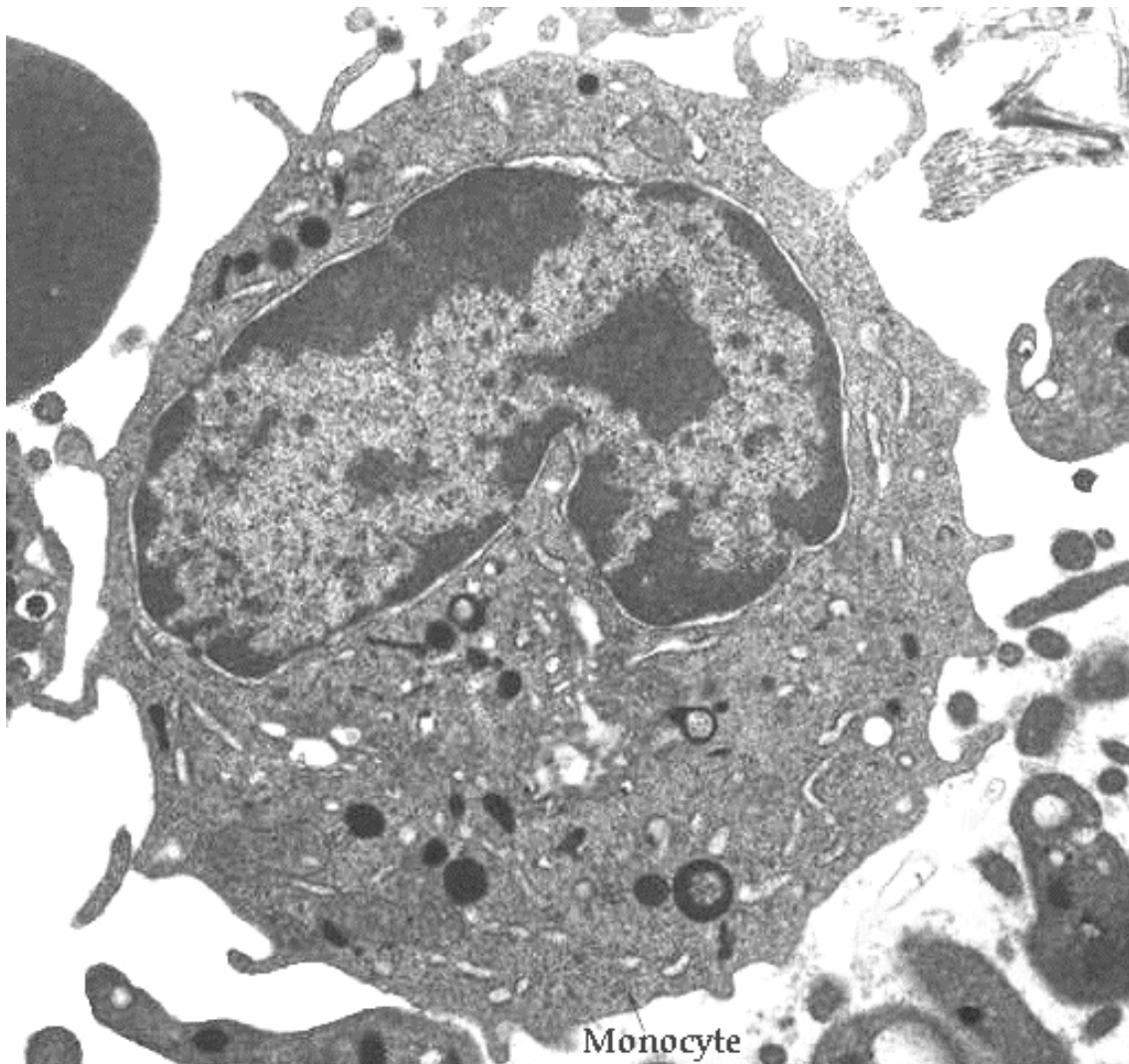


Abbildung 4:Ein Monozyt - elektronenmikroskopische Aufnahme

Die im Blut vorhandenen Monozyten wandern nach 2-3 Tagen in das umgebende Gewebe ein und differenzieren sich zu Gewebsmakrophagen oder Histozyten. Dort vergrößert sich die Anzahl der Lysosomen und Mitochondrien im Zytoplasma [143] . In den verschiedenen Geweben werden die Makrophagen unterschiedlich benannt:

- Gehirn – Mikrogliazellen
- Lunge – Alveolarmakrophagen
- Milz – Milzmakrophagen
- Niere – mesangiale Phagozyten
- Synovia – Synovia-A-Zellen
- Lymphknoten – Sinusmakrophagen (verbleibend)
- Leber – Kupffer-Sternzellen

Monozyten bilden zusammen mit den Gewebemakrophagen das mononukleäre Phagozytosesystem (früher retikulo-endotheliales System (RES) genannt).

Auf Monozyten/Makrophagen gibt es drei verschiedene Fc-Rezeptoren für IgG: FcγRI (CD64) hat eine hohe Affinität für IgG. FcγRII (CD32) besitzt eine mittlere, FcγRIII (CD16) eine niedrige Affinität.

Die Funktionen der Rezeptoren sind vielfältig: extrazelluläre Abtötung, Opsonierung und Phagozytose.

Der Rezeptor CR1 (C3b-Rezeptor, CD35) ist ein Komplementrezeptor und somit für die Aufnahme von Mikroorganismen wichtig.

Für die Adhäsion der Monozyten ist unter anderem CR3 (C3bi-Rezeptor, CD11b, MAC-1) verantwortlich und findet sich vor allem auf aktivierten Makrophagen. Einzelne Makrophagen besitzen noch einen Rezeptor niedriger Affinität für den Fc-Anteil von IgE, den FcεRII oder CD32.

Monozyten/Makrophagen exprimieren auch MHC-Klasse-II-Antigene, die die Aufgabe haben, aufgenommene Antigene an T-Zellen weiterzureichen.

Zusätzlich zu all diesen Molekülen tragen die Monozyten/Makrophagen auch Rezeptoren für Zytokine wie IL4 und IFNγ. Mithilfe solcher Rezeptoren können Zytokine, die von Lymphozyten sezerniert worden sind, die Funktion von Monozyten verstärken.

Letztlich werden die meisten Bakterien durch Phagozytose abgetötet. Diese verläuft in den Stadien Opsonierung, Anlagerung, Phagozytose und Zerstörung (Lyse).

Den Monozyten/Makrophagen stehen verschiedene Abtötungsmechanismen zur Verfügung:

Sauerstoffabhängige Abtötungsmechanismen.

- Reaktive Sauerstoffmetaboliten, gebildet von einem Enzym in der Phagozytenmembran, das Sauerstoff (O_2) zu einem Superoxydion (O_2^-) reduziert.
- Reaktive Stickstoffmetaboliten, durch die Stickoxydsynthetase (Kofaktor Tetrahydrobiopterin) wird Stickoxyd gebildet, welches toxisch für Bakterien und Tumorzellen ist.

Sauerstoffunabhängige Abtötungsmechanismen.

- Kationische Proteine, z.B. Defensine (Peptid mit 30-33 Aminosäuren), Cathepsin G, Azurocidin. Sie bilden ionendurchlässige Kanäle in Lipiddoppelschichten.
- Andere antimikrobielle Mechanismen, vorübergehender Anstieg des pH, bevor eine Ansäuerung des Phagolysosomen erfolgt. Lactoferrin bildet mit freiem Eisen Chelate, Lysozym verdaut die Peptidoglykane bakterieller Zellwände.

Wie oben beschrieben, besitzen die Monozyten MHC-Klasse II-Moleküle. Nach Phagozytose des Erregers kommt es zur Phagolysosomenbildung und zum Abbau des Erregers. Seine als Antigene wirksamen Bruchstücke werden in der Zelle an die dort ebenfalls lokalisierten Proteine des MHC II gebunden. Der entstandene MHC-Antigen-Komplex wird in die Zellmembran des Makrophagen eingebaut und den T-Helfer-Zellen (T-Lymphozyten) präsentiert, so dass eine zielgerichtete Körperabwehr stattfinden kann.

1.3 Hitze-Schock-Proteine (Hsp)

Als Stress-Proteine werden eine Reihe von Proteinen bezeichnet, die bekannteste Gruppe sind die Hitze-Schock-Proteine (hsp). Diese sind phylogenetisch hochkonserviert und bei allen Organismen zu finden [48] .

Ihre Expression ist wichtiger Bestandteil der zellulären Antwort auf unterschiedliche Belastungen.

Erstmals beschrieben wurden diese von Ritossa [127] , nachdem er in Speicheldrüsenzellen von *Drosophila* nach Erhitzung ein „puffing“ (Aufblähen) eines Gens beobachtete. Dieses wird von einer erhöhten Expression von Proteinen der Molekülmasse 70kd gefolgt [150] , welches darauf hin „heat shock protein“ genannt wurde. Seitdem sind viele andere hsp, sowie andere Stimuli zu Induktion dieser Proteine gefunden worden. Nach dem Molekulargewicht (in Kilodalton „Kd“) unterscheidet man z.B. hsp10, hsp20, hsp27, hsp47, hsp60, hsp70, hsp90, hsp110.

Unter anderem erhöhen Aminosäureanaloga [81] , Glucoseanaloga [119] , Schwermetalle [94] , Protein-Kinase-C-Stimulatoren [33] , Ischämie und Natriumarsenit [77] , sowie Infektionen, Stickstoffdioxid, Hormone, Zytokine wie IL4 [90] und Antibiotika die Expression an hsp70 (diese induzierbare Form des hsp wird manchmal auch hsp72 genannt).

In der Zelle findet man dieses Protein vor allem im Cytosol und im Nukleus. Sie sind hochkonserviert, was heisst, dass unter den Eukaryoten eine Übereinstimmung von 60-78% ist [97] .

Heat-shock-transkription-factors („hsf“) und hsp sind unter normalen Bedingungen aneinander gebunden im Cytosol [142] . Jedoch nach Stress wie Hitze oder Ischämie trennen sich hsf und hsp. Die HSF werden dann von einer Stress-Kinase phosphoryliert und legen sich zu Trimeren zusammen [89] , die dann in den Nukleus gelangen und dort an die HSE (heat shock element) in der Promotorregion des hsp-Gens binden. Hier werden sie durch HSF-Kinasen nochmals phosphoryliert [121] .

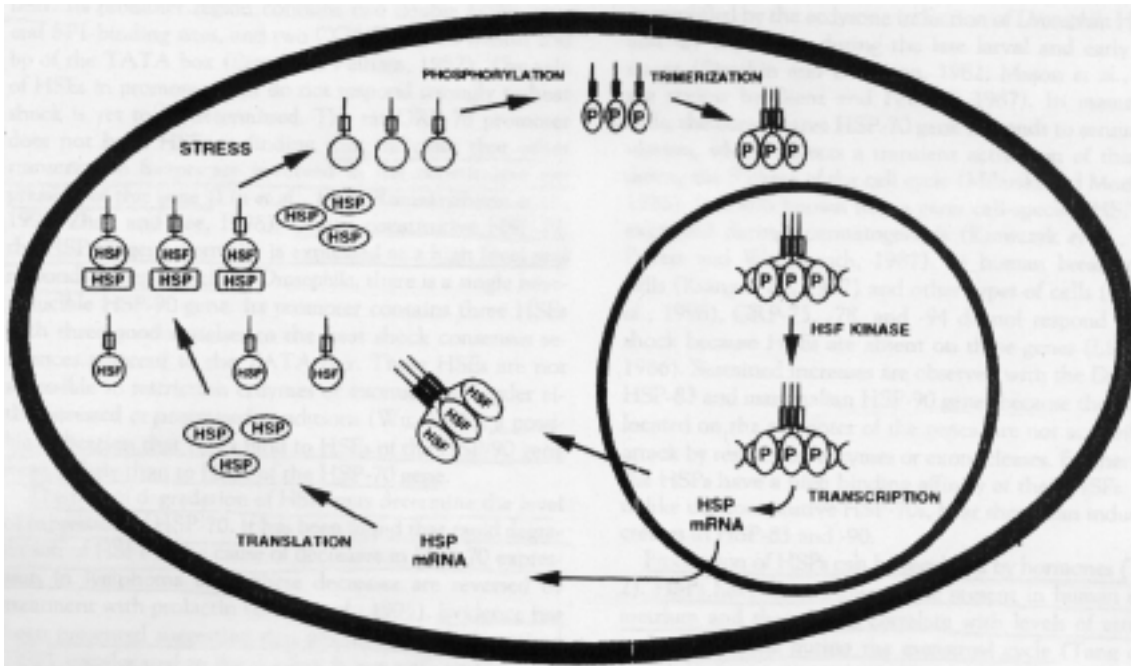


Abbildung 5: Hsp70 Induktion [84]

Jetzt wird die Transkription des Genabschnitts initiiert, worauf in einem anderen Schritt die Translation erfolgt. Die neu synthetisierten hsp70-Proteine binden, im Cytosol angekommen, wieder an HSF um eine weitere Produktion zu vermeiden (negative Rückkopplung).

Die maximale hsp70-Expression finden Kiang und Mitarbeiter [82] nach etwa 6 Stunden. Nach etwa 8 Stunden sinkt die intrazelluläre Konzentration, was sich mit den von uns gefundenen Ergebnissen deckt. Die Zeiten sind aber Zell und Stimulus abhängig.

Die Hauptaufgabe des hsp70 scheint die eines molekularen Chaperones (Gouvernante) zu sein. Aggregierte, denaturierte Proteinen werden wieder hergestellt, defekte oder degradierte Proteine werden Lysosomen zugeführt.

Hsp70 ist an der korrekten Faltung von Proteinen beteiligt [2] , indem es an die hydrophoben Teile der Proteine bindet und so die korrekte Faltung aufrecht hält, oder erst ermöglicht, und transportiert sie in verschiedene Kompartimente der Zelle, wofür spezielle Bindestellen an den Proteinen benötigt werden [109;146] .

Es ist bekannt, dass hsp70 direkt mit Fettsäuren eine Bindung eingehen kann, was ihre Fähigkeit, Membranen zu penetrieren oder andere Proteine über Membranen hinweg zu transportieren, erklärt [54] .

Einige in-vivo- und in-vitro-Studien konnten zeigen, dass Hitze-Schock-Proteine in der Lage sind, Zellen, Gewebe und Organe gegen normalerweise letale Noxen zu schützen.

Transplantierte Nieren schützt das Protein vor den Schäden der warmen Ischämie [112] Herzzellen vor einem Reperfusionsschaden nach Ischämie [28] und Brustkrebszellen (T47D) vor letalen Temperaturen [83] .

Einige Arbeitsgruppen wiesen nach, dass humane Monozyten vor H₂O₂-vermittelter Toxizität [116] oder Apoptose [135] durch hsp geschützt werden. Wird die hsp70-Expression verhindert, ist die Zelle anfälliger für Noxen [125] .

Mit dem hsp70-Gen transfizierte Zellen sind dadurch vor vielen schädigenden Substanzen geschützt, [96;135] . Bei erhöhtem Gehalt an hsp70 wird die Virusreplikation in den Zellen bei akuten Infektionen verringert [4] .

Während einer Infektion ist die hsp-Produktion erhöht [72] . Das schützt die Makrophagen vor den antimikrobiellen Abwehrmechanismen, die sie selbst in Gang gesetzt haben (Radikale) und ist für das Überleben der Zelle, sowie eine effektive Abwehr unerlässlich [162] . Bakterien hingegen, die hsp überexprimieren, sind resistent gegen allerlei Substanzen [17] , andere, die nicht in der Lage sind, hsp zu bilden, sind der Körperabwehr leichter zugänglich und werden eher getötet – sie haben eine verminderte Virulenz [75] .

Es gibt Hinweise darauf, dass die hsp am processing von MHC (major-histo-compatibility-) -Antigenen beteiligt sind: Proteinfaltung und -anordnung der MHC-Protein-Komplexe wird von hsp unterstützt [26] . Des Weiteren sind sie an der Präsentation von Antigenen beteiligt [31;158] . Dies unterstützt die Annahme, dass die hsp eine wichtige Rolle bei der Abwehr der Zellen spielen.

hsp sind aber nicht nur Ausdruck des Stresses der Zellen sondern werden mehr und mehr als Teil des Reparatur- und Schutzmechanismus z.B. bei Proteinaggregation oder falscher Proteinfaltung gesehen [73] .

Diese Ergebnisse zeigen, dass hsp70 für das Überleben der Zelle unabdingbar ist, sie ohne hsp70 nicht überlebensfähig wäre. Hsp70 ist notwendig, um die zelluläre Homöostase und Funktion aufrecht zu halten [136] .

1.4 Zielsetzung dieser Arbeit

In dieser Arbeit soll untersucht werden, ob es in der Induzierbarkeit des hsp 70 bei chronisch Niereninsuffizienten und Gesunden Unterschiede gibt und wo diese Unterschiede liegen. In diese Studie werden Monozyten verwendet, da sie an vielen pathogenen Mechanismen der Entstehung von Krankheiten, speziell bei einer dialysepflichtigen terminal niereninsuffizienten Person beteiligt, wenn nicht sogar hauptsächlich verantwortlich sind.

Die Hitze-Schock-Proteine gelten als Indikatoren für den Stress, dem die Zellen ausgesetzt sind.

Die vielen Krankheiten, an denen ein terminal Niereninsuffizienter leiden kann, macht eine Suche nach den pathogenen Mechanismen unerlässlich. Da nach wie vor dialysepflichtige Niereninsuffiziente deutlich höhere Infektionsrisiken als Gesunde haben, soll ein Ziel dieser Arbeit sein, mögliche Ursachen dafür zu beschreiben.

Die Zellen der Patienten werden vor der Dialyse abgenommen und dann mit verschiedenen Messverfahren untersucht. Mittels Western Blot und FACS (Fluorescence Activated Cell Sorting) wird der Gehalt an hsp70 gemessen.

Die Stimulation der Monozyten erfolgt durch Hitze. Diese soll den Stress simulieren, dem die Zellen ausgesetzt sind. Auf verschiedenen Ebenen des Proteinsynthese wird die hsp70-Proteinexpression durch Hemmstoffe blockiert um daraus Rückschlüsse auf die möglichen Unterschiede und die Ursachen machen zu können.

Eine Verminderung der Infektionsneigung der Langzeit dialysierten Patienten könnte ein wesentlicher Ansatz sein, die Lebenszeit der Patienten zu verlängern und gleichzeitig die Lebensqualität deutlich zu verbessern.

2 Material

2.1 Kulturmedium

Kulturmedium	500ml RPMI 1640 Medium
	5ml L-Glutamin
	5ml Penicillin / Streptomycin
	5ml (1M) Hepes Tyrode Puffer
	1,7ml Mercaptoethanol
	25ml FCS (5%) oder ohne FCS (0%)

2.2 Puffer

Hepes Tyrode Puffer	250ml bidest H ₂ O
	137mM (2000mg) NaCl
	2,7mM (50mg) KCl
	1mM (50mg) MgCl ₂
	0,5mM (15mg) NaH ₂ PO ₄
	1mM (45mg) Glucose
	2mM (186mg) EDTA
	20mM (5ml) Hepes 1M
	0,35% (875mg BSA)
Natriumazid-Puffer	500ml PBS (mit Ca ²⁺ / Mg ²⁺)
	0,05% (250mg) NaN ₃
	250µl FCS
TAE Puffer	50fach:
	500ml destilliertes Wasser
	500mM (9300mg) EDTA
	121 g Tris
	28,6 ml Eisessig (Acetacetat)
	pH=8,0
Saponin-Puffer	0,1%:

	98ml destilliertes Wasser
	1000mg BSA
	100mg Saponin
	pH=7,4
Triton X-100 0,1% - Lysepuffer	100ml destilliertes Wasser 0,1% (100mg) Natriumcitrat 0,1ml Triton X-100
Paraformaldehyd-Puffer	100ml PBS (mit Ca^{2+} / Mg^{2+}) 4% (4000mg) Paraformaldehyd oder 1% (1000mg) Paraformaldehyd pH=7,4
MOPS SDS Running Buffer	500ml destilliertes Wasser 5230mg (50mM) MOPS (3-(N-morpholino) Propan-Sulfonsäure) 1212mg (50mM) Tris Base 500mg (3,465mM) SDS 150mg (1,025mM) EDTA pH= 7,7
Transfer Buffer	500ml destilliertes Wasser 2010mg (100mM) Bicine 2616mg (100mM) Bis Tris 150mg (4,1mM) EDTA pH= 7,2

2.3 Reagentien und Antikörper

2.3.1 allgemeine Reagenzien

Ficoll	Biochrom Seromed [Berlin, BRD]
EDTA	Sigma Chemicals [St.Louis, USA]

Propidiumiodid	Sigma Chemicals [St.Louis, USA]
Etidiumbromid	Sigma Chemicals [St.Louis, USA]
Standard 123 bd Leiter	Sigma Chemicals [St.Louis, USA]
PBS Puffer ohne und mit Ca^{2+} / Mg^{2+}	Biochrom Seromed [Berlin, BRD]
RPMI 1640 Kulturmedium	
Fetal Calf Serum (FCS)	
Hepes 1M	
Penicillin / Streptomycin	
Trypsin / EDTA Solution	
L-Glutamin	
Ethanol 99,8%	Carl Roth [Karlsruhe, BRD]
Triton X-100	Merck [Darmstadt, BRD]
Eisessig (Acetacetat)	
Bovines Serum Albumin Fraktion V(BSA)	
Aqua dest.	Apotheke Uni-Münster
TritonX-100	Merck [Darmstadt, BRD]
Methanol (reinst)	Merck [Darmstadt, BRD]
TrisCl	Sigma
NaCl	Merck [Darmstadt, BRD]
MgCl ₂	Merck [Darmstadt, BRD]
K ₃ PO ₄	Merck [Darmstadt, BRD]
H ₂ O ₂ 30%	Merck [Darmstadt, BRD]
SDS	
Tris Base	
Bicine	

2.3.2 Reagenzien und Antikörper für Western Blot

Anti humman-hsp70 IgG1 mouse	StressGen [USA]
Anti-Maus-IgG-Pod	Roche
Anti-Rabbit-IgG-Pod	Roche
BM TETON POD-Substrat	Roche
Nonidet®	Fluka
MOPS SDS Running Buffer	Novex

Nupage Transfer Buffer	Novex
DTT Dithiothieitol	Sigma
Tween-20	Merck [Darmstadt, BRD]
Prestained broad range Standard	BioRad

2.3.3 Reagenzien und Antikörper für FACS

Anti human-hsp70 IgG1 mouse	StressGen [USA]
Anti mouseIgG1 Fitc-labelled	Jackson Immunotech [USA]
FACS-Scan Flow-Lösung	Becton Dickinson [Heidelberg, BRD]
Natriumazid	Merck [Darmstadt, BRD]
Paraformaldehyd	Merck [Darmstadt, BRD]
Saponin	Merck [Darmstadt, BRD]

2.4 Stimulantien

Hitze	47°C für 40 Minuten im Hitzeofen
SB203580	Smith Kline Beecham [USA]
Actinomycin	Sigma [USA]
Cyclohexemid	Sigma [USA]

2.5 Geräte

Labor-Verbrauchsmaterialien

Zentrifugenröhrchen Caps 10cm	Greiner [Frickenhausen, BRD]
Zentrifugenröhrchen Bluecap 15ml	
Zentrifugenröhrchen Bluecap 50ml	
Zentrifugenröhrchen mit 2,5mm	
Polyesterfiltermembran	
24-well-Kulturplatte	
96-well-Platte für die Proteinmessung	
Reagiergefäße 1,5ml und 2ml SafeLock	Eppendorf Greiner [Frickenhausen, BRD]
Sterile Pipettenröhren 1, 5, 10, 25ml	
Eppendorf Pipetten 10, 20, 100, 250, 1000µl	
Pipettenspitzen gelb (200µl) und blau (1000µl)	
Combitips plus, 12,5ml	
Multipipette	

Pasteur-Pipetten

Pipetus Akku

Sterilfilter 0,2µm Porengröße

50ml Perfusorspritze

Brand [Wertheim, BRD]

Hirschmann [Eberstadt, BRD]

Schleicher & Schüll [Dassel, BRD]

Braun [Melsungen, BRD]

Zentrifugen

Zentrifuge Biofuge 28S

Model TJ-6 Zentrifuge

Cytospin 2 Zentrifuge

Heraeus Sepatech [Düsseldorf, BRD]

Beckmann [München, BRD]

Shandon [Frankfurt a.M., BRD]

Waagen

LP 1200 S

RC 210 D

Sartorius [Göttingen, BRD]

Videodokumentation

UV-Tisch mit CCD-Kamera,

Monitor, Diskettenlaufwerk

UV-Schirm Quick Store

Monitor Monacor B&W

MS Laborgeräte [Heidelberg, BRD]

Rothaar & Schroeder [Heidelberg, BRD]

Brutschränke, Kühlschränke

Brutschrank elektronik

Wärmeschrank elektronik B5050E

Kühl- und Gefrierschränke

Heraeus [Düsseldorf, BRD]

Bosch [Stuttgart, BRD]

Durchflusszytometrische Messung

FACScan Flow Cytometer

Monitor 98785A

UNIX-PC 9000 340

Software Lysis II

Auswertungssoftware WinMDI V2.8

Becton Dickinson [Heidelberg, BRD]

Hewlett Packard [USA]

Mikroskope

Lichtmikroskop telaval 31

Zeiss [Jena, BRD]

Mikroskop III RS

Zeiss [Jena, BRD]

Arbeitsgeräte

Werkbank, LaminAir HA2472GS

Heraeus [Düsseldorf, BRD]

Bunsenbrenner Gasi

Schütt [Göttingen, BRD]

PH-Meter CG840

Schott [Mainz, BRD]

Heizblock Driblock DB 2A

Techne [Darmstadt, BRD]

Rührfisch MR 2002

Heidolph [Kelheim, BRD]

Vortex Press-to-mix 34524

Snejders [Tilburg, NL]

Western Blot

Xcell MiniCell Kammer

Invitrogen (Novex NuPAGE)

Blot module

Filterpapier

Schleicher & Schuell [Dassel, BRD]

PVDF-Membran

Millipore

Nitrocellulosemembran

Schleicher & Schuell [Dassel, BRD]

Stromquelle Power Pack P25

Biometra [Göttingen, BRD]

Photometer

ELISA-Reader MR4000

Dynatech [Bonn, BRD]

Auswertungssoftware V.1.0

IBL [Hamburg, BRD]

3 Methoden

3.1 Präparation der Monozyten

Das präparierte Blut für die Patientengruppe stammt von ausgewählten Dialysepflichtigen, für die Kontrollgruppe von ausgesuchten Gesunden. Es wurden jeweils 50ml Blut von den Probanden abgenommen und heparinisiert. Das Blut wurde sofort nach der Abnahme bis zur Verwertung gekühlt gelagert, maximal jedoch 30 min.

Für Vorversuche wurden sogenannte Buffy-Coats („Leukozytenmanschette“) benutzt. Buffy-Coats (Auflagerung der Leukozyten auf der Erythrozyten-Säule nach Zentrifugieren von Blut) entstehen bei der Herstellung von Erythrozytenkonzentraten aus Blut von Spendern des Universitätsklinikums Münster, die im Institut für Transfusionsmedizin verwendet und weiterverarbeitet werden.

Dabei werden die Leukozyten nach Zentrifugation abpipettiert um leukozytenfreie Erythrozytenkonzentrate zu bekommen. Diese Leukozyten stehen dann für Untersuchungen zur Verfügung.

3.1.1 Ficoll-Dichtezentrifugation

Das heparinisierte Blut wurde zunächst in ein 50ml-Zentrifugenröhrchen gegeben und dann zentrifugiert, um das Plasma von den anderen zellulären Bestandteilen zu trennen. Nach jeder Zentrifugation, bei 500 x g für 15 min., wurde der Überstand mit einer 10ml Pipette abgenommen und die sich unten befindlichen Zellen mit PBS (ohne Ca^{2+} / Mg^{2+}) (einem bei der Präparation der Monozyten notwendigen Puffer auf Pyruvatbasis) auf 50 ml aufgefüllt, gewaschen und resuspendiert.

25ml Zell-PBS-Suspension wurden in einem Filterbluecap, einem Zentrifugenröhrchen mit 2,5mm starker Polyestermembran, über den 15ml Ficoll-Gradienten geschichtet. Es ergab sich folgende Anordnung: unten im Zentrifugenröhrchen befanden sich 15ml Ficoll-Dichtegradient (Dichte 1,077 g/ml) darüber die Polyestermembran, dann die Zellsuspension.

Nach einer Zentrifugation bei 500 x g über 20min trennten sich die weissen von den roten Blutkörperchen und sammelten sich in der sogenannten Interphase.

Am Zentrifugenröhrchengrund befanden sich das Erythrozytensediment, darüber, unter und über dem Filter, das Ficoll. Als weisse Schicht befand sich darüber die Interphase, die gesammelten weissen Blutkörper, über jenen war der Rest des Puffers.

Mit einer 1ml-Pipette wurde die Interphase abpipettiert und in ein separates Röhrchen getan, dreimal mit PBS (ohne Ca^{2+} / Mg^{2+}) gewaschen, bei $1500 \times g$ für 10 Minuten herunterzentrifugiert, der Überstand abgenommen, auf 50 ml mit PBS (ohne Ca^{2+} / Mg^{2+}) aufgefüllt, resuspendiert und somit vom Ficoll restlos befreit.

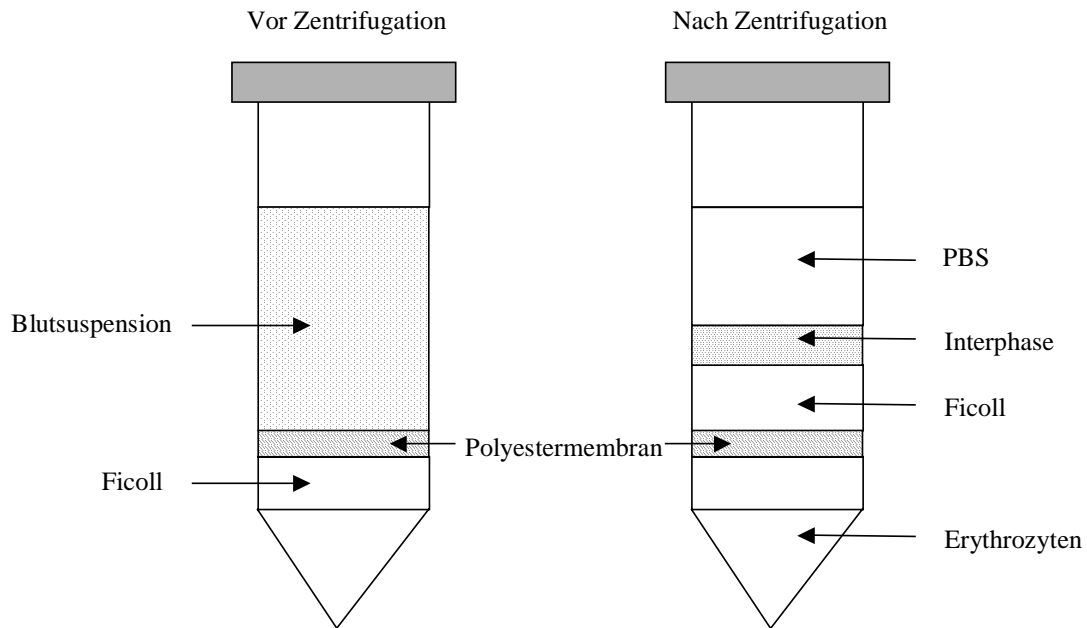


Abbildung 6: Ficoll-Dichtezentrifugation - Auftrennung der Blutbestandteile

Die gereinigten weissen Blutkörperchen wurden in RPMI-Kulturmedium ohne Zusatz von fetalem Kälberserum resuspendiert.

Die so gewonnenen und in der Medium-Zell-Suspension befindlichen Leukozyten wurden nach Zählung in der Neubauer-Zählkammer in einer Dichte von 5.000.000 Zellen pro well (=eine Vertiefung bekannten Durchmessers auf einer Plastikplatte, in der die Zellen separiert von anderen Zellen inkubiert werden) auf einer 24-well-Platte (1ml pro well, d.h. Zellkonzentration 5 Mio. Zellen pro ml Zellsuspension) ausgesetzt.

Für 90 Minuten wurden die Zellen in einem Brutschrank bei 5% CO_2 / 95% Luft – Atmosphäre und 37°C Temperatur inkubiert. Dieser Vorgang nennt sich „Adhärenz“, da die Monozyten aufgrund ihrer Oberflächenstruktur am Kunststoff der Kulturplatte adhären sind. Lymphozyten hingegen bleiben ungebunden und wurden nach Ablauf der Zeit mit kaltem PBS (ohne Ca^{2+} / Mg^{2+}) ab gespült. Dieser Spülvorgang wurde dreimal wiederholt. So reduzierte sich die Zellzahl der Monozyten im well auf etwa 750,000 Zellen. Durch diesen Vorgang erhält man Monozytenreinheiten von weit mehr als 85%.

Nun wurde in jedes well 1ml RPMI-Kulturmedium mit 5% Kälberserum-Zusatz gegeben, was vorher auf 37°C vorgewärmt worden war.

3.1.2 Stimulieren der Zellen

Nach Isolierung und Adhärenz der Monozyten wurden diese Zellen, die sich zu diesem Zeitpunkt auf einer 24-well-Kulturplatte befinden, stimuliert.

Zur Hitzestimulation wurde den Zellen im well 1ml auf 47°C vorgewärmtes 5%-Medium zugesetzt und die wells in einen Brutschrank mit 47°C Temperatur gestellt. Für 40 min wurden sie dort belassen Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde das Medium mit einer Pipette vorsichtig abgenommen und durch 1ml 37°C warmes Kulturmedium mit 5% FCS ersetzt. Die Zellen verblieben im Brutschrank bei 37°C bis zur Messung.

Andere Reagenzien wurden zusammen mit den 37°C-RPMI-Kulturmedium mit 5% FCS auf die Zellen getan und dort entweder belassen oder nach einer bestimmten Dauer abgenommen und durch Medium ohne stimulierende Zusätze ausgetauscht.

Cycloheximid, Actinomycin D und SB203580 wurden eingesetzt, um die Proteinexpression an verschiedenen Stellen zu unterbinden: Cycloheximid ist ein Proteintranslationsinhibitor. Auf der zellulären Ebene blockiert Cycloheximid reversibel die Proteinsynthese auf der Ebene der Translation der messenger-RNA an zytosolischen 80S-Ribosomen. Dabei hat Cycloheximid keinen toxischen Effekt auf die Monozyten [138;157] ; Actinomycin D bildet mit der doppelsträngigen DNA stabile Komplexe und inhibiert somit die RNA-Synthese aus DNA und hemmt unspezifisch die Proteinsynthese der Zellen. Bevorzugt zwischen Guanin-Cytosin-Basenpaaren interkaliert Actinomycin D in DNA, wobei sich der planare Trizyklus zwischen die Basenpaare schiebt.

Von SB 203580 ist bekannt, dass es selektiv die katalytische Aktivität der p38-MAP-Kinase hemmt, einer wichtigen Kinase im Induktionsweg von hsp70.

Cycloheximid verblieb dauerhaft auf den Zellen, Actinomycin D lediglich eine Stunde. SB203580 verblieb ebenfalls bis zur Messung auf den Zellen.

Cycloheximid, Actinomycin D und SB203580 wurden zuerst zusammen mit dem 37°C-Medium für eine Stunde in den angegebenen Konzentrationen auf die Zellen gegeben, dann wurde das Medium vorsichtig abgenommen und 1ml auf 47°C vorgeheiztes Medium (frei von Stimuli) zugegeben. Die Zellen wurden dann für 40 Minuten in den Wärmeschrank getan. Nach Ablauf der Zeit wurde das Medium durch 37°C warmes

Medium ersetzt und die Zellen in den 37°C Brutschrank gestellt. Dort verblieben sie für weitere 12 Stunden um dann den Messungen zur Verfügung zu stehen.

3.1.3 Abnehmen der Zellen

Nach 12 Stunden Inkubation der Zellen im Medium mit oder ohne Zusätze wurden die Zellen aus dem Brutschrank genommen, das Medium mit einer 1ml-Pipette vorsichtig abgenommen und die Zellen im well mit jeweils 1ml PBS (ohne Ca^{2+} / Mg^{2+}) einmal gewaschen, noch mal auf 1ml PBS (ohne Ca^{2+} / Mg^{2+}) aufgefüllt und 15 Minuten auf Eis gestellt.

Dies hatte den Effekt, dass den Monozyten zum einen das zur Adhärenz nötige Kalzium entzogen wird und zum anderen, dass durch die Kälte das Abspülen der Zellen von Plastikboden möglich wird.

Nach 15min wurden die Zellen durch mehrmaliges Spülen mit einer Pipette vom Kunststoff der Kulturplatte abgelöst und in ein 2ml Reagiergefäss gefüllt. Unter dem Mikroskop erfolgte die Kontrolle, ob alle Zellen abgelöst worden sind.

Die sich nun in PBS (ohne Ca^{2+} / Mg^{2+}) in Suspension befindlichen Zellen wurden 1 Minute bei 8000 x g herunterzentrifugiert. Die Zellen befanden sich nun in einem Pellet am Boden des Reagiergefässes, so dass der Überstand abpipettiert werden konnte und die Monozyten mit PBS (mit Ca^{2+} / Mg^{2+}) resuspendiert und gewaschen wurden. Es folgten drei Waschschrte, wobei jedes Mal mit PBS (mit Ca^{2+} / Mg^{2+}) gewaschen wurde. Somit wurden die Zellen von Medium und den Stimuli befreit. Nach dem letzten Zentrifugationsschritt wurde der gesamte Überstand abgenommen, so dass die Zellen vollkommen trocken waren.

Jetzt konnten die Monozyten für verschiedene Messmethoden weiterverwandt, oder in diesem Zustand eingefroren werden (-80°C).

3.2 Durchflusszytometrische Messverfahren (FACS)

3.2.1 Prinzip des FACS

Die Durchflusszytometrie oder FACS (Fluorescence Activated Cell Sorting) ermöglicht das Zählen und die Analyse von physikalischen und molekularen Eigenschaften von Zellen in einem Flüssigkeitsstrom.

Mit Fluoreszenz-Farbstoffen markierte Antikörper sind in der Lage das passende Antigen extra- oder intrazellulär zu binden.

Fluorochrom	Absorptionsmaxima [nm]	Emissionsmaxima [nm]	Abkürzung
APC-Cy7	743	767	PharRed
Fluoreszeinisothiozyanat	495	519	FITC
PE-Cy5	480; 565; 649	670	CyChrome, Red670
Peridin Chlorophyll	490	675	PerCP
Phycoerythrin	480; 565	578	PE
Propidiumjodid	550	650	PI
Red613	480; 565	613	PE-TexasRed

Die in Suspension befindlichen Zellen werden zur Analyse wie an einer Perlenkette einzeln an einem gebündelten Laserstrahl geeigneter Wellenlänge vorbeigeleitet. Die Fluoreszenz-Farbstoffe am Antikörper werden so angeregt und emittieren ihrerseits Licht einer bestimmten Wellenlänge. Diese Photonen können durch einen Photodetektor registriert werden. Lichtsignal und gebundene Antikörper pro Zelle verhalten sich proportional. Eine gleichzeitige Messung verschiedener Fluoreszenz-Farbstoffe ist möglich, da sich die Farbstoffe zwar bei einer gleichen Wellenlänge anregen lassen, sich in ihren Emissionsspektren aber unterscheiden.

Zusätzlich können durch die Lichtbeugung und Lichtstreuung Informationen über die Größe und Granularität der Zellen gewonnen werden.

Diese vom Photodetektor erhaltenen Informationen werden an einen Computer weitergeleitet, was eine graphische Bearbeitung möglich macht.

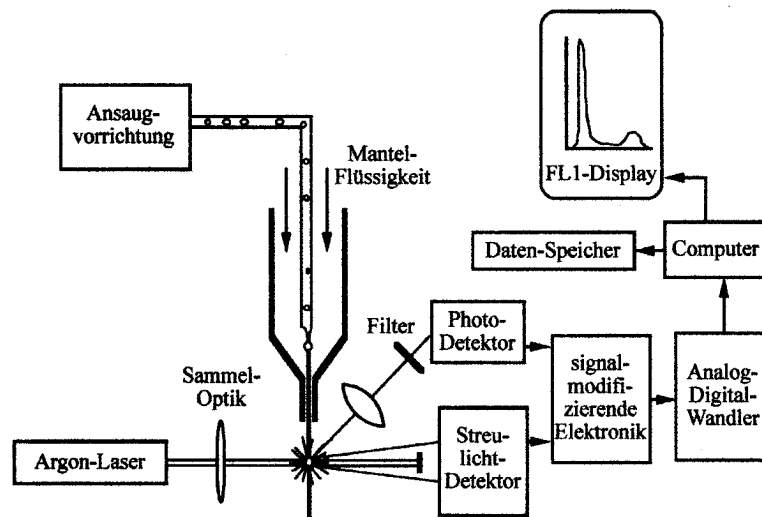


Abbildung 7: Prinzip der FACS

3.2.2 Färben der Zellen

Die, wie oben beschrieben, präparierten, stimulierten und abgenommenen Monozyten wurden zweimal mit PBS (mit Ca^{2+} / Mg^{2+}) gewaschen und 1 Minute bei 8000 x g herunterzentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen. Die im Folgenden durchgeführten Zentrifugationen sind alle mit den oben genannten Einstellungen vorgenommen worden.

Zur Färbung auf hsp70 wurden die Zellen nun in 200µl 4%igen Paraformaldehyd-Puffer resuspendiert. Für 15 Minuten erfolgte die Inkubation im Kühlschrank bei 4°C.

Paraformaldehyd fixiert die Zellen durch Vernetzung der Strukturen innerhalb der Membran, so dass die Zellen zu keiner weiteren Aktivität in der Lage sind. Die einzelnen Strukturen bleiben erhalten und für längere Zeit konserviert und messbar.

Danach wurde 1ml Natriumazid, dies dient der Stabilisierung der Zellen, dazugegeben und gut durchmischt. Es folgten drei Waschschrte, bei denen das überflüssige Paraformaldehyd entfernt wird.

Pro Ansatz, das heisst pro zu färbendem Reagiergefäss mit Zellen, wurden 10µl hsp70 Antikörper in 90µl 0,1%igem Saponin-Puffer gelöst und zu den im Pellet stehenden Zellen gegeben, durchmischt und 30 Minuten bei 4°C im Kühlschrank inkubiert. Saponin perforiert die Membran der Zellen, so dass die Antikörper in die Zellen gelangen und die intrazellulär gelegenen Proteine detektieren können.

Für die Negativ-Kontrolle wurde ein Zell-Ansatz nur mit 100µl Saponin suspendiert, ohne den primären hsp70 Antikörper.

In einem zweiten Färbeschritt wurden die Zellen wieder dreimal gewaschen, diesmal aber mit Saponin, da es bei Weglassen des Saponin zu Einschlusskörperchen kommen kann, die die durchflusszytometrische Messung beeinflussen würden. Dann herunterzentrifugiert und mit 15µl sekundärem Antikörper gelöst in 85µl Saponin inkubiert. Der sekundäre Antikörper richtet sich gegen Maus-IgG, also gegen den primären, den hsp70-Antikörper. Dieser Antikörper muss sekundär markiert werden, da er selber nicht markiert ist. Auch die Negativ-Kontrolle wurde mit dem sekundären Antikörper gefärbt, um nachher Rückschlüsse ziehen zu können, welche Bindung spezifisch und welche unspezifisch waren.

Nach 30 Minuten im Kühlschrank bei 4°C wurden die Zellen abermals mit Natriumazid gewaschen und somit von den nicht gebundenen Antikörpern befreit.

In 500µl Natriumazid gelöst wurden die Zellen in ein Facs-Röhrchen [Falcon] überführt und sofort durchflusszytometrisch gemessen [8] .

3.2.3 Vorgang der Messung

Jedes der Facs-Röhrchen wurde einzeln gemessen, die erhaltenen Signale wurden von der Software des Gerätes verarbeitet und in verschiedenen Darstellungsweisen angezeigt.

Eine Möglichkeit der Darstellung ist das Dotplot:

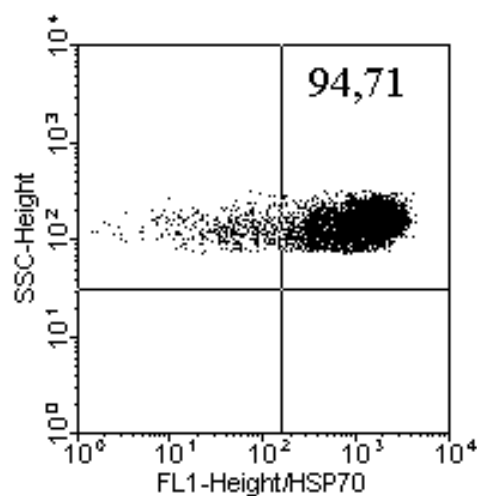


Abbildung 8: Ergebnisdarstellung im Dotplot

Eine andere Darstellungsform ist die histogrammische Ausgabe des Ergebnisses:

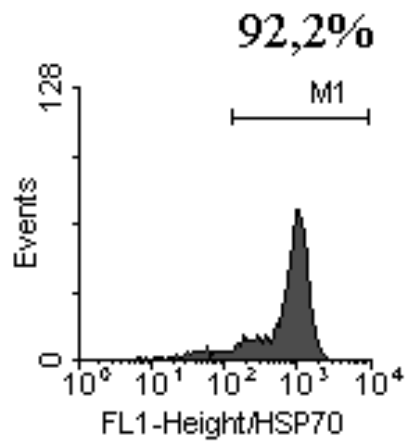


Abbildung 9: Histogrammische Darstellung der Ergebnisse

Von den drei möglichen Kanälen an diesem Zytometer wurden bei der Messung auf hsp70 nur der FITC Kanal belegt, da der sekundäre Antikörper gegen hsp70 FITC-markiert ist (Fluoreszeinisothiozyanat).

3.2.4 Auswertung der Messergebnisse

Mit dem Programm WinMDI wurden die möglichen Darstellungsformen ausgewählt und am Monitor ausgegeben. Es besteht überdies noch die Möglichkeit, die Daten zu exportieren und mit anderen Programmen zu bearbeiten, bzw. sie in andere Verarbeitungen einzufügen, wie Texte oder Grafiken. Eine quantitative Auswertung der Messergebnisse ist sehr gut möglich.

3.3 Western Blot

Der Western Blot dient der Identifikation und Quantifizierung spezifischer Proteine in komplexen Proteingemischen. Dabei können einzelne Proteine aus Virus-Präparationen, Gesamt-Zell-Protein oder Gewebe-Lysaten nachgewiesen werden.

Die Proteine werden, abhängig von ihrer Größe und Ladung, im elektrischen Feld elektrophoretisch auf einem Gel (meist Polyacrylamid-Gel) aufgetrennt.

Danach werden sie auf eine Membran (Nitrocellulosemembran) transferiert (Antigenttransfer) und dadurch immobilisiert. Auf der Membran erfolgt der Nachweis des Proteins mittels eines spezifischen Antikörpers. Der gebundene erste Antikörper wird durch einen zweiten Antikörper, der entweder radioaktiv markiert oder an ein Enzym (Peroxidase, Phosphatase etc.) gekoppelt ist, detektiert.

3.3.1 Zellen lysieren

Die nach der Stimulation abgenommenen Zellen (siehe oben) wurden 1 min. bei 8000 x g herunterzentrifugiert. Es folgen mehrere Waschschrte mit PBS (mit Ca^{2+} / Mg^{2+}).

Auf die im Pellet (d.h. am Boden des Reagiergefäßes) stehenden Zellen wurden 80µl Lysepuffer gegeben und gut durchmischt.

Es folgen 45 min Inkubation bei Raumtemperatur (20°C).

Anschließend wurde das Zelllysate 60 min bei 4°C mit 38000 x g zentrifugiert um die nicht lysierbare und nichtgewollte DNA und RNA am Boden des 2ml-Eppendorf-Gefäßes zu sammeln.

Die sich im Überstand in Lösung befindlichen Proteine wurden mit einer Pipette abgenommen und in ein separates Eppendorf-Gefäß gefüllt. Bis zur weiteren Verwendung wurde das Zelllysate bei -80°C tiefgefroren.

3.3.2 Proteinmessung

Um den unterschiedlichen Zellzahlen einer jeden Probe gerecht zu werden wurde eine Proteinmessung durchgeführt. Anhand der ausgegebenen Proteinkonzentrationen wurde die Proteinmenge normiert, die später in jede Tasche des Gels zu pipettieren war.

Die Bestimmung basiert auf dem Farbumschlag der BioRad-Coomassie-Brilliant-Blau-G250-Lösung von braun (495nm) nach der Bindung mit dem Protein in verschiedener Intensität zu blau (595nm).

Eine Standardreihe bildete BSA in verschiedenen Verdünnungen (0µg bis 100µg Protein pro ml) mit PBS (ohne Ca²⁺ / Mg²⁺).

Die Zelllysate wurden 1:25, 1:50 und 1:100 verdünnt, um in den optimalen Extinktionsbereich zu gelangen.

Jeweils 100µl Standard oder Probe wurden in eine 96-well Platte zur Doppelbestimmung pipettiert, d.h. jede Probe wurde zweimal aufgetragen.

100µl der BioRad-Lösung (40% BioRad-Coomassie-Brilliant-Blau-G250-Lösung, 60% PBS (ohne Ca²⁺ / Mg²⁺)) wurden in jedes well gegeben.

Der Nullabgleich erfolgte mit einem Leerwert aus 100µl PBS (ohne Ca²⁺ / Mg²⁺) und 100µl BioRad-Lösung.

Nach einer Inkubationszeit von 5 min wurden die Proben bei einer Wellenlänge von 590nm in dem Dynatech ELISA-Reader gemessen.

Die Datenverarbeitungssoftware interpolierte aus den Extinktionen der Standardwerte eine Standardkurve und errechnete daraus exakt die Proteinkonzentrationen der einzelnen Proben.

3.3.3 Gelelektrophorese

Bei der Gelelektrophorese wird in verschiedene Taschen (wells) eines Gels Protein pipettiert, das nach Anlegen eines Stromes je nach Größe und Ladung auf dem Gel aufgetrennt wird.

Die Proben wurden aufgetaut und in der vorher berechneten Menge in ein separates Eppendorf-Gefäß getan. Im Verhältnis 3 Teile Probe auf 1 Teil 4fach LDS-Sample-Buffer (Probenpuffer, ein Detergens, das sich an Proteine anlagert und diese denaturiert) wurden Probe und Probenpuffer durchmischt und herunterzentrifugiert. Es folgte eine Erhitzung auf 70°C für 10min in einem Thermoblock mit anschließender Herunterzentrifugation um das am Deckel befindliche Kondenswasser zu sammeln.

Der verwendete Standard was ein BioRad-Broad-Range-SDS-Standard. Der Standard besteht aus Proteinen bekannter Größe, welche angefärbt werden und somit permanent sichtbar bleiben. Somit kann nach Antigendetektion die gefundene Bande einer bestimmten Größe zugeordnet werden:

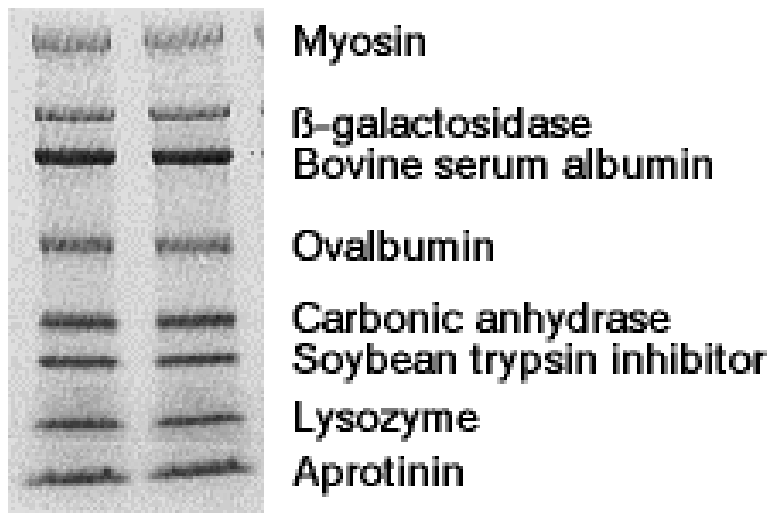


Abbildung 10: SDS-Broad-Range-Standard

Das Novex NuPAGE Bis-Tris Gel 4-12% Polyacrylamid (4-12% bedeutet, dass im Gel ein Gradient entsteht, und die Proteine je nach Größe besser aufgetrennt werden können) wurde mit destilliertem Wasser gewaschen, der Kamm aus den Taschen des Gels gezogen und die nun freiliegenden Taschen mit Running-Buffer gespült. Danach wurde die Gelkassette in die NuPage XCellII Mini Cell (Kammer) gestellt und fest installiert.

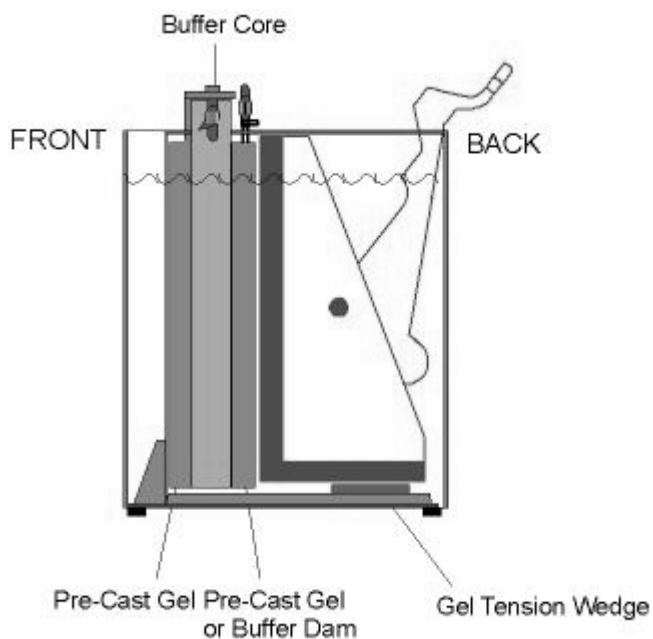


Abbildung 11: Novex NuPage XCell MiniCell

In die so entstandene Innere Kammer waren 200ml Running-Buffer zu füllen, in die äußere Kammer 600ml Running-Buffer.

Anschließend wurden die Proben in die jeweilige Tasche (well) mit einer 25µl Hamilton Spritze pipettiert, wobei pro Tasche nie mehr als 25µl eingefüllt werden dürfen.

Nach Anschließen der Stromquelle wurden folgende Einstellungen gewählt: 200V für 55min (bei 110mA zu Anfang der Elektrophorese und 70mA am Ende).

Nach Ablauf der Zeit wurde der Strom abgeschaltet, die NuPage XCellII Mini Cell-Kammer auseinandergebaut und die Gelkassette herausgenommen.

3.3.4 Der Blot

Im zweiten Schritt des Western Blot wurden die bei der Gelelektrophorese gewonnenen Proteinbanden auf eine das Protein bindende Membran transferiert (geblottet).

Der Transfer erfolgte auf elektrophoretischem Weg in die proteinbindende Membran. Dabei wird ein elektrisches Feld senkrecht zur ursprünglichen Laufrichtung angelegt, wodurch die Proteine aus der Gelmatrix auf die Membran laufen und dort gebunden werden. Als Membran wird eine Nitrocellulose-Membran benutzt.

Filterpapier und Membran wurden auf die richtige Größe zurechtgeschnitten, so dass sie den gesamten Raum des XCell BlotModule ausfüllen.

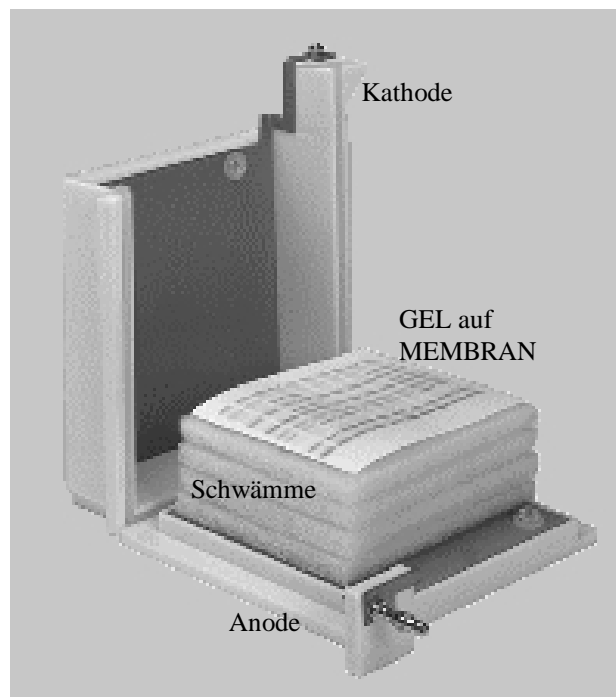


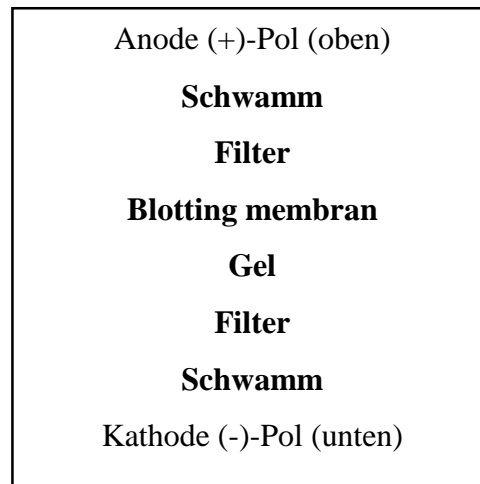
Abbildung 12: Novex NuPage BlotModule

Das Filterpapier dient der optimalen Druckverteilung von der Membran auf das Gel, durch die fertiggeschnittenen Schwämme (filter pads) wird der nötige Druck aufgebaut.

Die Nitrocellulose-Membranen wurden mehrere Minuten in Transfer-Puffer gewaschen, um sie gänzlich von eingeschlossener Luft zu befreien.

Die Schwämme wurden ebenfalls einige Zeit in Transfer-Puffer gelegt, damit sie sich voll saugen und keine Luft mehr enthalten, die den Blot (den Transfer der Proteine vom Gel auf die Membran) empfindlich stören können.

Das Gel, auf dem der Standard, sowie die vorderste Lauffront des Probenpuffers zu sehen waren wurde ausgeschnitten und auf ein Filterpapier gelegt. Die Anordnung von Filterpapier, Schwämmen, Membran und Gel im BlotModule war:



Das nun entstandene „Sandwich“ wurde fest zusammengedrückt und in die XCell MiniCell gestellt.

Nun wurde Transfer Puffer in die entstandene innere Kammer gefüllt, bis die Schwämme und Filter gerade bedeckt sind. In die äußere Kammer wurden 650ml des übriggebliebenen Transfer-Puffers bis auf 2cm unterhalb des Randes befüllt, um die entstehende Hitze abzuleiten.

Nach dem Anstellen des Strom galten folgende Einstellungen: 1 Stunde bei 30V (zu Anfang 170mA, gegen Ende des Blots 110mA).

Nach einer Stunde wurde der Strom abgeschaltet und die XCell MiniCell auseinandergebaut. Das Gel wurde mit Coomassie-Lösung gefärbt, um durch diese Proteinfärbung einen gelungenen Proteintransfer vom Gel auf die gewählte Membran zu überprüfen.

Die Membran wurde kurz mit destilliertem Wasser gewaschen.

3.3.5 Proteinmarkierung und Antigendetektion

Der verwendete Kit war von Boehringer Mannheim (jetzt Roche Diagnostics) zur Anfärbung von Antigen auf Western Blots.

Die Membran wird nun mehrfach mit TBS gewaschen (dreimal mit je 50ml für 5 min).

Es folgt die Blockierung der Membran mit 0,1% Tween in TBS (TTBS) mit 10% Trockenmilchpulver (fettfrei) für 1 Stunde bei 20°C Raumtemperatur.

Die Membran muss blockiert werden um die Proteinbindungskapazität der Membran zum Erliegen zu bringen, und ein unspezifisches Binden des zur Detektion verwendeten Antikörpers zu vermeiden. Die in den folgenden Schritten genannten Antikörper sind auch Proteine und würden ohne Blockierung der Membran unspezifisch gebunden. Bei erfolgter Blockierung binden sie aber spezifisch an das gewünschte Antigen.

10µl des primären Antikörper (Anti-hsp) wurden mit 10ml TTBS vermischt und 1h bei 20°C Raumtemperatur mit der Membran inkubiert. In diesem Schritt binden die primären Antikörper spezifisch an das gesuchte Antigen.

Es folgten weitere Waschschrte mit TTBS (dreimal mit je 50ml für 5 min), um den ungebundenen primären Antikörper restlos von der Membran zu entfernen.

Die Membran wurde mit 0,3U/ml Anti-Maus-IgG-Pod oder Anti-Kaninchen-IgG-Pod, je nach Beschaffenheit des primären Antikörpers, in 10ml TTBS inkubiert. So wurden die primären Antikörper (bereits an das Antigen gebunden) von einem mit Peroxidase markierten sekundären Antikörper detektiert. Für 1 Stunde blieb der sekundäre Antikörper auf der Membran und wurde anschließend, wie oben bereits beschrieben, abgewaschen.

3.3.6 Anfärbungsreaktion

Zur Anfärbung des gewünschten Proteins (Antigen), das zuvor mit einem Antikörper markiert worden war, macht man sich das blaue Präzipitat des Substrates für die Peroxidase zunutze. So werden die Proteinbanden auf den Western Blot sichtbar:

Der sekundäre Antikörper, an den primären Antikörper gebunden, ist mit POD (d.h. Peroxidase, einem Enzym) markiert. Bei der enzymatischen Reaktion der POD wird ein blauer Farbstoff sichtbar, der zur Identifikation der Proteinbande dient.

2,5mg/ml BM-TETON-POD-Substrat und 0,06% H₂O₂ 30%ig werden in Tris-Puffer bei pH=6 für 10 min auf der Membran belassen. Die Farbbildung war deutlich sichtbar.

Destilliertes Wasser beendete die Farbreaktion, und das Ergebnis auf der Membran kann photographisch festgehalten werden.

Die Membran wurde im Dunkeln getrocknet und konserviert.

Aufgrund der vorhergegangenen extinktionsphotometrischen Proteinmessung jeder einzelnen Probe war eine quantitative Aussage über die verschiedenen sich ergebenden Banden zulässig.

3.4 Patienten und Kontrollen

Die in diesen Versuchen untersuchten Monozyten stammten ausschließlich von freiwilligen Spendern, zum einen aus einer Patientengruppe und zum anderen aus einer Kontrollgruppe.

In die Patientengruppe wurden 27 Personen eingeschlossen, 17 Männer und 10 Frauen. Das Durchschnittsalter der Patientengruppe lag bei 38 Jahren (von 18 bis 76 Jahre).

Alle Patienten waren seit mindestens 12 Monaten dialysepflichtig bei Dialyse für jeweils etwa 4 Stunden an drei Tagen in der Woche (meist Montag, Mittwoch und Freitag).

Die zur Dialysepflicht führende Erkrankung war bei 8 Patienten eine vaskuläre Nephropathie, bei 7 Patienten eine Glomerulonephritis (nicht weiter bezeichnet), bei 5 Patienten eine chronisch interstitielle / tubulointerstitielle Nephritis, bei 3 Patienten Zystennieren und in 4 Fällen unbekannter Genese.

Die Patienten waren zum Zeitpunkt der Blutentnahme in guter körperlicher Verfassung. Eine antiphlogistische, antiinfektiöse oder immunsuppressive Therapie führte zum Ausschluss aus der Studie.

Die Kontrollgruppe bestand aus 32 Personen, davon 19 männlich und 13 weiblich. Das Durchschnittsalter betrug 32 Jahre (von 22 bis 59 Jahre). Bei der Blutentnahme waren alle Spender in guter körperlicher Verfassung, nicht in ärztlicher Behandlung, hatten keine Infektionen und waren anamnestisch gesund. Es wurden keine Medikamente eingenommen.

Nach ausführlicher Aufklärung der freiwilligen Spender und deren Einwilligung wurde Patienten sowie Kontrollpersonen jeweils 50ml Blut aus einer peripheren Vene abgenommen.

Die Blutentnahme bei den Patienten erfolgte kurz vor der Dialyse, in einigen Fällen vor, sowie nach der Dialyse.

3.5 Statistische Methoden

Die sich aus den verschiedenen Versuchen ergebenden Ergebnisse werden als Mittelwert +/- Standardabweichung angegeben.

Das zugrundeliegende statistische Testverfahren für die Daten ist der Student's t-Test. Hierbei wurden Unterschiede von $p < 0,05$ als statistisch signifikant angesehen.

Die graphische Darstellung erfolgt mittels Microsoft Excel.

4 Ergebnisse

4.1 Zeitkinetiken und Konzentrationsabhängigkeiten

Diese Versuche wurden mit Buffy-Coats aus dem Institut für Transfusionsmedizin des Universitätsklinikums Münster oder mit Blut von freiwilligen gesunden Spendern gemacht.

4.1.1 Die hsp70-Expression basal und nach Erhitzung

Die Monozyten wurden mittels Ficoll-Dichtezentrifugation aus Vollblut oder Buffy-Coats gewonnen, präpariert und auf verschiedenen Kulturplatten ausgesetzt.

Diese Monozyten wurden zeitgleich im Wärmeschrank erhitzt, dann herausgenommen und ab jetzt abgenommen. Die Inkubation wurde ab Herausnahme aus dem Schrank gemessen.

Die nicht stimulierten Zellen, die im folgenden den basalen Wert bilden, verblieben während der Erhitzung der anderen Monozyten im Brutschrank mit 37°C und werden zu den festgelegten Zeiten der stimulierten Zellen abgenommen.

Die gewählte Dauer betrug sofort (Abnahme der Zellen direkt nach Herausnahme aus dem Hitzeschrank) , 1 Stunde, 3 Stunden, 6 Stunden, 9 Stunden, 12 Stunden.

Die Zellen wurden abgenommen und sofort mit den Antikörpern gegen hsp70 markiert und durchflusszytometrisch gemessen.

Es fällt auf, dass der basale Wert sich über die Zeit nicht verändert.

Nach Hitzestimulation hingegen war eine deutliche Veränderung der Hitze-Schock-Protein 70-Expression zu verzeichnen. Direkt nach Stimulation war noch keine Proteinvermehrung zu messen, nach 1 Stunde verzeichnete man die erste Erhöhung. Nach 9 Stunden wurde der maximale Wert der Hitze-Schock-Protein 70-Expression gemessen. Im weiteren zeitlichen Verlauf nahm die Stärke ab, blieb aber bis zu 72 Stunden weiterhin als Erhöhung messbar.

Nach diesen Versuchen haben wir uns entschlossen, die weiteren Messungen an den Monozyten der Patienten nach 12 Stunden Inkubationsdauer durchzuführen, da hier die Expression annähernd maximal war. Bei allen untersuchten Monozyten wurde so eine deutliche hsp70-Expression erreicht, der Unterschied zu den basalen Werten ausgesprochen deutlich und außerdem das Zeitfenster günstig für die Präparation der Monozyten.

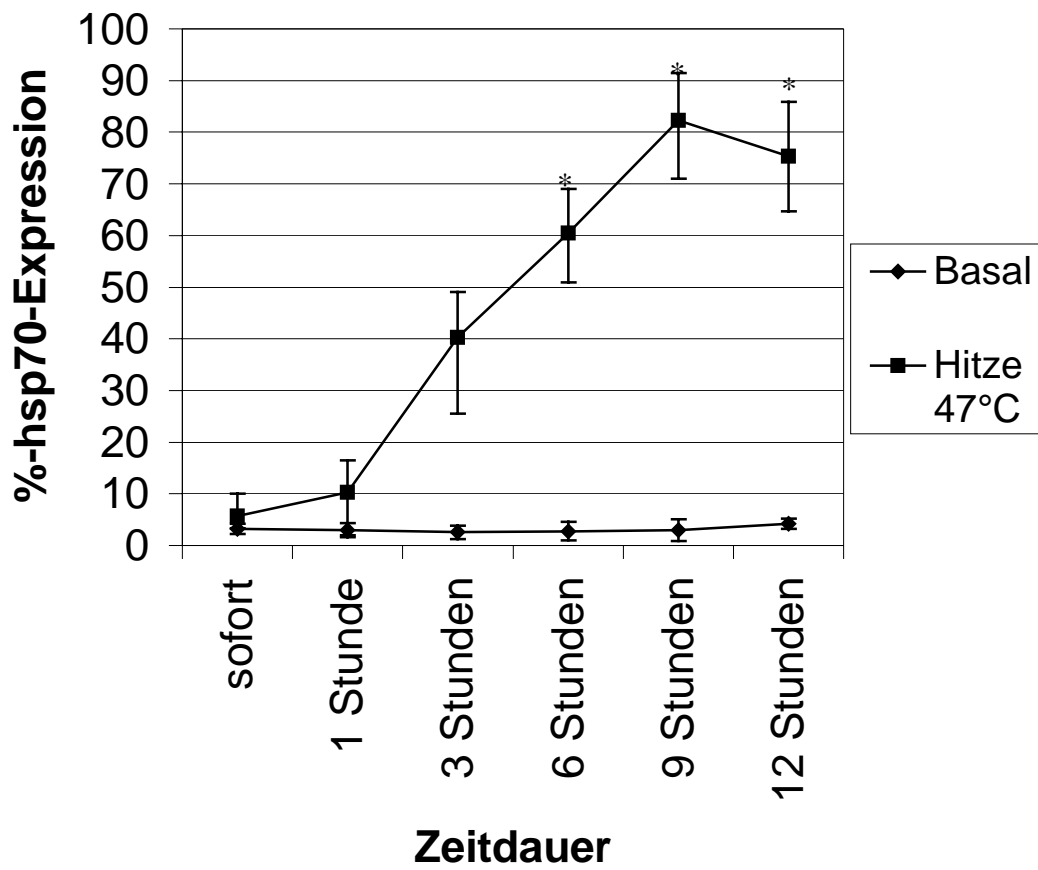


Abbildung 13: Zeitkinetik basal und nach Hitze

4.1.2 Die Temperatur und Zeitabhängigkeit hsp70-Expression

Die optimalen Temperaturen und Dauer der Hitzestimulation wurden in eigenen Versuchsreihen für die verschiedenen Parameter getestet.

Zum einen untersuchten wir die hsp70-Expression in Abhängigkeit von der Dauer der Hitzestimulation. Hierbei wurden bei einer festgelegten Temperatur von 47°C verschiedene Versuchsansätze durchgeführt. Nach jeweils 10 Minuten, 20 Minuten, 40 Minuten, 60 Minuten, 80 Minuten Hitzestimulation wurden die Zellen wie bereits beschrieben abgenommen und durchflusszytometrisch gemessen.

Es zeigte sich hierbei, dass nach 40 Minuten die Expression von hsp70 am höchsten war (gemessen anhand der Anzahl der hsp-positiven Monozyten Im FACS). Für die folgenden Versuche haben wir entsprechend diese Inkubationszeit gewählt. Die Zellen zeigten darüber hinaus im Vergleich zu den nicht stimulierten Zellen (basale Expression, bei 37°C belassen) keine erhöhte Apoptoserate.

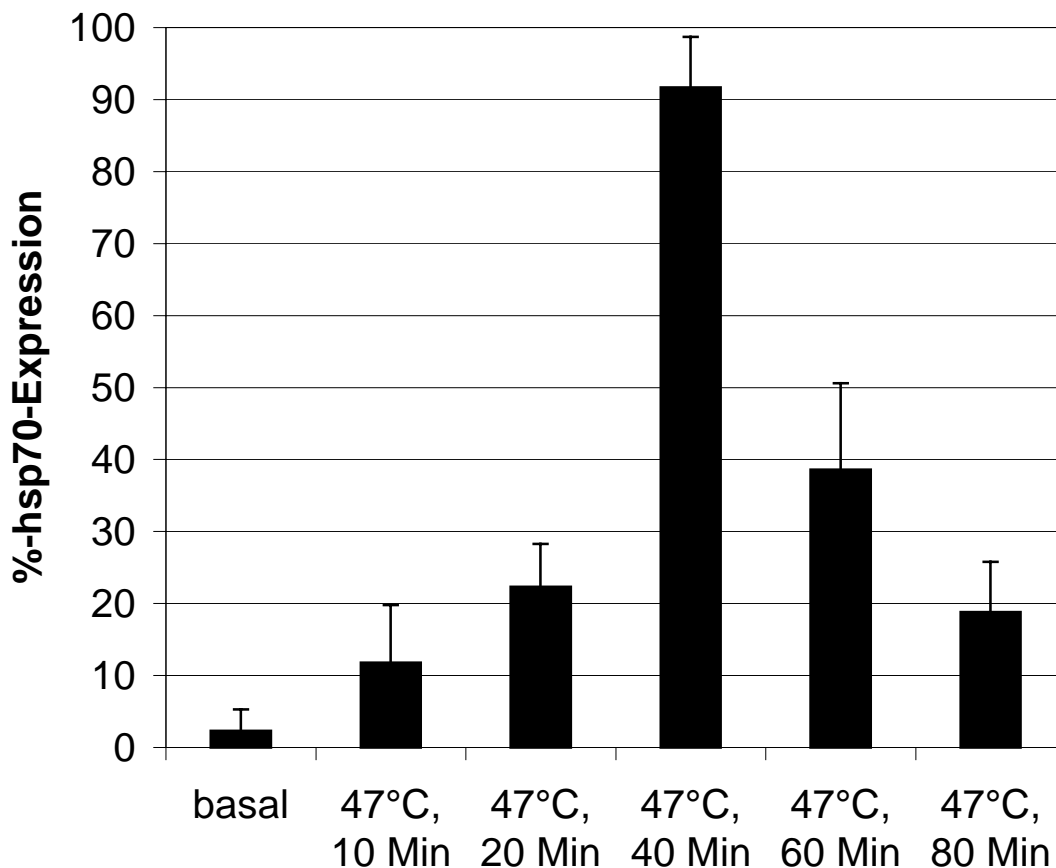


Abbildung 14: Abhängigkeit der hsp70-Expression von der Dauer

Zum anderen haben wir die Abhängigkeit der hsp70-Expression von der Temperatur der Hitzestimulation untersucht.

Für jeweils 40 Minuten wurden die einzelnen Proben bei den unterschiedlichen Temperaturen im Hitzeschrank belassen und nach Ablauf der Zeit auf ihren hsp70 Gehalt gemessen.

Hier zeigte sich für unsere Versuchsanordnung die maximale hsp70-Expression bei einer Temperatur von 47°C, deutlich zu sehen im Diagramm, wo auf der x-Achse die Temperatur und auf der y-Achse der Anteil hsp70-positiver Zellen in Prozent dargestellt sind.

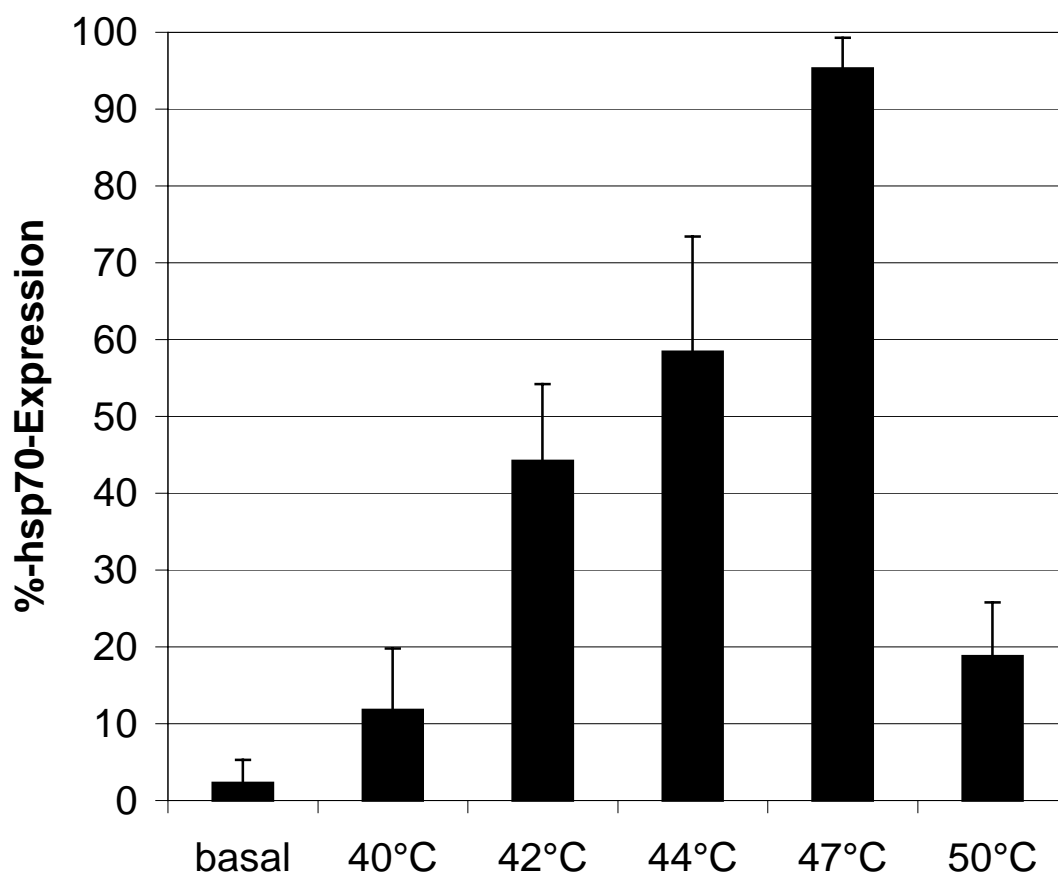


Abbildung 15: Abhängigkeit der hsp70-Expression von der Temperatur

Aus den oben beschriebenen Versuchen ergibt sich als optimale Stimulation für die Versuchsanordnung: 47°C Hitze für 40 Minuten. Dies wurde dann für die folgenden Versuche gewählt!

4.1.3 Die Zeitabhängigkeit der hsp70-Expression bei SB203580-Behandlung

SB203580 ist ein spezifischer Hemmstoff der Aktivität der p38-MAP-Kinase, die bei der Expression des Hitze-Schock-Protein 70 eine entscheidende Rolle spielt. Hemmt man nun diese p38-MAP-Kinase kommt es zu einer verminderten Stimulation des in der Kaskade folgenden Kinasen mit dem Effekt, dass weniger m-RNA überschrieben wird und weniger Protein gebildet wird.

In diesem Versuch wurden die Zellen wie bekannt präpariert, aber die Monozyten, die mit SB203580 inkubiert wurden, wurden vor der Erhitzung 1 Stunde lang mit SB203580 bei 37°C belassen und dann erst in den Wärmeschrank gestellt. Während dieser Zeit wurden die Zellen, die unstimuliert bleiben sollten und die, die später der Hitze ausgesetzt werden sollten bei 37°C unstimuliert in 5% FCS Kulturmedium belassen und dann zusammen mit den SB203580-behandelten Zellen erhitzt.

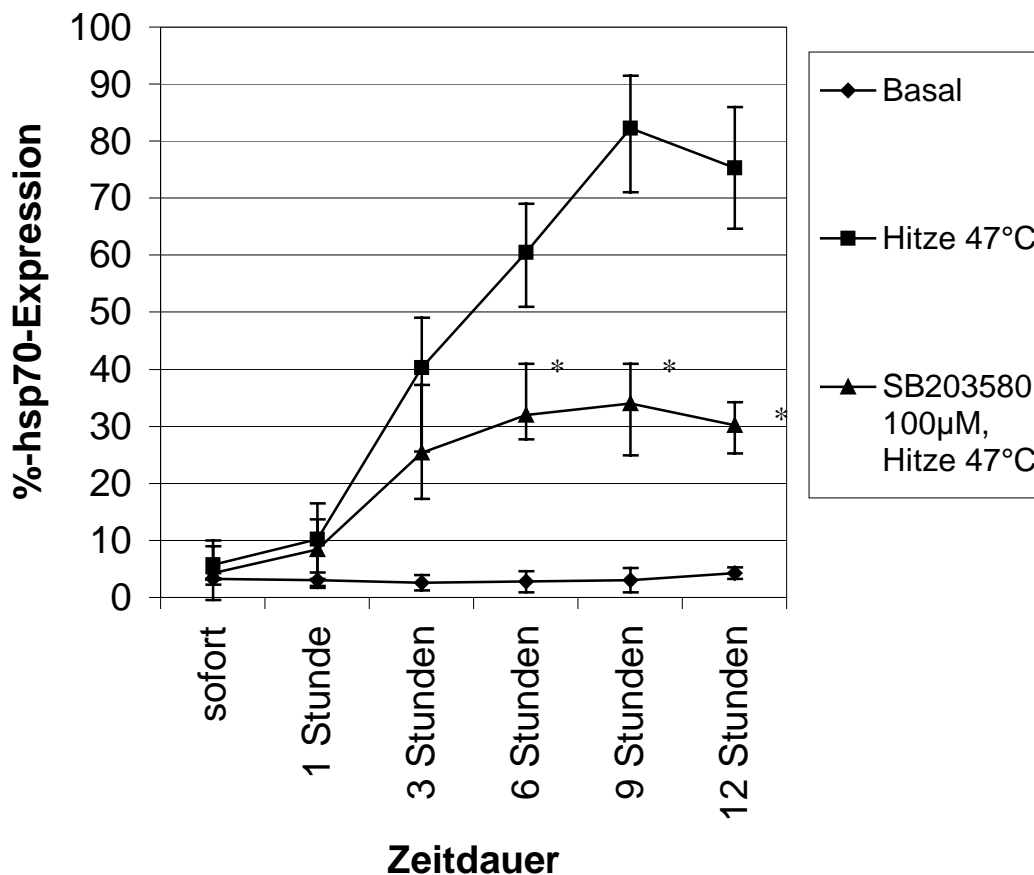


Abbildung 16: Zeitkinetik SB203580

Hier zeigt sich, dass nach 9 bis 12 Stunden die Hemmung der hsp70-Expression maximal war, bzw. nach 9 bis 12 Stunden keine weitere hsp70-Expression mehr zu erwarten war.

Die Hemmung des Hitze-Schock-Protein 70-Expression beträgt etwa 60% des maximalen Wertes.

4.1.4 Die Konzentrationsabhängigkeit der hsp70-Expression bei Behandlung mit SB203580

Nach der Präparation der Monozyten wurden diese mit SB203580 in den Konzentrationen 10 μ M, 25 μ M, 50 μ M, 75 μ M, 100 μ M eine Stunde stimuliert und dann wie oben beschrieben im Wärmeschrank erhitzt.

Nach 40 Minuten Hitze bei 47°C wurden die Zellen für 12 Stunden in einen 37°C Brutschrank gestellt, danach abgenommen und zeitgleich auf ihren hsp70 Proteingehalt gemessen.

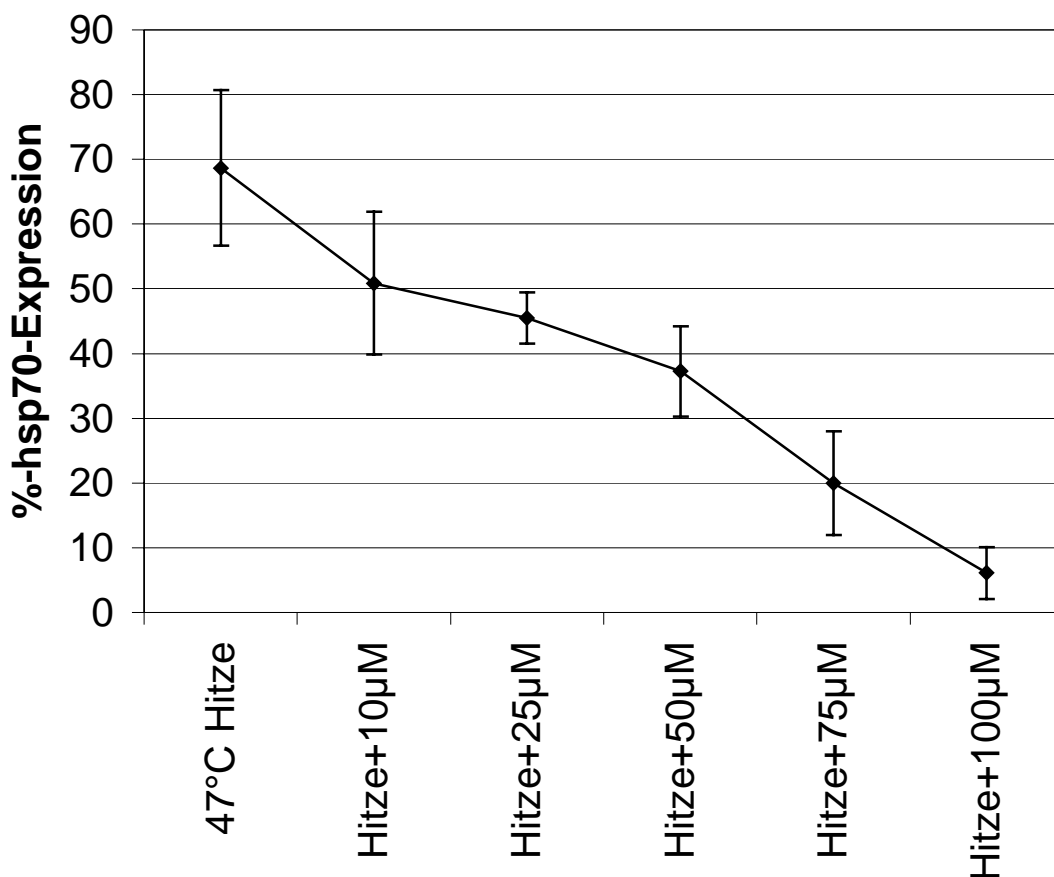


Abbildung 17: Konzentrationsabhängigkeit SB203580

Deutlich erkennbar ist, dass die Hemmung der Hitze-Schock-Protein 70-Expression konzentrationsabhängig ist, und die maximale Hemmung bei 100µM SB203580 ist.

Für weitere Versuche haben wir uns entschieden, diesen Wert zu benutzen.

4.1.5 Die Zeitabhängigkeit der hsp70-Expression bei Actinomycin D -Behandlung

Actinomycin D ist ein von Pilzen (*Streptomyces* Spezies) gewonnenes Antibiotikum mit antineoplastischen Eigenschaften (Walksmann, 1940, Brockmann, 1947). Es besteht aus einem trizyklischen Phenoxazon-Ring-System, das zwei identische Pentapeptidringe trägt. Actinomycin D bildet mit der doppelsträngigen DNA stabile Komplexe und inhibiert somit die RNA-Synthese aus DNA und hemmt unspezifisch die Proteinsynthese der Zellen. Bevorzugt zwischen Guanin-Cytosin-Basenpaaren interkaliert Actinomycin D in DNA, wobei sich der planare Trizyklus zwischen die Basenpaare schiebt.

In diesem Versuch wurden die Zellen wie bereits beschrieben präpariert, doch die Monozyten, die mit Actinomycin D zu inkubieren waren, wurden vor der Erhitzung 1 Stunde lang mit Actinomycin D bei 37°C belassen und erst dann in den Wärmeschrank gestellt. Während dieser Zeit wurden die Zellen, die unstimuliert bleiben sollten und die, die später der Hitze ausgesetzt werden sollten, als Kontrollen bei 37°C unstimuliert in 5% FCS Kulturmedium belassen und dann zusammen mit den Actinomycin D-behandelten Zellen erhitzt bzw. im 37°C Brutschrank belassen.

Eine Stunde nach Hitzestimulation wurde das Medium von den mit Actinomycin D inkubierten Zellen vorsichtig abgenommen und durch Kulturmedium ohne Stimulantien ersetzt. Actinomycin D induziert bei längerer Inkubation bei den Monozyten Apoptose.

Es zeigt sich in diesem Versuch, dass es unter Actinomycin D zu keiner gesteigerten Hitze-Schock-Protein 70-Expression mehr kommt. Die Werte entsprechen den basalen, unstimulierten Werten.

Die Transkriptionshemmung von Actinomycin D hat die Hitze-Schock-Protein 70-Expression fast vollständig inhibiert.

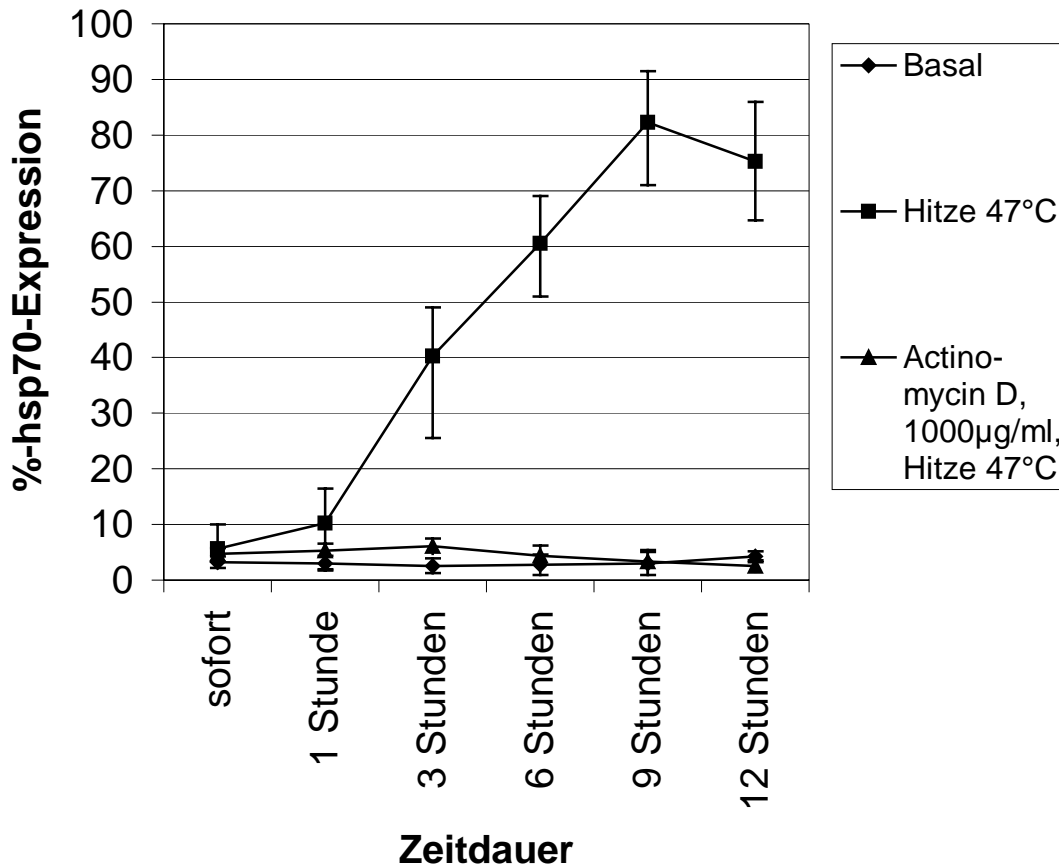


Abbildung 18: Zeitkinetik Actinomycin D

4.1.6 Die Konzentrationsabhängigkeit der hsp70-Expression bei Behandlung mit Actinomycin D

Nach der Präparation der Monozyten wurden diese mit Actinomycin D in den Konzentrationen 100ng/ml, 250ng/ml, 500ng/ml, 1000ng/ml, 2000ng/ml, eine Stunde stimuliert und dann wie oben beschrieben im Wärmeschrank erhitzt.

Nach 40 Minuten Temperaturerhöhung wurden die Zellen für 12 Stunden in einen 37°C Brutschrank gestellt (nach einer Stunde wurde das Medium vorsichtig abgenommen und durch unstimuliertes Kulturmedium ersetzt 11 Stunden später abgenommen und zeitgleich gemessen).

Diese Versuche zeigen, dass bereits bei geringen Konzentrationen von Actinomycin D eine deutliche Hemmung der Expression von hsp70 erfolgt. Die Hemmung der Hitze-Schock-Protein 70-Expression ist konzentrationsabhängig und die maximale Hemmung bei 1000ng/ml Actinomycin D.

Die folgenden Versuche wurden mit einer Konzentration von 1000ng/ml Actinomycin D durchgeführt. Bei diesem Wert ist im Vergleich zu 250ng/ml und 500ng/ml die Standardabweichung geringer und eine sichere Inhibition zu erreichen.

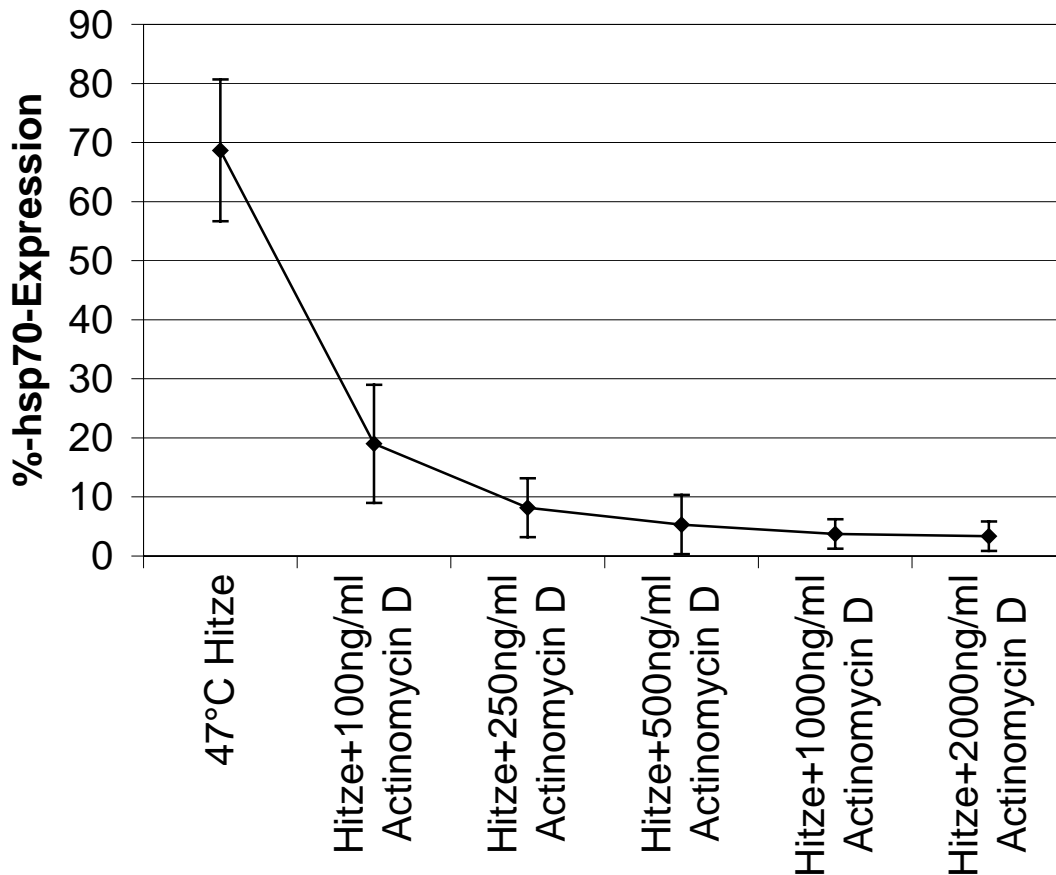


Abbildung 19: Konzentrationsabhängigkeit Actinomycin D

4.1.7 Die Zeitabhängigkeit der hsp70-Expression bei Cycloheximid -Behandlung

Cycloheximid ist ein Proteintranslationsinhibitor. Auf der zellulären Ebene blockiert Cycloheximid reversibel die Proteinsynthese auf der Ebene der Translation der messenger-RNA an zytosolischen 80S-Ribosomen. Dabei hat Cycloheximid keinen toxischen Effekt auf die Monozyten [138;157].

In diesem Versuch wurden die Zellen wie bekannt präpariert, aber die Monozyten, die mit Cycloheximid inkubiert wurden, sind vor der Erhitzung 1 Stunde lang mit Cycloheximid bei 37°C belassen und dann erst in den Wärmeschrank gestellt worden. Während dieser Zeit wurden als Kontrollen die Zellen, die unstimuliert bleiben sollten und die, die später der Hitze ausgesetzt werden sollten bei 37°C unstimuliert in 5% FCS

Kulturmedium belassen und dann zusammen mit den Cycloheximid -behandelten Zellen erhitzt bzw. im 37°C Brutschrank belassen.

Hier ist zu sehen, dass Cycloheximid die Hitze-Schock-Protein 70-Expression fast vollständig inhibiert. Eine gewisse Expression ist noch vorhanden, was auf eine nicht vollständige Blockade der Proteinsynthese hindeutet, doch die Reduktion ist deutlich.

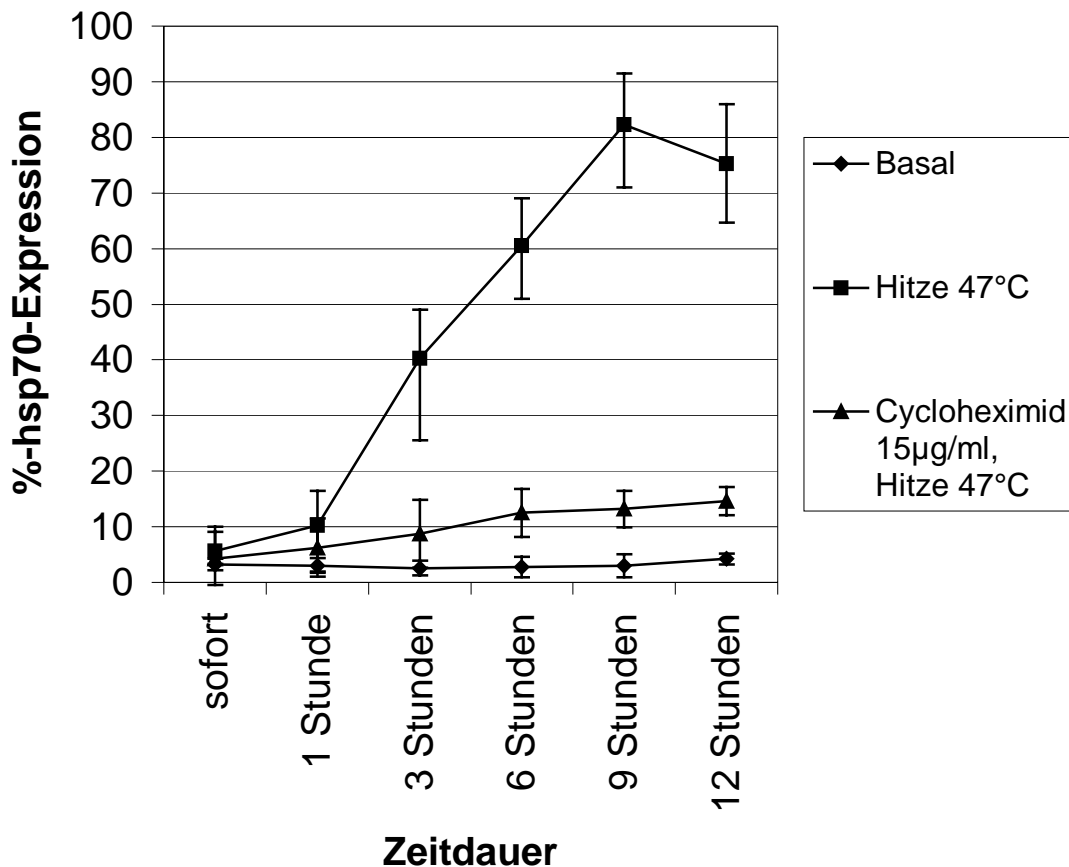


Abbildung 20: Zeitkinetik Cycloheximid

4.1.8 Die Konzentrationsabhängigkeit der hsp70-Expression bei Behandlung mit Cycloheximid

Nach der Präparation der Monozyten wurden diese mit Cycloheximid in den Konzentrationen 5µg/ml, 10µg/ml, 15µg/ml, 20µg/ml, 25µg/ml, eine Stunde stimuliert und dann wie oben beschrieben im Wärmeschrank erhitzt.

Nach 40 Minuten Temperaturerhöhung wurden die Zellen für 12 Stunden in einen 37°C Brutschrank gestellt. Nach einer Stunde wurde das Medium vorsichtig abgenommen und

durch unstimuliertes Kulturmedium ersetzt 11 Stunden später abgenommen und zeitgleich gemessen.

Die Hemmung der Hitze-Schock-Protein 70-Expression ist konzentrationsabhängig.

Eine deutliche Expressionshemmung ist bereits in niedrigen Konzentrationen sichtbar.

Eine fast vollständige Hemmung wurde bei 15µg/ml Cycloheximid erreicht, d.h. dass

bei diesem Wert die Proteinexpression nahezu der basalen Expression entspricht. Bei

5µg/ml oder 10µg/ml Cycloheximid ist noch eine signifikante Proteinexpression von

hsp70 zu erkennen. Die Standardabweichung ist bei 15µg/ml Cycloheximid geringer.

Wir haben uns entschieden, diesen Wert für weitere Versuche zu benutzen.

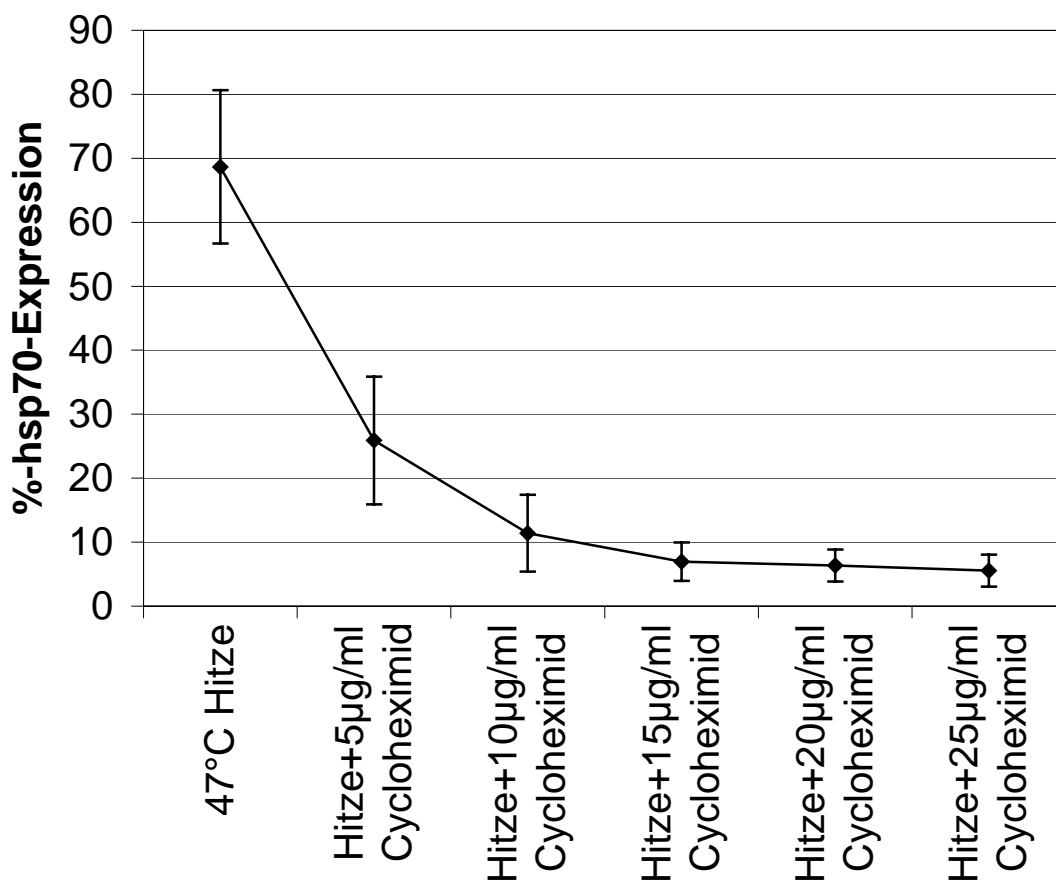


Abbildung 21: Konzentrationsabhängigkeit Cycloheximid

4.2 Basale Werte

4.2.1 Die basale hsp70-Expression beim Patienten vor und nach der Dialyse

Um zu überprüfen, ob die Dialyse einen Einfluss auf die basale Expression von Hitzeschock-Protein 70 hat, wurde Patienten unmittelbar vor der Dialyse und direkt nach der Dialyse Blut abgenommen und dieses präpariert.

Die Zellen wurden wie beschrieben für die FACS-Analyse vorbereitet und gemessen.

Hierbei zeigt sich, dass die Dialyse keinen Einfluss auf die Expression hat. Die Werte vor und nach der Dialyse sind nahezu identisch, einen stimulatorischen Effekt der Dialyse auf die Proteinexpression von hsp70 kann somit ausgeschlossen werden.

Wir haben uns entschieden das Blut der Patienten vor der Dialyse abzunehmen.

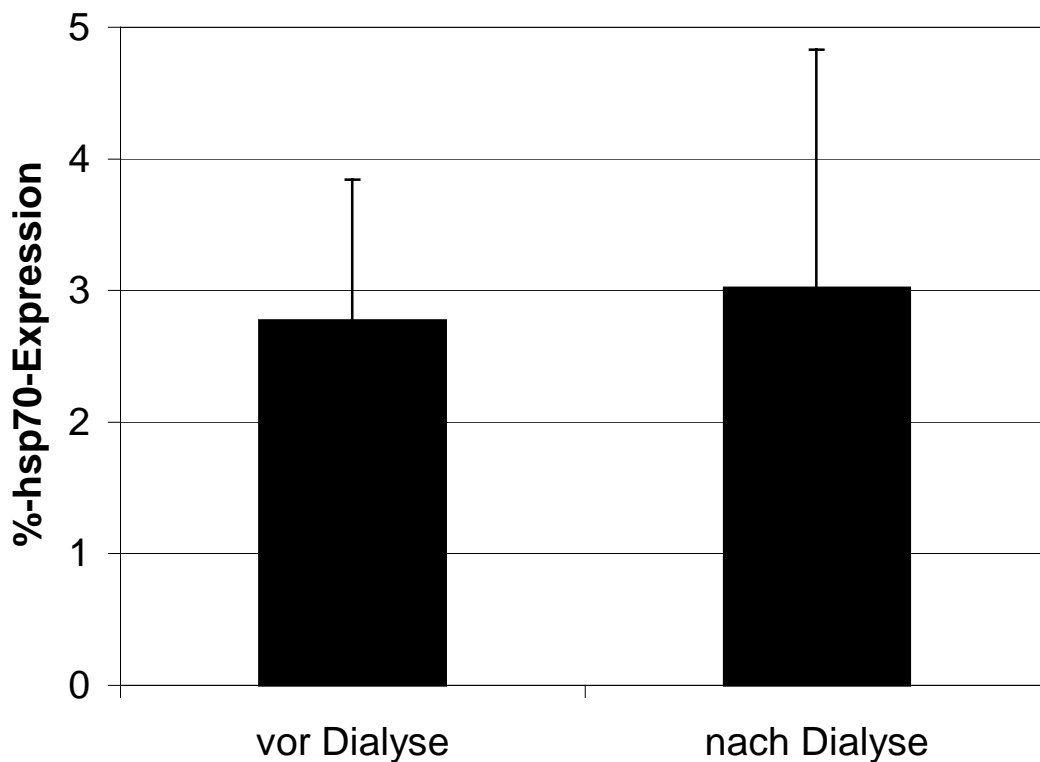


Abbildung 22: hsp70-Expression vor und nach der Dialyse basal

4.2.2 Die hsp70-Expression beim Gesunden und Patienten vor und nach der Dialyse: Hitzestimulation und Hitzestimulation mit SB203580-Behandlung.

Im folgenden Versuch wurde die Expression von Hitze-Schock-Protein 70 nach Hitzestimulation (47°C für 40 Minuten) und nach Hitzestimulation + SB203580-Behandlung (100µM) vor und nach der Dialyse gemessen, um eventuelle Unterschiede festzuhalten.

Die Zellen wurden wie beschrieben stimuliert und nach 12 Stunden gemessen. Verglichen werden diese Ergebnisse mit den Ergebnissen der Kontrollgruppe.

Keine Unterschiede sind sichtbar zwischen der Proteinexpression vor und nach der Dialyse. Die Ergebnisse sind identisch, die Dialyse hat wahrscheinlich keinen Einfluss auf die Hitze-Schock-Protein 70-Expressionsfähigkeit der Zellen.

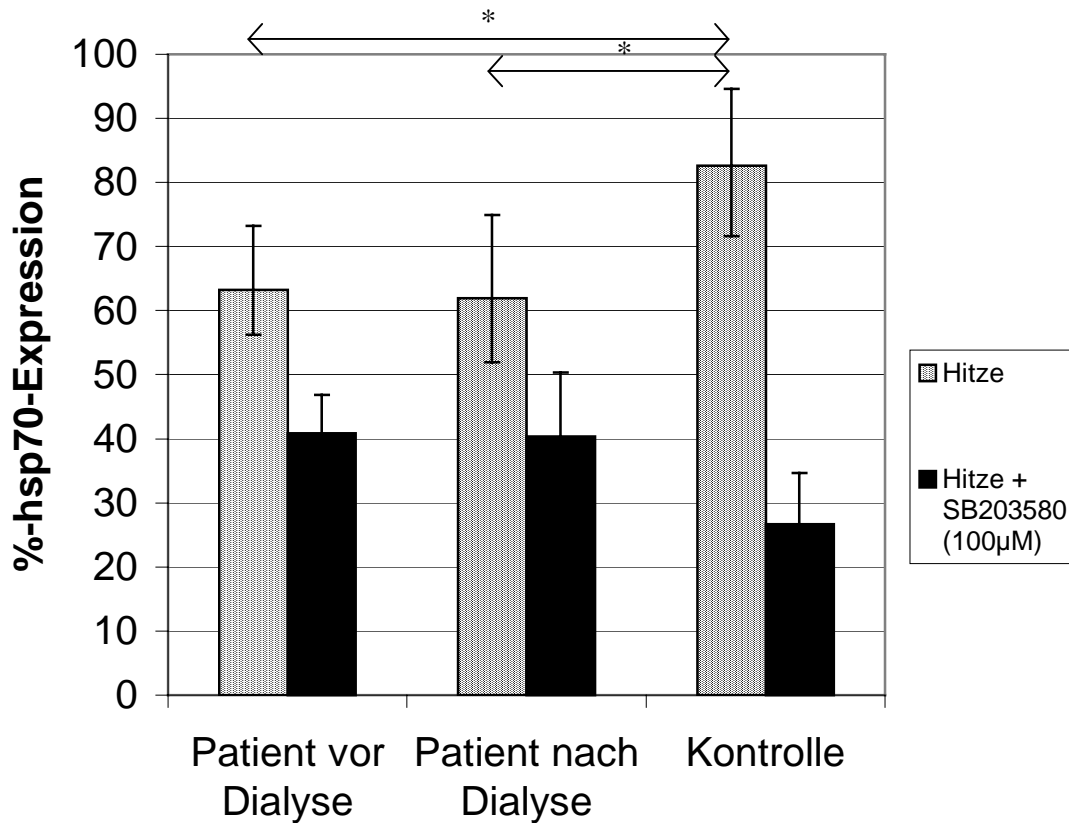


Abbildung 23: hsp70-Expression vor und nach Dialyse nach Hitze und SB203580

4.2.3 Die basale hsp70-Expression beim Gesunden und Patienten direkt nach Abnahme der Zellen und nach Präparation

Um den Einfluss der Präparation der Monozyten auf die Proteinexpression von Hitzeschock-Protein 70 ermessen zu können, wurden die Zellen direkt nach der Blutentnahme, das heisst vor der Adhärenz der Zellen (und somit nicht aufgereinigt durch die Adhärenz der Monozyten am Kunststoff der Kulturplatten) durchflusszytometrisch gemessen.

Die Graphik zeigt in den ersten beiden Balken die Werte für die Proteinexpression direkt nach Entnahme der Zellen, der dritte und vierte Balken stellen die hsp70-Expression nach erfolgter Zellpräparation dar.

Die Graphik für Patienten und Kontrollen zeigt keine signifikanten Unterschiede in den verschiedenen Ansätzen.

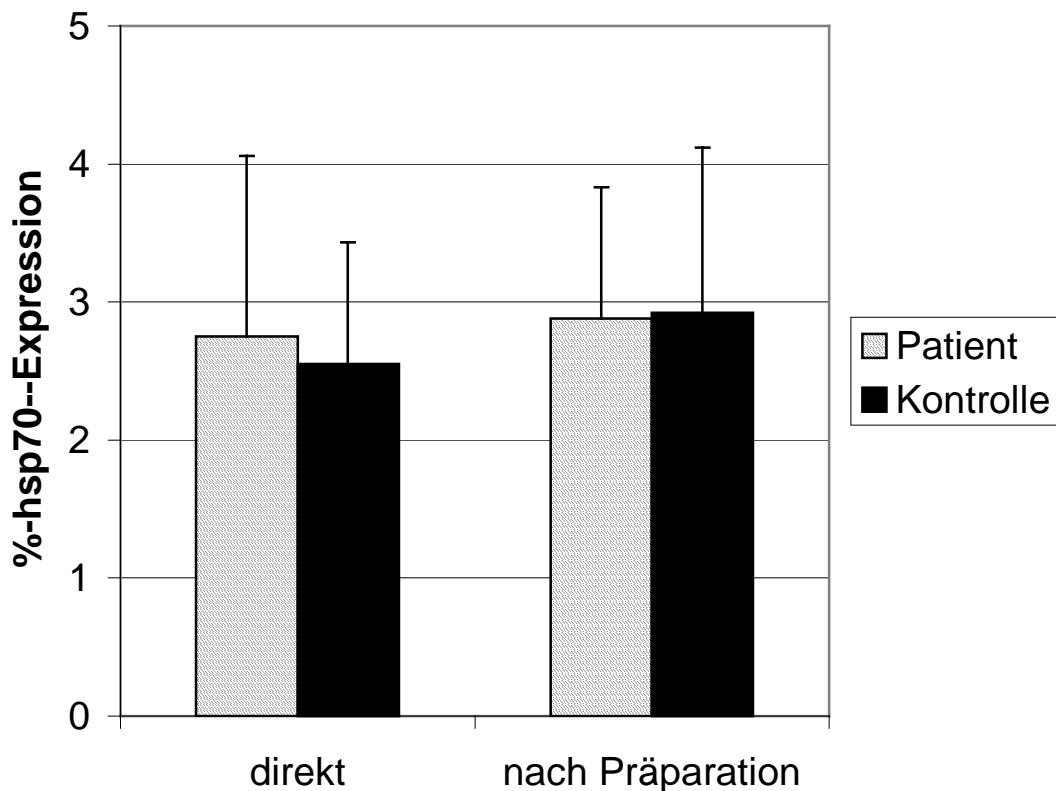


Abbildung 24: Expression vor und nach Adhärenz

4.3 Regulation der hsp70-Expression beim Patienten und Gesunden nach Stimulation

4.3.1 Die hsp70-Expression nach Erhitzung

In den hier dargestellten Versuchen wurden sowohl von Patienten wie auch von einer Kontrollgruppe Monozyten gewonnen und nach Präparation hitzestimuliert.

Die Werte der hitzestimulierten Proben werden mit den Messergebnissen der basalen, nicht stimulierten Monozyten verglichen.

Diese Versuche wurden gemacht, um die Proteinexpression der Patientenmonozyten und der Kontrollmonozyten nach einem externen Reiz vergleichen zu können.

Für jeweils 40 Minuten bei 47°C Hitze wurden die Zellen stimuliert, dann 12 Stunden bei 37°C im Wärmeschrank belassen und anschließend auf ihren hsp70-Proteingehalt gemessen.

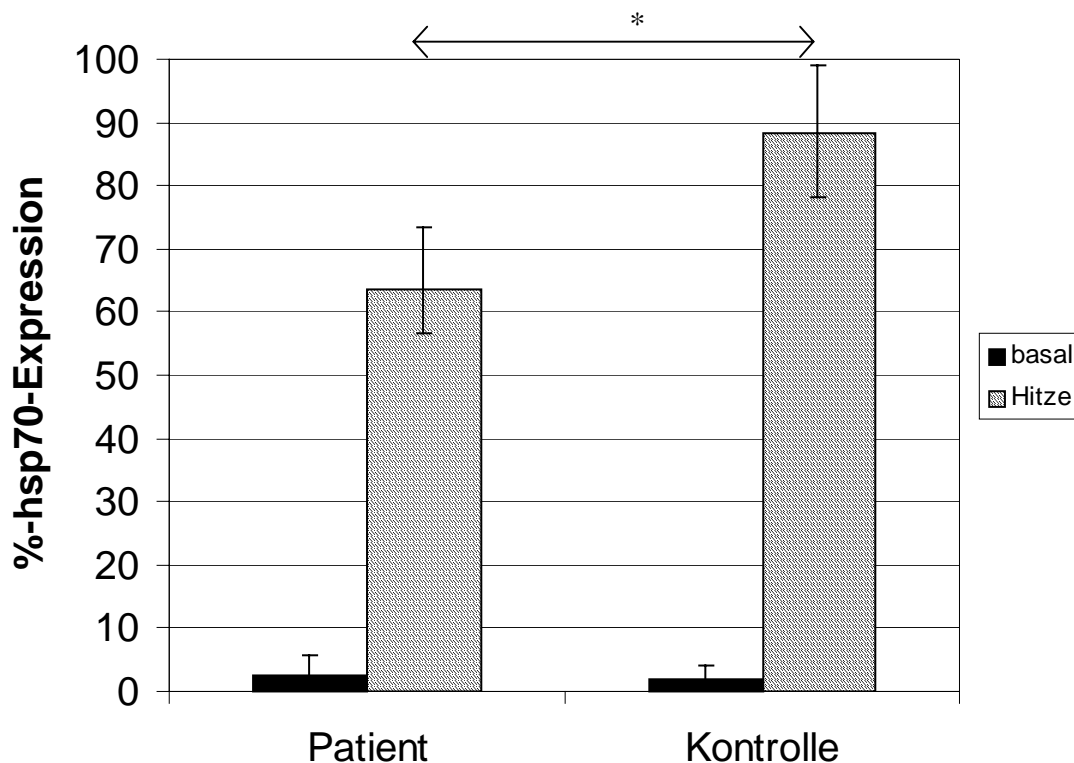


Abbildung 25: Expression beim Patienten und Kontrolle nach Hitzestimulation

Das Diagramm zeigt, dass es signifikante Unterschiede zwischen der Patienten- und Kontrollgruppe gibt.

Während die basalen Werte nahezu identisch sind, ist die Steigerung der hsp70-Expression bei der Patientengruppe durch die Hitzestimulation signifikant geringer als beim Kontrollkollektiv.

Die Kontrollen haben nach 12 Stunden etwa 86% hsp70-positive Zellen, wogegen die Patienten lediglich etwas mehr als 60% positive Monozyten haben. Dieser Unterschied von mehr als 20% ist signifikant ($p < 0,05$).

4.3.2 Die hsp70-Expression nach Erhitzung und der Effekt von SB203580

4.3.2.1 FACS-Analyse

Nachdem aus dem vorgehenden Versuch ein Unterschied der hsp70-Proteinregulierung erkennbar war, haben wir den Induktionsweg der hsp70-Kaskade gehemmt, um zu sehen, auf welcher Ebene die Regulationsunterschiede liegen. Durch SB203580, einem P38-MAP-Kinase-Inhibitor, wird die Aktivität der Kinase gehemmt.

Die Zellen wurden, wie oben beschrieben, behandelt und dann stimuliert. Eine Stunde vor Erhitzung erfolgte die Behandlung mit SB203580. Nach 12 Stunden wurden die Zellen abgenommen und wie beschrieben gemessen.

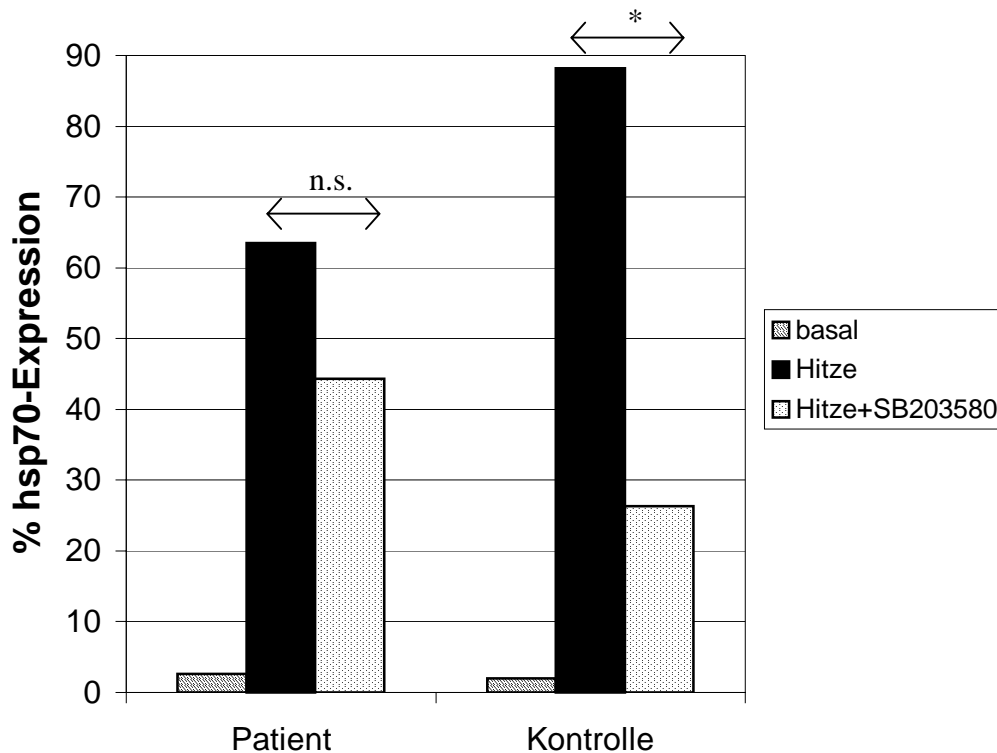


Abbildung 26: Vergleich Patient Kontrolle bei SB203580-Behandlung

Es zeigte sich, dass die Monozyten der Patienten nicht nur mit einem geringeren Anstieg der hsp70-Proteinexpression nach Hitzestimulation reagieren, sondern, dass auch die Hemmung der hsp70-Proteininduktion nicht im gleichen Maße durch SB203580 gemindert wird, wie dies bei der Kontrollgruppe der Fall ist.

Im Diagramm sind die Werte der Patienten und der Kontrollen miteinander verglichen. Der erste Balken entspricht dem basalen Wert, der zweite Wert dem Messergebnis nach Hitzestimulation und der dritte dem Wert der durch SB203580 gehemmten Zellen.

Während die Kontrollgruppe von ca.85% positiven Zellen auf etwa 25% positiver Zellen reduziert wird, was einer Herabsetzung um 70% entspricht, schaffen die Patientenmonozyten lediglich eine Reduktion um 30% von 63% positiven Zellen auf 45%. Diese Ergebnisse sind statistisch signifikant ($p > 0,05$).

Unten sind beispielhaft eine Dotplot und eine histogrammische Darstellung der Messergebnisse gezeigt.

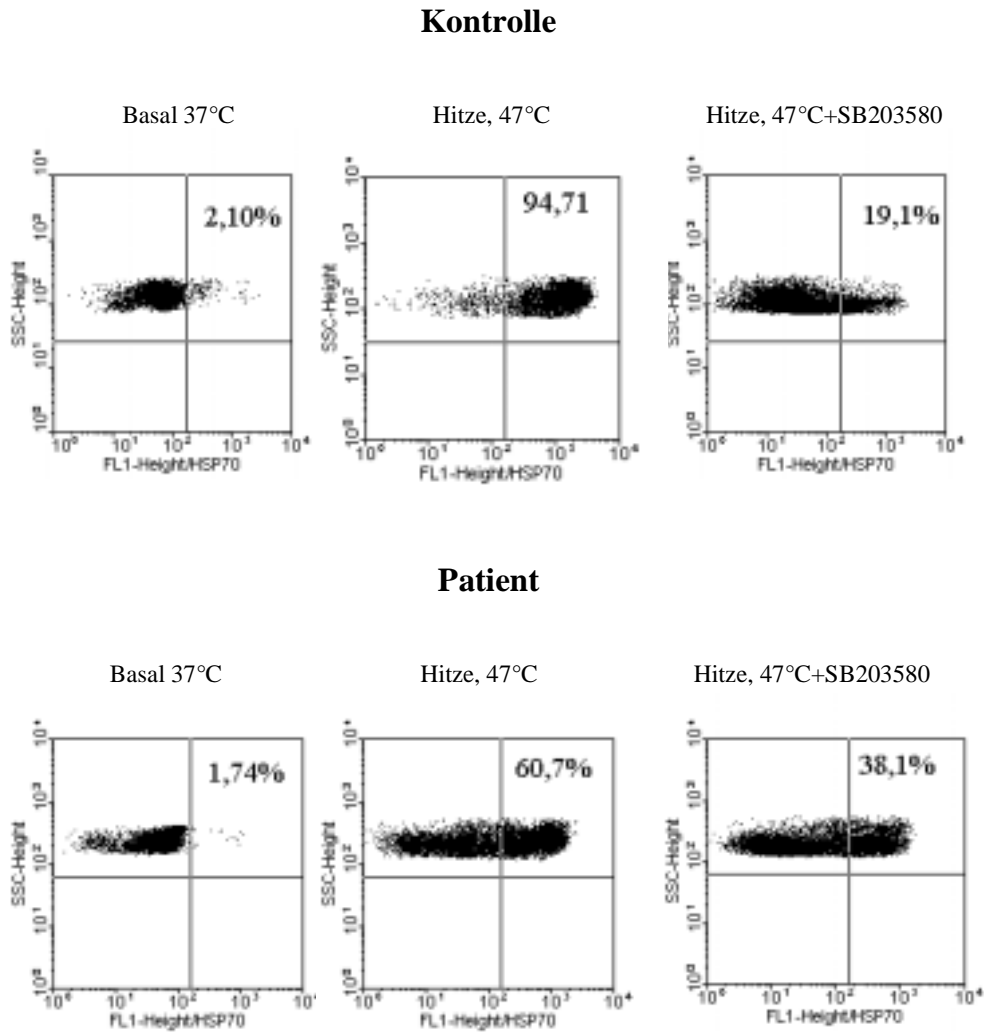
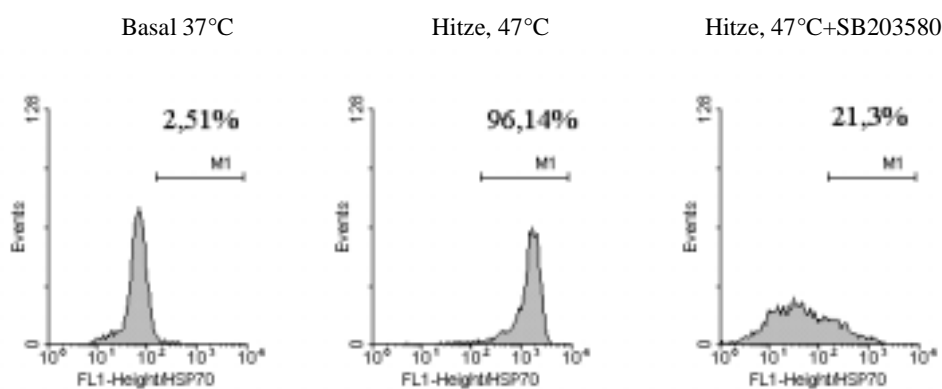


Abbildung 27: FACS-Analyse der hsp70-Expression beim Patienten und der Kontrolle basal, Hitze, SB203580, Dotplot-Darstellung.

Kontrolle



Patient

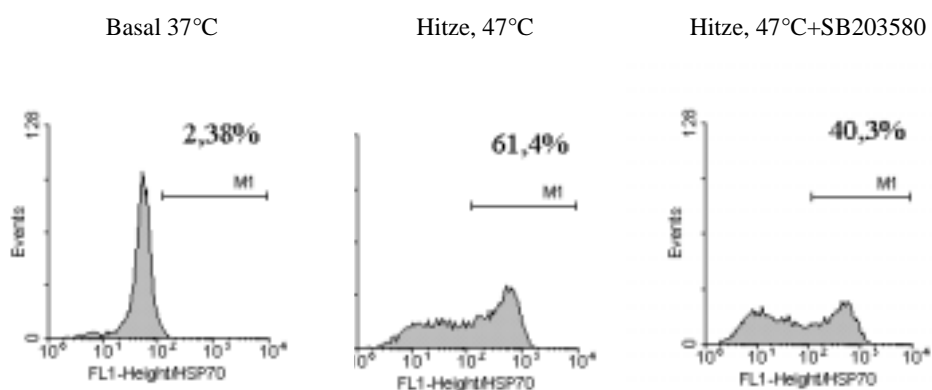


Abbildung 28: FACS-Analyse der hsp70-Expression beim Patienten und der Kontrolle basal, Hitze, SB203580, Histogramm

4.3.2.2 Western Blot

Die gleichen Untersuchungen sind auch mittels Western Blot überprüft worden. Für diese Messungen sind die gleichen Einstellungen wie bei der FACS-Analyse gewählt worden.

Bei gleichem Versuchsansatz ist unten ein exemplarischer Blot gezeigt: Patient mit einer Kontrolle; basal, hitzestimuliert und Hitzestimulation mit SB203580.



Abbildung 29: Hsp70-Expression beim Gesunden und Patienten (exemplarischer Western Blot) basal, Hitze, SB203580

Auch hier ist deutlich erkennbar, dass der Patient weniger hsp70 auf einen Hitzereiz hin bildet und auch die Inhibition der Hitzeinduktion nicht im gleichen Maße stattfindet wie bei der Kontrolle.

Das Balkendiagramm zeigt die quantitative Auswertung der Banden von 6 Western Blots mit dem Intelligent Quantifier.

Auf den Hitzestimulus wird beim Patienten weniger hsp70 pro Bande gemessen als bei der Kontrolle. Auch in der Messanalyse mittels Western Blot ist kein signifikanter Unterschied in der basalen Expression von hsp70 erkennbar.

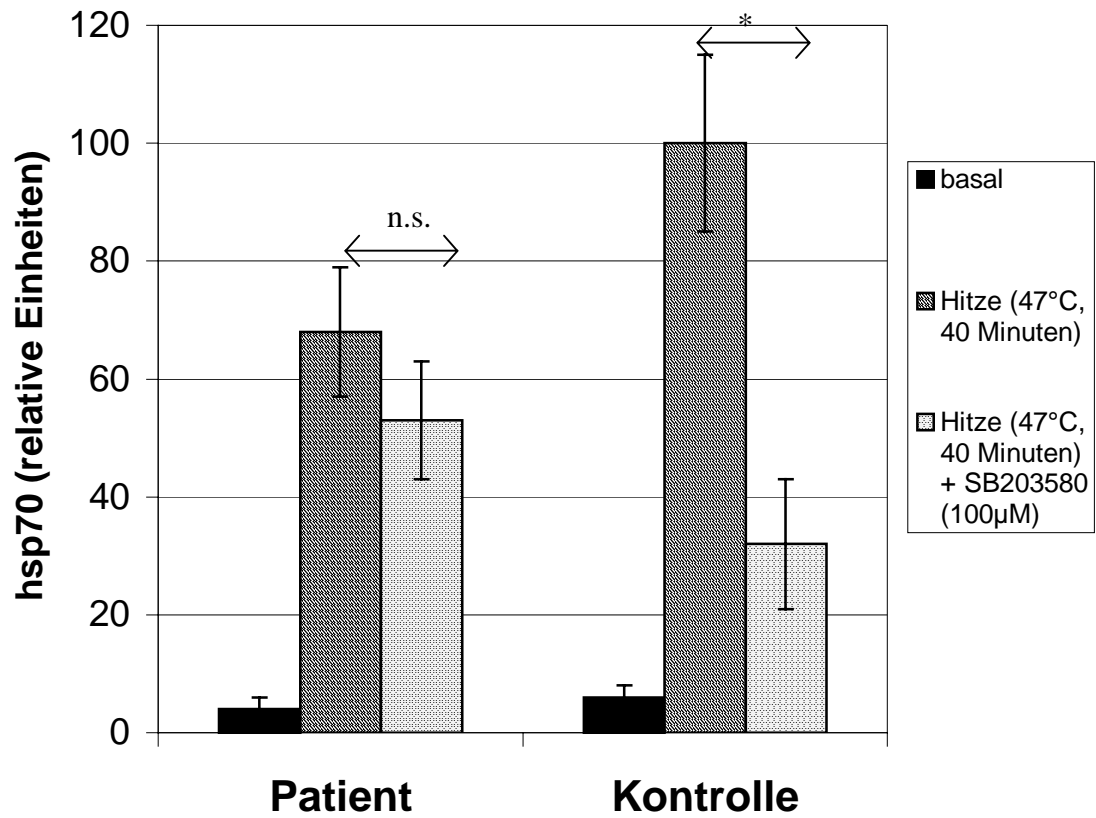


Abbildung 30: Vergleich Patient mit Kontrolle basal, Hitze, Hitze+SB203580. Western Blot.

4.3.3 Die hsp70-Expression und der Effekt von Actinomycin D

In diesem Versuch wollten wir den Effekt des Transkriptions-Inhibitors Actinomycin D auf die Proteinexpression von Patientenkollektiv und Kontrollgruppe prüfen.

Die Zellen wurden, wie oben beschrieben, behandelt und dann hitzestimuliert. Eine Stunde vor der vierzigminütigen Erhitzung erfolgte die Behandlung mit Actinomycin D. Nach 1 Stunde wurde das Medium vorsichtig abgenommen, um die Zellen nicht unnötig zu zerstören, und durch unbehandeltes 5% FCS-Medium ersetzt. Nach 11 Stunden wurden die Zellen abgenommen und gemessen.

Es sind keine Unterschiede zwischen den Patienten und der Kontrolle zu sehen. Beide Populationen sind nach Actinomycin D-Behandlung nicht mehr in der Lage, mehr als den basalen Wert von hsp70 zu exprimieren. Die Unterschiede zwischen den beiden Gruppen sind nicht signifikant.

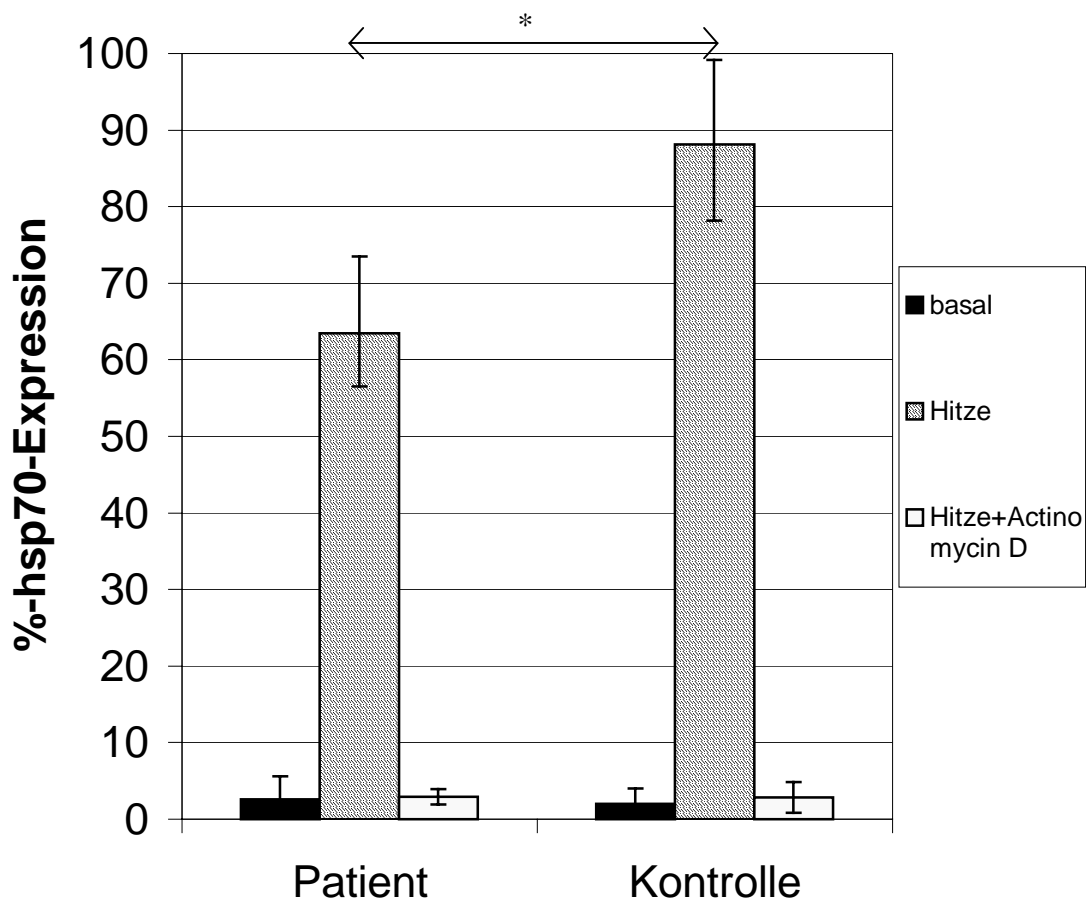


Abbildung 31: Vergleich Patient Kontrolle bei Actinomycin D-Behandlung

4.3.4 Die hsp70-Expression und der Effekt von Cycloheximid

Cycloheximid ist ein Protein-Translations-Inhibitor. Seinen Effekt auf die Patienten- sowie die Kontrollmonozyten wollten wir untersuchen, nachdem bei der Hemmung der Proteinexpression durch SB203580 deutlich signifikante Unterschiede festzustellen waren.

Die Zellen wurden, wie oben beschrieben, behandelt und dann hitzestimuliert. Eine Stunde vor Erhitzung erfolgte die Behandlung mit Cycloheximid. Nach 12 Stunden wurden die Zellen abgenommen und gemessen.

Auch hier zeigen sich keine signifikanten Unterschiede. Bei der Kontrollgruppe wie bei der Patientengruppe sistiert die hsp70-Protein-Expression fast vollständig.

Weder die eine noch die andere Gruppe ist nach Cycloheximid-Behandlung noch in der Lage, grosse Mengen an Protein auszubilden.

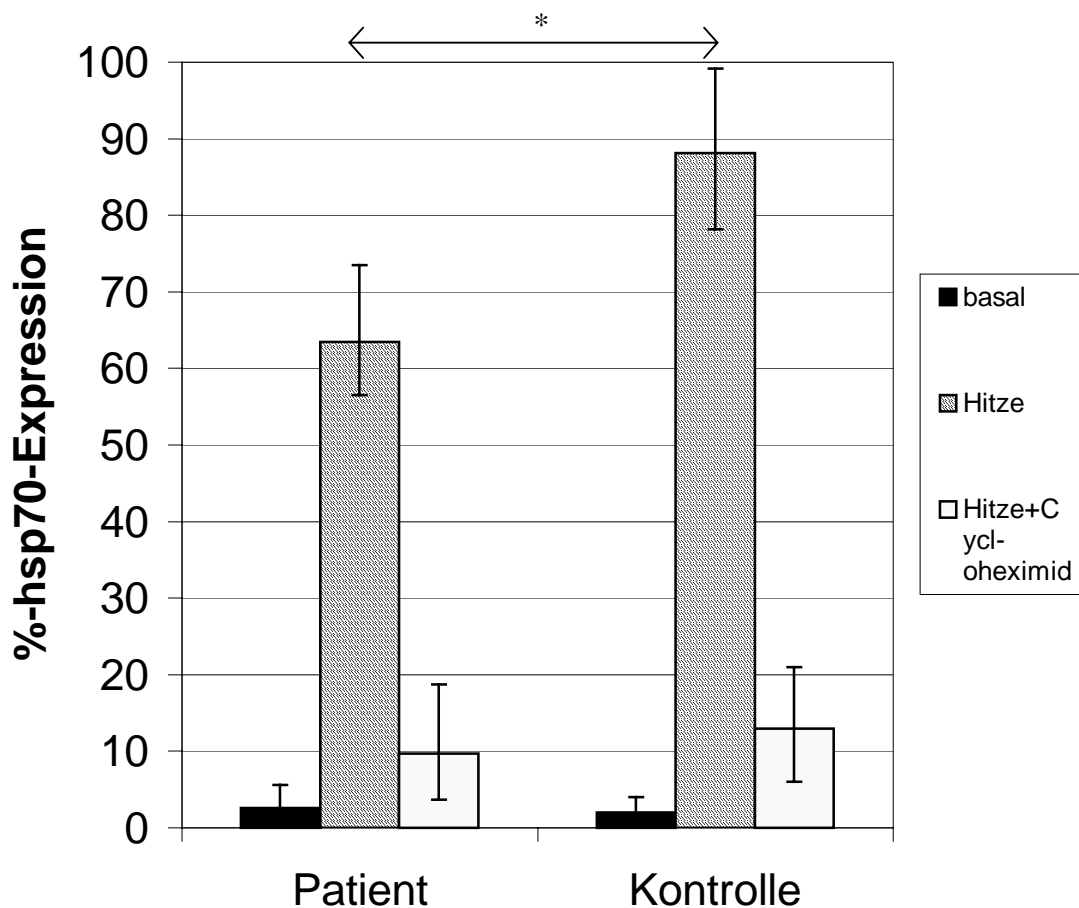


Abbildung 32: Vergleich Patient / Kontrolle bei Cycloheximid-Behandlung

5 Diskussion

Monozyten gehören zu den immunkompetenten Zellen. Sie sind für die körpereigene Abwehr zuständig.

Aus mehreren Arbeiten, die die Funktion der Monozyten bei chronischer Niereninsuffizienz untersucht haben, ist ersichtlich, dass die Abwehrfunktion der Monozyten und somit das Immunsystem gestört ist.

Hsp70 spielt eine zentrale Rolle in den Mechanismen, die der Zelle für die Abwehr von Erregern sowie den Eigenschutz zur Verfügung stehen. Für ein intaktes Immunsystem ist hsp70 notwendig.

Wir haben in dieser Arbeit die Regulation der hsp70-Induktion bei chronisch Niereninsuffizienten untersucht.

Als Stimulus für die hsp70-Induktion haben wir Hitze gewählt, weil sie zum einen immer unter gleich bleibenden Bedingungen eingesetzt werden kann und zum anderen weil kaum ein Stimulus so gut untersucht worden ist wie Hitze. Außerdem ist durch Hitze eine gleichbleibende, sichere, reproduzierbare hsp-Antwort gewährleistet.

Wir haben in dieser Studie Monozyten untersucht, weil sie zum einen gut verfügbar sind und somit breiten Untersuchungen zur Verfügung, zum anderen weil sie im Gegensatz zu andere Entzündungszellen wie Neutrophilen oder Lymphozyten über eine hohe konstitutive Expression von hsp70 sowie eine höhere Induzierbarkeit von hsp70 verfügen [117].

Die Zellen stammen zum einen, für die Vorversuche, aus sogenannten "Buffy-Coats" (Abzentrifugierte Leukozyten, die bei der Herstellung von Erythrozytenkonzentraten aus Blutspenden entstehen), zum anderen von freiwilligen Patienten und, in der Kontrollgruppe, von Gesunden. Das Blut wurde ohne Zeitverzögerung präpariert, um mögliche ungewollte Einflüsse zu minimieren.

Die Messung des Proteingehalts an hsp70 erfolgte durchflusszytometrisch, also im FACS, und im Western Blot.

5.1 Die basale Expression von hsp70

Unsere Versuchsergebnisse zeigen, dass sowohl die Patientenmonozyten als auch die Kontrollmonozyten eine basale Expression (das heißt unter unstimulierten Bedingungen) von hsp70 haben, es in der basalen Expression von hsp70 allerdings keinen Unterschied zwischen den Monozyten der chronisch Niereninsuffizienten bzw.

Dialysepflichtigen und der gesunden Kontrollen gibt (siehe Abbildung 24). Die Unterschiede zwischen den einzelnen Proben sind zum Teil deutlich (siehe Standardabweichung), aber niemals signifikant verschieden.

Beide Gruppen haben eine deutliche basale Expression, die darauf schließen lässt, dass hsp70 als Protein auch unter normalen, unstimulierten Bedingungen eine große Rolle spielt.

Das deckt sich mit publizierten Daten. Durand [38] et al. haben in ihrer Arbeit Monozyten von Patienten mit ARDS (adult respiratory distress syndrome) untersucht und ebenfalls keinen Unterschied in der basalen Expression von hsp70 finden können. Zu dem gleichen Ergebnis kommen Schroeder et al. [144] in ihrer Studie über die hsp70 Expression bei Patienten mit schwerer Sepsis. Sie fanden keine Unterschiede in der basalen Expression zwischen Kontrollen, Patienten mit schwerer Sepsis und Patienten nach schweren Operationen.

5.1.1 Der Einfluss der Dialyse auf die basale hsp70-Expression

Weiterhin haben wir den Einfluss der Dialyse auf die basale hsp70-Expression untersucht. Den Patienten wurde direkt vor und direkt im Anschluss an die Dialyse Blut entnommen und auf die basale hsp70-Expression untersucht. Dabei zeigt sich, dass in unserem Modell die Blutwäsche an sich keinen Einfluss auf die basale Expression hat (siehe Abbildung 22).

In vielen Studien [56] ist der zytokininduzierende Einfluss der Dialyse, speziell der Dialysemembranen, gezeigt worden. Komplementfaktoren und Gerinnungskaskade werden aktiviert. Wir konnten keinen Einfluss auf die hsp70-Produktion zeigen. In unseren Versuchen bleibt die Expression unverändert.

Daraus schließen wir, dass es weniger die Dialyse an sich, als die chronische Niereninsuffizienz ist, die die hsp70-Expression beeinflusst.

Einige Arbeitsgruppen haben den Einfluss der chronischen Niereninsuffizienz auf die Zytokinproduktion untersucht [86]. Das Thema wird kontrovers diskutiert, einige zeigen in diese, andere in jene Richtung.

Die Zytokinproduktion, als Marker für den Zustand der Aktivierung der Monozyten, wurde von verschiedenen Arbeitsgruppen unter verschiedenen Bedingungen gemessen. Die Ergebnisse sind sehr unterschiedlich. Einigen Gruppen konnte eine Zunahme, andere eine Abnahme oder Verringerung der Zytokinproduktion zeigen [13;22;55;60;65;99; 104;113;114;139;141].

Zusammengefasst herrscht keine Übereinstimmung über die veränderte basale Zytokinproduktion bei chronisch Niereninsuffizienten [86].

Das kann zum einen an den Unterschieden der untersuchten Zelltypen (Monozyten oder mononukleäre Zellen) liegen, oder an den unterschiedlichen Stimuli, die benutzt worden sind (LPS, H₂O₂, Hitze), oder an den Unterschieden im verwandten Test zur Messung der Zytokine (Bioassay, Elisa, RIA, PCR, FACS). Auch unterscheiden sich die Studien teils deutlich in ihrem Aufbau (Stimulation, Dauer, Zellgewinnung etc)

Diese Beobachtung stimmt mit unserer Schlussfolgerung, dass die Dialyse keinen Einfluss auf die basale Expression von hsp70 hat, überein.

Des Weiteren haben wir die induzierbare Form von hsp70 untersucht und nicht die ganze Familie der hsp70 mit ihren etwa 10 Untergruppen [108]. Die induzierbare Form hat in dieser Gruppe die größte Bedeutung bei der Körperabwehr und der zellulären Homöostase. Sie ist die am besten untersuchte Form und mengenmäßig den anderen Untergruppen überlegen. Für Untersuchungen ist sie verhältnismäßig leicht zugänglich.

5.1.2 Der Einfluss der Zellpräparation auf die basale hsp70-Expression

Da auch die Präparation der Zellen für diese sicherlich einen zusätzlichen Stress bedeutet, haben wir den Einfluss der aufwendigen Zellpräparation auf die Proteinexpression untersucht (siehe Abbildung 24).

Unsere Daten zeigen, dass dieser Vorgang sich nicht in einer erhöhten Expression von hsp70 niederschlägt, somit in der gewählten Versuchsanordnung unbedeutend ist.

5.2 Induzierbarkeit der hsp70-Expression

5.2.1 Induzierbarkeit unter Hitze

Das Hitze-Schock-Protein 70 übernimmt wichtige Aufgaben bei verschiedenen Regulationsmechanismen der zellulären Homöostase. Gerade bei Angriffen auf das innere Gleichgewicht der Zellen ist ein hsp-Antwort zu erwarten.

Wir haben die Reaktion der Monozyten von Patienten und Kontrollen auf eine Stresssituation untersucht und miteinander verglichen.

Der von uns gewählte Stimulus Hitze ist weit gebräuchlich. 47°C Temperatur bei 40 Minuten Dauer haben wir nach ausführlichen Voruntersuchungen an gesunden Spendern als die Temperatur und Dauer ermittelt, bei denen die deutlichste und sicherste hsp-

Induktion zu messen war, ohne die Zellen nennenswert zu schädigen (siehe Abbildungen 13, 14, 17). Eine Temperaturerhöhung oder Verlängerung der Dauer führten nicht zu einer weiteren hsp70-Proteinsynthese, sondern schädigten die Zellen in ungewünschtem Ausmaß. Eine zu geringe Temperatur oder Dauer der Hitzeinwirkung hatten nicht den gewünschten Effekt der maximalen hsp70-Produktion.

Wie oben beschrieben, ist die basale Expression bei Patienten und Gesunden identisch. Die beiden Gruppen unterscheiden sich allerdings, wie die Abbildung zeigt, deutlich in ihrer Induzierbarkeit (siehe Abbildung 25). Wie aus dieser Abbildung hervorgeht, ist das Patientenkollektiv nicht in der Lage, im Vergleich zu Gesunden, auf den noch zusätzlich auftretenden Stressfaktor „Hitze“ mit einer adäquaten Induktion von hsp70 zu reagieren. Zwar reagieren die Zellen der Dialysepflichtigen mit einer hsp-Antwort, allerdings nicht in dem Maße, wie Gesunde es tun. Sie sind lediglich zu einer um 32% geringeren Expression als die Kontrolle fähig.

Das Ergebnis der beiden oben bereits genannten Studien [38;144] ist identisch: Die Monozyten sind während ARDS (adult respiratory distress syndrome) und Sepsis nicht in der Lage, auf einen zusätzlichen Stress mit einer adäquaten hsp70-Antwort zu reagieren. In beiden Fällen handelt es sich um Erkrankungen mit gestörten Immunabwehr und daraus folgender erhöhter Infektionsrate.

Eine unzureichende Induktion von hsp70 kann zur zellulären Malfunktion beitragen. Es ist bekannt, dass hsp70 vor Apoptose schützt [25;135;148]. Es konnte nachgewiesen werden, dass Monozyten chronisch Niereninsuffizienter eine erhöhte Apoptoserate haben [63]. Die Erklärung hierfür kann die schlechtere Induzierbarkeit von hsp70 sein. Infektionen, die bei Dialysepflichtigen deutlich häufiger auftreten als bei Gesunden, gehören zu den am meisten gefürchteten Komplikationen bei der chronischen Niereninsuffizienz und sind nach den kardiovaskulären Komplikationen die häufigste Todesursache [12;15;45;102;120].

Im Immunsystem spielt hsp70 eine wesentliche Rolle. Körperabwehr, Infektabwehr, sowie Immunantwort sind auf vielfältige Art und Weise von hsp70 abhängig [6;43;80;107;161].

Bei der Antigenpräsentation [26;31;46;137;158], der Abwehr oxidierender Substanzen bei der Lyse, Radikalen und oxidativer Metaboliten =ROS (reactive oxygen species) während Infektionen und damit während einer Entzündung [61;115;155;162], vor allem

in Monozyten [35;36] , der Proteinfaltung [2;109;146] , der Homöostase der Zelle [73;136] , oder bei der Apoptose [7;25] spielt hsp70 eine dominante Rolle.

Sieht man all diese Funktionen des hsp70, so wird klar, warum bei chronisch Niereninsuffizienten Infektionen häufiger auftreten und schwerwiegender sein können.

Das Zusammenspiel zwischen hsp70 und Monozyten ist vielfältig und in viele Prozesse des Immunsystems eingebunden. Die mangelnde hsp70-Antwort der Monozyten bei dialysepflichtigen Patienten kann viele der Dysfunktionen erklären.

5.2.2 Der Einfluss der Dialyse auf die Induktions der hsp70-Expression

Wir haben untersucht, inwiefern sich das Verhalten der Monozyten, auf einen exogenen Stress mit einer hsp70-Antwort zu reagieren, im Verlauf der Dialyse verändert (siehe Abbildung 23).

Die Induzierbarkeit von hsp70 in Monozyten chronisch Dialysepflichtiger wird durch eine Dialyse nicht verändert. Daraus lässt sich schließen, dass es weniger die Dialyse als die chronische Niereninsuffizienz ist, die für die deutlich veränderte hsp70-Expression verantwortlich ist.

5.3 Hemmung der Induktion durch Cycloheximid, Actinomycin D und SB 203580

In den oben beschriebenen Versuchen hat sich ein sehr deutlicher Unterschied in der Induzierbarkeit der hsp70-Expression gezeigt. Daraus schließen wir, dass es in der Regulation der monozytären hsp70-Induktion Verschiedenheiten zwischen den Monozyten chronisch niereninsuffizienter Patienten und gesunden Kontrollen gibt.

Um zu untersuchen, auf welcher Ebene der Zellregulation sich der Defekt in der mangelnden Induzierbarkeit der Patienten befindet, oder wo sich die Proteinsynthesewege unterscheiden, haben wir die Proteinproduktion auf verschiedenen Ebenen gehemmt. Zum einen die Proteintranslation durch Actinomycin D und die RNA-Synthese durch Cycloheximid, zum anderen die p38MAP-Kinase spezifisch durch SB203580.

5.3.1 Cycloheximid

Cycloheximid ist ein Proteintranslationsinhibitor. Auf der zellulären Ebene blockiert Cycloheximid reversibel die Proteinsynthese auf der Ebene der Translation der

messenger-RNA an zytosolischen 80S-Ribosomen. Dabei hat Cycloheximid keinen toxischen Effekt auf die Monozyten [138;157] .

Diese Eigenschaft macht Cycloheximid zu einem weit verbreiteten Werkzeug bei der Untersuchung der intrazellulären Prozesse [110;145] . In Monozyten ist Cycloheximid in der Lage, die hsp70-Synthese zu blockieren [82] .

In unseren Versuchen haben wir gezeigt, dass der Einsatz von 15µg Cycloheximid in einem Zeitfenster von 12 Stunden praktikabel ist.

Ein Unterschied zwischen den beiden Gruppen lässt sich nicht feststellen, was den Rückschluss erlaubt, dass chronisch Niereninsuffiziente und Gesunde nach wie vor die gleiche Endstrecke der Proteinsynthese haben.

5.3.2 Actinomycin D

In Monozyten lässt sich so die hsp70-Proteinsynthese durch Actinomycin D vollständig blockieren [14;74;82] .

Die Zellen wurden vor Hitzeinkubation (40 Minuten bei 47°C) 1 Stunde mit Actinomycin D behandelt. Die Proteinmessung erfolgte nach 12 Stunden.

Aus unseren Ergebnissen geht hervor, dass sowohl die chronisch Niereninsuffizienten als auch die Kontrollen nach Actinomycin D-Behandlung nicht mehr in der Lage waren, hsp70 zu bilden. Die hsp70-Proteinsynthese kommt vollständig zu Erliegen (siehe Abbildung 30). Dieser Effekt ist bei beiden Gruppen gleich, so dass auch hier erlaubt ist zu behaupten, die Regulation der hsp70-Proteinexpression auf der Ebene der RNA-Synthese sei identisch .

5.3.3 SB203580

SB 203580 ist ein Pyridinimidazol, von dem bekannt ist, dass es selektiv die katalytische Aktivität der p38-MAP-Kinase hemmt.

Unsere Versuche zeigen, dass der Einsatz von 100µM SB 203580 in einem Zeitfenster von 12 Stunden optimal ist (siehe Abbildung 16 und 17).

Die Zellen wurden mit SB 203580 inkubiert, dann hitzestimuliert (47°C für 40 Minuten) und nach 12 Stunden durchflusszytometrisch auf den hsp70-Gehalt gemessen.

SB 203580 bindet an die aktive (phosphorylierte) und inaktive Form mit gleicher Affinität [160] . Es konkurriert mit ATP um die Bindestelle und verhindert so die Aktivierung von p38-MAP-Kinase, ohne selber einen aktivierenden Effekt auf p38-

MAP-Kinase zu haben [10;49;160] . SB 203580 hat auf die Zellen keine toxischen Effekte.

Die „mitogen-activated-protein-kinase“ (MAPK) ist eine Seronin/Threonin Proteinkinase, die von verschiedenen Entzündungsmediatoren, Zytokinen oder Stresstimuli aktiviert wird. Die Kaskade ist aus drei Enzymen aufgebaut, die die Signale von extrazellulär erhalten und die resultierende Genexpression regulieren [24;29;103] .

Die MAPK ihrerseits wird von einer MAPK-Kinase aktiviert, diese von einer MAPKK-Kinase (MAPKKK) (gehört zu der Gruppe der MLK (mixed lineage kinase)).

Die p38-MAP-Kinase wird durch zweifache Phosphorylierung (an Thr180 und Tyr182) durch die MAPK-Kinase 6 (MKK6) aktiviert [40;58;147] .

Das physiologische Substrat der p38-MAP-Kinase ist die MAPKAP K2/3, die phosphoryliert wird [132] .

SB 203580 hemmt die p38-MAP-Kinase, indem sie die katalytische Aktivität hemmt und nicht die Phosphorylierung, das heisst, ihre Aktivierung (SB 203580 hemmt nur die Aktivität und nicht die Aktivierung). Die MAPKAP K2 (MAP-Kinase activated protein kinase 2) phosphoryliert ihrerseits den HSF (heat shock transcription factor), der für die Induktion der Gentranskription von hsp70 verantwortlich ist. Der genaue Mechanismus ist allerdings noch weitestgehend unbekannt [132] .

Wie in der Einleitung bereits beschrieben, legen die phosphorylierten HSF sich dann zu Trimeren zusammen [89] , die in den Nukleus gelangen und dort an die HSE (heat shock element) in der Promotorregion des hsp-Gens binden. Hier werden sie durch HSF-Kinasen nochmals phosphoryliert [121] . Jetzt wird die Transkription des Genabschnitts initiiert, worauf in einem anderen Schritt die Translation erfolgt. Die neusynthetisierten hsp70-Proteine binden, im Cytosol angekommen wieder an HSF um eine weitere Produktion zu vermeiden (negative Rückkopplung).

Stress

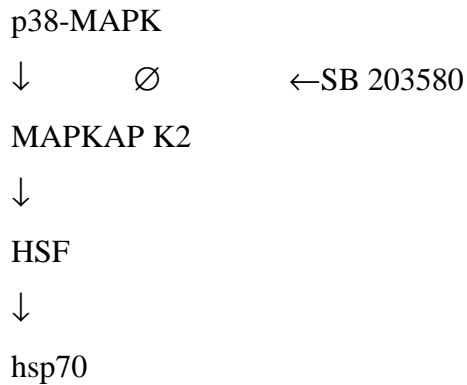
↓

MAPKKK

↓

MKK6

↓



Von der p38-MAP-Kinase ist bekannt, dass sie an der Regulation von Zytokinen IL-1 und TNF [92] beteiligt ist. Bei Monozyten konnte durch die Hemmung der p38-MAP-Kinase die Zytokinproduktion unterdrückt werden [27;91;92] .

So ist es nicht verwunderlich, dass die p38-MAP-Kinase ein potentielles Target bei entzündlichen Dysfunktionen bietet, wie nach Transplantationen.

Aus den Abbildungen 19, 20, 21 und 22 ist ersichtlich, dass es bei der Hemmung durch SB203580 deutliche Unterschiede zwischen Patient und Kontrolle gibt: während bei der Kontrollgruppe eine starke Reduktion der hsp70-Expression stattfindet, ist die hsp-Produktion der Patientenmonozyten nicht im gleichen Maße verringert. Bei den Kontrollen ist eine effektive Hemmung möglich, bei den Patienten nicht.

Unsere Ergebnisse zeigen, dass nach Hemmung der p38-MAP-Kinase bei der Kontrollgruppe die Expression von hsp70 deutlich supprimiert ist. Das zeigt, dass für die Induktion von hsp70 der Weg über die p38-MAP-Kinase ein wichtiger Signaltransduktionsweg ist. Über die p38-MAP-Kinase wird die Stressantwort der Zelle gesteuert und reguliert. Diese Ergebnisse decken sich mit der Literatur [52] .

Des Weiteren zeigen die Versuchsergebnisse, dass die Monozyten chronisch Niereninsuffizienter nach Blockierung der p38-MAP-Kinase zwar signifikant weniger hsp70 exprimieren, aber nicht in dem Maße wie die Kontrollgruppe. Dies lässt die Vermutung aufkommen, dass für die Regulation der hsp70-Expression nicht wie bei der Kontrollgruppe die p38-MAP-Kinase die Hauptrolle spielt, sondern andere Kinasen und Signalwege, da nach Blockierung der p38-MAP-Kinase immer noch eine deutliche Menge an hsp70 produziert wird.

Weder auf der Ebene der RNA-Synthese (durch die Hemmung mit Actinomycin D) noch auf der Ebene der Translation der messenger-RNA an zytosolischen 80S-Ribosomen (durch Hemmung mit Cycloheximid) haben wir Unterschiede zwischen

Monozyten Dialysepflichtiger und Kontrollen gefunden. Die deutlichen Unterschiede finden sich auf der Ebene der Induktion in der Kaskade der Kinasen.

Wie oben beschrieben, ist das Zusammenspiel der MAP-Kinasen (JNK, ERK, p38-MAP-Kinase) für die Zelle von großer Bedeutung und entscheidet über die Homöostase der Zelle. Bei den Monozyten chronisch Niereninsuffizienter ist diese Zusammenarbeit der Kinasen nicht in der Form wie bei Kontrollmonozyten reguliert. Andere Induktionswege und -kaskaden scheinen eine Rolle zu spielen.

Einige Arbeitsgruppen wiesen nach, dass unter anderem bei der Apoptose das Zusammenspiel zwischen ERK, JNK und MAPK über das Überleben der Zellen entscheidet [95;149] . So ist es denkbar, dass auch bei Dialysepflichtigen ein nicht vollständiges Zusammenspiel zwischen den einzelnen Kinasen herrscht, was dazu führt, dass die Zellen nicht mehr abwehrbereit sind.

Behaupten wir, dass bei Gesunden / Kontrollen die Induktion der hsp70 Expression über die p38-MAP-Kinase läuft, und, dass bei Monozyten Dialysepflichtiger andere Induktionswege genutzt werden, so lässt sich erklären, dass auch die Hochregulation von hsp70, das heisst die adäquate Reaktion der Zelle auf Hitze, beim Dialysepflichtigen gestört ist. Der Gesunde reguliert über p38-MAP-Kinase, der chronisch niereninsuffiziente Patient nicht in gleicher Form, so dass eine qualitativ minderwertige hsp70-Antwort die Folge ist.

5.4 Zusammenfassung

Unsere Ergebnisse zeigen deutlich, dass es bei der Regulation von hsp70 als Antwort auf einen Stress zwischen der Patienten und der Kontrollgruppe Unterschiede gibt.

Patientenmonozyten reagieren mit einer verminderten hsp70-Antwort im Vergleich zur Kontrolle.

Die hsp70-Induktion über p38-MAP-Kinase, die bei den Kontrollen fast vollständig durch SB 203580 blockierbar ist, kann von den Patienten lediglich ein wenig supprimiert werden, keinesfalls im gleichen Ausmaß wie die Kontrollen.

Wir schliessen daraus, dass bei den Patienten andere, insuffiziente, Induktionswege eine Rolle spielen als beim Gesunden. Diese Induktionswege sind allerdings nicht ausreichend für eine adäquate Antwort.

Durch die zentrale Rolle von hsp70 in der Infektabwehr, der Antigenpräsentation, der Aufrechterhaltung der zellulären Homöostase, der Proteinfaltung und -prozessierung ist

klar, dass eine Dysfunktion in diesem System weitreichende Folgen hat, die sich beim Dialysepflichtigen unter anderem in einer erhöhten Infektionsrate, gestörter Immunkompetenz, Störung der zellulären und humoralen Abwehr, mit einer mangelnden Antikörperbildung (z.B. nach Impfungen), einer eingeschränkten Interferonproduktion, verzögertem Erscheinen der Leukozyten am Entzündungsort, gestörter Phagozytose von Monozyten und einer eingeschränkten Makrophagen-FC-Rezeptorfunktion zeigt.

5.5 Ausblick

Für den dialysepflichtigen Patienten ist, wie in der Einleitung beschrieben, die erhöhte Infektionsrate ein großes Problem unter vielen.

Die von uns vorgestellten Ergebnisse geben einen Hinweis auf eine der Ursachen dafür. Ziel muss es sein das Leben und Überleben der Dialysepflichtigen zu verbessern. Eine adäquate Immunantwort der Zelle kann der Schlüssel zu einer geringeren Infektionsrate sein.

Neben der konsequenten Infektionsprophylaxe gibt es in Zukunft vielleicht Möglichkeiten in die zellulären Regulationsmechanismen einzugreifen, und das von uns festgestellte Defizit der Monozyten Dialysepflichtiger zu beheben oder zu vermindern.

Auch in Zukunft werden noch viele Untersuchungen gemacht werden müssen, um die Probleme der chronisch niereninsuffizienten Patienten zu verstehen und effektiv behandeln zu können.

Auf unseren Ergebnissen aufbauend sollten andere Kinasen, die in der Zellregulation eine Rolle spielen, untersucht werden, um die Induktionswege vor allem bei Dialysepflichtigen besser zu verstehen und die Unterschiede in den Zellregulationmechanismen darzustellen. Vor allem die p38MAP-Kinase sollte weiterführend betrachtet werden.

6 Literaturverzeichnis

1. From the Centers for Disease Control and Prevention. Outbreaks of gram-negative bacterial bloodstream infections traced to probable contamination of hemodialysis machines--Canada, 1995; United States, 1997; and Israel, 1997.
JAMA 279[9], 646-647.
2. Agashe, V. R.Hartl, F. U. (2000)
Roles of molecular chaperones in cytoplasmic protein folding.
Semin.Cell Dev.Biol. 11[1], 15-25.
3. Allon, M., Dansby, L., Shanklin, N. (1993)
Glucose modulation of the disposal of an acute potassium load in patients with end-stage renal disease.
Am.J.Med. 94[5], 475-482.
4. Amici, C., Giorgi, C., Rossi, A., Santoro, M. G. (1994)
Selective inhibition of virus protein synthesis by prostaglandin A1: a translational block associated with HSP70 synthesis.
J.Virol. 68[11], 6890-6899.
5. Andersen, L. W., Friedberg, M., Lokkegaard, N. (1984)
Naloxone in the treatment of uremic pruritus: a case history [letter].
Clin.Nephrol. 21[6], 355-356.
6. Anderson, K. M.Srivastava, P. K. (2000)
Heat, heat shock, heat shock proteins and death: a central link in innate and adaptive immune responses.
Immunol.Lett. 74[1], 35-39.
7. Bachelet, M., Adrie, C., Polla, B. S. (1998)
Macrophages and heat shock proteins.
Res.Immunol. 149[7-8], 727-732.
8. Bachelet, M., Mariethoz, E., Banzet, N., Souil, E., Pinot, F., Polla, C. Z., Durand, P., Bouchaert, I., Polla, B. S. (1998)
Flow cytometry is a rapid and reliable method for evaluating heat shock protein 70 expression in human monocytes.
Cell Stress.Chaperones. 3[3], 168-176.

9. Bachmann, J., Tepel, M., Raidt, H., Riezler, R., Graefe, U., Langer, K., Zidek, W. (1995)
Hyperhomocysteinemia and the risk for vascular disease in hemodialysis patients.
J.Am.Soc.Nephrol. 6[1], 121-125.
10. Baldassare, J. J., Bi, Y., Bellone, C. J. (1999)
The role of p38 mitogen-activated protein kinase in IL-1 beta transcription.
J.Immunol. 162[9], 5367-5373.
11. Bencini, P. L., Montagnino, G., Citterio, A., Graziani, G., Crosti, C., Ponticelli, C. (1985)
Cutaneous abnormalities in uremic patients.
Nephron 40[3], 316-321.
12. Bloembergen, W. E.Port, F. K. (1996)
Epidemiological perspective on infections in chronic dialysis patients.
Adv.Ren Replace.Ther. 3[3], 201-207.
13. Blumenstein, M., Schmidt, B., Ward, R. A., Ziegler-Heitbrock, H. W., Gurland, H. J. (1988)
Altered interleukin-1 production in patients undergoing hemodialysis.
Nephron 50[4], 277-281.
14. Bornman, L., Baladi, S., Richard, M. J., Tyrrell, R. M., Polla, B. S. (1999)
Differential regulation and expression of stress proteins and ferritin in human monocytes.
J.Cell Physiol 178[1], 1-8.
15. Bradley, J. R., Evans, D. B., Calne, R. Y. (1987)
Long-term survival in haemodialysis patients.
Lancet 1[8528], 295-296.
16. Brescia, M. J., Cimino, J. E., Appel, K., Hurwich, B. J. (1966)
Chronic hemodialysis using venipuncture and a surgically created arteriovenous fistula.
N.Engl.J.Med. 275[20], 1089-1092.
17. Buchmeier, N. A.Heffron, F. (1990)
Induction of Salmonella stress proteins upon infection of macrophages.
Science 248[4956], 730-732.
18. Carmichael (1994)

- renal itch. itch, mechanisms., 217-228.
19. Carpenter, C. B., Lazarus, J. M. (1999)
Dialyse und Transplantation bei der Therapie des akuten Nierenversagens.
Harrisons Innere Medizin. 14[272], 1791ff.
 20. Carton, J. A., Maradona, J. A., Nuno, F. J., Fernandez-Alvarez, R., Perez-Gonzalez, F., Asensi, V. (1992)
Diabetes mellitus and bacteraemia: a comparative study between diabetic and non-diabetic patients.
Eur.J.Med. 1[5], 281-287.
 21. Chenoweth, D. E., Cheung, A. K., Henderson, L. W. (1983)
Anaphylatoxin formation during hemodialysis: effects of different dialyzer membranes.
Kidney Int. 24[6], 764-769.
 22. Chollet-Martin, S., Stamatakis, G., Bailly, S., Mery, J. P., Gougerot-Pocidallo, M. A. (1991)
Induction of tumour necrosis factor-alpha during haemodialysis. Influence of the membrane type.
Clin.Exp.Immunol. 83[2], 329-332.
 23. Classen, Diehl, Kochsiek (1999)
Lehrbuch der Inneren Medizin. 141.
 24. Cobb, M. H., Goldsmith, E. J. (1995)
How MAP kinases are regulated.
J.Biol.Chem. 270[25], 14843-14846.
 25. Creagh, E. M., Carmody, R. J., Cotter, T. G. (2000)
Heat shock protein 70 inhibits caspase-dependent and -independent apoptosis in Jurkat T cells.
Exp.Cell Res. 257[1], 58-66.
 26. Cristau, B., Schafer, P. H., Pierce, S. K. (1994)
Heat shock enhances antigen processing and accelerates the formation of compact class II alpha beta dimers.
J.Immunol. 152[4], 1546-1556.
 27. Cuenda, A., Rouse, J., Doza, Y. N., Meier, R., Cohen, P., Gallagher, T. F., Young, P. R., Lee, J. C. (1995)

- SB 203580 is a specific inhibitor of a MAP kinase homologue which is stimulated by cellular stresses and interleukin-1.
FEBS Lett. 364[2], 229-233.
28. Currie, R. W., Tanguay, R. M., Kingma, J. G., Jr. (1993)
Heat-shock response and limitation of tissue necrosis during occlusion/reperfusion in rabbit hearts.
Circulation 87[3], 963-971.
 29. Davis, R. J. (1995)
Transcriptional regulation by MAP kinases.
Mol.Reprod.Dev. 42[4], 459-467.
 30. de Lemos, J. A.Hillis, L. D. (1996)
Diagnosis and management of coronary artery disease in patients with end-stage renal disease on hemodialysis.
J.Am.Soc.Nephrol. 7[10], 2044-2054.
 31. DeNagel, D. C.Pierce, S. K. (1992)
A case for chaperones in antigen processing.
Immunol.Today 13[3], 86-89.
 32. Descamps-Latscha, B.Herbelin, A. (1993)
Long-term dialysis and cellular immunity: a critical survey.
Kidney Int.Suppl 41, S135-S142.
 33. Ding, X. Z., Smallridge, R. C., Galloway, R. J., Kiang, J. G. (1996)
Increases in HSF1 translocation and synthesis in human epidermoid A-431 cells: role of protein kinase C and $[Ca^{2+}]_i$.
J.Investig.Med. 44[4], 144-153.
 34. Dobkin, J. F., Miller, M. H., Steigbigel, N. H. (1978)
Septicemia in patients on chronic hemodialysis.
Ann.Intern.Med. 88[1], 28-33.
 35. Donati, Y. R., Kantengwa, S., Polla, B. S. (1991)
Phagocytosis and heat shock response in human monocytes-macrophages.
Pathobiology 59[3], 156-161.
 36. Donati, Y. R., Slosman, D. O., Polla, B. S. (1990)
Oxidative injury and the heat shock response.
Biochem.Pharmacol. 40[12], 2571-2577.

37. Drueke, T. B. (1995)
The pathogenesis of parathyroid gland hyperplasia in chronic renal failure.
Kidney Int. 48[1], 259-272.
38. Durand, P., Bachelet, M., Brunet, F., Richard, M. J., Dhainaut, J. F., Dall'Ava, J., Polla, B. S. (2000)
Inducibility of the 70 kD heat shock protein in peripheral blood monocytes is decreased in human acute respiratory distress syndrome and recovers over time.
Am.J.Respir.Crit Care Med. 161[1], 286-292.
39. Eberst, M. E., Berkowitz, L. R. (1994)
Hemostasis in renal disease: pathophysiology and management.
Am.J.Med. 96[2], 168-179.
40. Enslin, H., Raingeaud, J., Davis, R. J. (1998)
Selective activation of p38 mitogen-activated protein (MAP) kinase isoforms by the MAP kinase kinases MKK3 and MKK6.
J.Biol.Chem. 273[3], 1741-1748.
41. Eschbach, J. W., Egrie, J. C., Downing, M. R., Browne, J. K., Adamson, J. W. (1987)
Correction of the anemia of end-stage renal disease with recombinant human erythropoietin. Results of a combined phase I and II clinical trial [see comments].
N.Engl.J.Med. 316[2], 73-78.
42. Farrell, J., Bastani, B. (1997)
Beta 2-microglobulin amyloidosis in chronic dialysis patients: a case report and review of the literature.
J.Am.Soc.Nephrol. 8[3], 509-514.
43. Feder, M. E., Hofmann, G. E. (1999)
Heat-shock proteins, molecular chaperones, and the stress response: evolutionary and ecological physiology.
Annu.Rev.Physiol 61, 243-282.
44. Feldman, H. I., Kinosian, M., Bilker, W. B., Simmons, C., Holmes, J. H., Pauly, M. V., Escarce, J. J. (1996)
Effect of dialyzer reuse on survival of patients treated with hemodialysis.
JAMA 276[8], 620-625.
45. Fernandez, J. M., Carbonell, M. E., Mazzuchi, N., Petrucci, D. (1992)

Simultaneous analysis of morbidity and mortality factors in chronic hemodialysis patients.

Kidney Int. 41[4], 1029-1034.

46. Flynn, G. C., Chappell, T. G., Rothman, J. E. (1989)
Peptide binding and release by proteins implicated as catalysts of protein assembly.
Science 245[4916], 385-390.
47. Fong, I. W., Capellan, J. M., Simbul, M., Angel, J. (1993)
Infection of arterio-venous fistulas created for chronic haemodialysis.
Scand.J.Infect.Dis. 25[2], 215-220.
48. Fracella, F., Rensing, L. (1995)
[Stress proteins: their growing significance in medicine].
Naturwissenschaften 82[7], 303-309.
49. Frantz, B., Klatt, T., Pang, M., Parsons, J., Rolando, A., Williams, H., Tocci, M. J., O'Keefe, S. J., O'Neill, E. A. (1998)
The activation state of p38 mitogen-activated protein kinase determines the efficiency of ATP competition for pyridinylimidazole inhibitor binding.
Biochemistry 37[39], 13846-13853.
50. Fraser, C. L., Arieff, A. I. (1988)
Nervous system complications in uremia.
Ann.Intern.Med. 109[2], 143-153.
51. Frei, U., Schober-Halstenberg, H.-J. (1999)
Nierenersatztherapie in Deutschland.
QuaSi Niere .
52. Garmyn, M., Mammone, T., Pupe, A., Gan, D., Declercq, L., Maes, D. (2001)
Human keratinocytes respond to osmotic stress by p38 map kinase regulated induction of HSP70 and HSP27.
J.Invest Dermatol. 117[5], 1290-1295.
53. Gawaz, M. P., Dobos, G., Spath, M., Schollmeyer, P., Gurland, H. J., Mujais, S. K. (1994)
Impaired function of platelet membrane glycoprotein IIb-IIIa in end-stage renal disease.
J.Am.Soc.Nephrol. 5[1], 36-46.

54. Guidon, P. T., Jr.Hightower, L. E. (1986)
Purification and initial characterization of the 71-kilodalton rat heat-shock protein and its cognate as fatty acid binding proteins.
Biochemistry 25[11], 3231-3239.
55. Haeffner-Cavaillon, N., Cavaillon, J. M., Ciancioni, C., Bacle, F., Delons, S., Kazatchkine, M. D. (1989)
In vivo induction of interleukin-1 during hemodialysis.
Kidney Int. 35[5], 1212-1218.
56. Haeffner-Cavaillon, N.Kazatchkine, M. D. (1994)
Methods for assessing monocytic cytokine production as an index of biocompatibility.
Nephrol.Dial.Transplant. 9 Suppl 2, 112-115.
57. Hakim, R. M., Wingard, R. L., Parker, R. A. (1994)
Effect of the dialysis membrane in the treatment of patients with acute renal failure.
N.Engl.J.Med. 331[20], 1338-1342.
58. Han, J., Lee, J. D., Jiang, Y., Li, Z., Feng, L., Ulevitch, R. J. (1996)
Characterization of the structure and function of a novel MAP kinase kinase (MKK6).
J.Biol.Chem. 271[6], 2886-2891.
59. Harnett, J. D., Kent, G. M., Barre, P. E., Taylor, R., Parfrey, P. S. (1994)
Risk factors for the development of left ventricular hypertrophy in a prospectively followed cohort of dialysis patients.
J.Am.Soc.Nephrol. 4[7], 1486-1490.
60. Haubitz, M., Kloppel, B., Lonnemann, G., Nonnast-Daniel, B. (1992)
In vitro production of interleukin-1 from blood mononuclear cells of patients on chronic hemodialysis therapy.
Clin.Nephrol. 38[1], 30-35.
61. Healy, A. M., Mariethoz, E., Pizurki, L., Polla, B. S. (1992)
Heat shock proteins in cellular defense mechanisms and immunity.
Ann.N.Y.Acad.Sci. 663, 319-330.
62. Heidbreder, E., Schafferhans, K., Heidland, A. (1985)

Disturbances of peripheral and autonomic nervous system in chronic renal failure: effects of hemodialysis and transplantation.

Clin.Nephrol. 23[5], 222-228.

63. Heidenreich, S., Schmidt, M., Bachmann, J., Harrach, B. (1996)
Apoptosis of monocytes cultured from long-term hemodialysis patients.
Kidney Int. 49[3], 792-799.
64. Held, P. J., Wolfe, R. A., Gaylin, D. S., Port, F. K., Levin, N. W., Turenne, M. N. (1994)
Analysis of the association of dialyzer reuse practices and patient outcomes.
Am.J.Kidney Dis. 23[5], 692-708.
65. Herbelin, A., Urena, P., Nguyen, A. T., Zingraff, J., Descamps-Latscha, B. (1991)
Influence of first and long-term dialysis on uraemia-associated increased basal production of interleukin-1 and tumour necrosis factor alpha by circulating monocytes.
Nephrol.Dial.Transplant. 6[5], 349-357.
66. Herold, G (2002)
Innere Medizin. 527ff.
67. Hiroshige, K., Kabashima, N., Takasugi, M., Kuroiwa, A. (1995)
Optimal dialysis improves uremic pruritus.
Am.J.Kidney Dis. 25[3], 413-419.
68. Hoffman, G. S., Schumacher, H. R., Paul, H., Cherian, V., Reed, R., Ramsay, A. G., Franck, W. A. (1982)
Calcium oxalate microcrystalline-associated arthritis in end-stage renal disease.
Ann.Intern.Med. 97[1], 36-42.
69. Hörl, W. (1995)
Spektrum der Nephrologie. 5, 3.
70. Hruska, K. A., Teitelbaum, S. L. (1995)
Renal osteodystrophy [see comments].
N.Engl.J.Med. 333[3], 166-174.
71. Huraib, S., al Momen, A. K., Gader, A. M., Mitwalli, A., Sulimani, F., Abu-Aisha, H. (1991)
Effect of recombinant human erythropoietin (rHuEpo) on the hemostatic system in chronic hemodialysis patients.

- Clin.Nephrol. 36[5], 252-257.
72. Jaattela, M. (1990)
Effects of heat shock on cytolysis mediated by NK cells, LAK cells, activated monocytes and TNFs alpha and beta.
Scand.J.Immunol. 31[2], 175-182.
73. Jaattela, M., Wissing, D., Bauer, P. A., Li, G. C. (1992)
Major heat shock protein hsp70 protects tumor cells from tumor necrosis factor cytotoxicity.
EMBO J. 11[10], 3507-3512.
74. Jacquier-Sarlin, M. R., Jornot, L., Polla, B. S. (1995)
Differential expression and regulation of hsp70 and hsp90 by phorbol esters and heat shock.
J.Biol.Chem. 270[23], 14094-14099.
75. Johnson, K., Charles, I., Dougan, G., Pickard, D., O'Gaora, P., Costa, G., Ali, T., Miller, I., Hormaeche, C. (1991)
The role of a stress-response protein in Salmonella typhimurium virulence.
Mol.Microbiol. 5[2], 401-407.
76. Johnson, R. J. (1994)
Complement activation during extracorporeal therapy: biochemistry, cell biology and clinical relevance.
Nephrol.Dial.Transplant. 9 Suppl 2, 36-45.
77. Johnston, D., Oppermann, H., Jackson, J., Levinson, W. (1980)
Induction of four proteins in chick embryo cells by sodium arsenite.
J.Biol.Chem. 255[14], 6975-6980.
78. Kachel, H. G., Altmeyer, P., Baldamus, C. A., Koch, K. M. (1983)
Deposition of an amyloid-like substance as a possible complication of regular dialysis treatment.
Contrib.Nephrol. 36, 127-132.
79. Kaplowitz, L. G., Comstock, J. A., Landwehr, D. M., Dalton, H. P., Mayhall, C. G. (1988)
A prospective study of infections in hemodialysis patients: patient hygiene and other risk factors for infection.
Infect.Control Hosp.Epidemiol. 9[12], 534-541.

80. Kaufmann, S. H. (1990)
Heat shock proteins and the immune response.
Immunol.Today 11[4], 129-136.
81. Kelley, P. M.Schlesinger, M. J. (1978)
The effect of amino acid analogues and heat shock on gene expression in chicken embryo fibroblasts.
Cell 15[4], 1277-1286.
82. Kiang, J. G., Carr, F. E., Burns, M. R., McClain, D. E. (1994)
HSP-72 synthesis is promoted by increase in $[Ca^{2+}]_i$ or activation of G proteins but not pHi or cAMP.
Am.J.Physiol 267[1 Pt 1], C104-C114.
83. Kiang, J. G., Gist, I. D., Tsokos, G. C. (1997)
17 beta-estradiol-induced increases in glucose-regulated protein 78kD and 94kD protect human breast cancer T47-D cells from thermal injury.
Chin J.Physiol 40[4], 213-219.
84. Kiang, J. G.Tsokos, G. C. (1998)
Heat shock protein 70 kDa: molecular biology, biochemistry, and physiology.
Pharmacol.Ther. 80[2], 183-201.
85. Koch, K. M. (1992)
Dialysis-related amyloidosis [clinical conference].
Kidney Int. 41[5], 1416-1429.
86. Koch, K. M.Anton, P. (2000)
Klinische Nephrologie. [1.Aufl.], 883.
87. Kohler, H., Girndt, M., Dumann, H., Klingel, R. (1993)
[The immune defect in kidney failure. I. The clinical manifestations].
Dtsch.Med.Wochenschr. 118[20], 757-761.
88. Kohler, H., Girndt, M., Dumann, H., Klingel, R. (1993)
[The immune defect in kidney failure. II. The mechanisms of the "uremic" immune defect].
Dtsch.Med.Wochenschr. 118[21], 790-795.
89. Kroeger, P. E., Sarge, K. D., Morimoto, R. I. (1993)
Mouse heat shock transcription factors 1 and 2 prefer a trimeric binding site but interact differently with the HSP70 heat shock element.

- Mol.Cell Biol. 13[6], 3370-3383.
90. Lang, D., Hubrich, A., Dohle, F., Terstesse, M., Saleh, H., Schmidt, M., Pauels, H. G., Heidenreich, S. (2000)
Differential expression of heat shock protein 70 (hsp70) in human monocytes rendered apoptotic by IL-4 or serum deprivation.
J.Leukoc.Biol. 68[5], 729-736.
 91. Lee, J. C., Kassis, S., Kumar, S., Badger, A., Adams, J. L. (1999)
p38 mitogen-activated protein kinase inhibitors--mechanisms and therapeutic potentials.
Pharmacol.Ther. 82[2-3], 389-397.
 92. Lee, J. C., Laydon, J. T., McDonnell, P. C., Gallagher, T. F., Kumar, S., Green, D., McNulty, D., Blumenthal, M. J., Heys, J. R., Landvatter, S. W., . (1994)
A protein kinase involved in the regulation of inflammatory cytokine biosynthesis.
Nature 372[6508], 739-746.
 93. Levin, N., Eknoyan, G., Pipp, M., Steinberg, E. (1997)
National Kidney Foundation: Dialysis Outcome Quality Initiative--development of methodology for clinical practice guidelines.
Nephrol.Dial.Transplant. 12[10], 2060-2063.
 94. Levinson, W., Oppermann, H., Jackson, J. (1980)
Transition series metals and sulfhydryl reagents induce the synthesis of four proteins in eukaryotic cells.
Biochim.Biophys.Acta 606[1], 170-180.
 95. Lewis, T. S., Shapiro, P. S., Ahn, N. G. (1998)
Signal transduction through MAP kinase cascades.
Adv.Cancer Res. 74, 49-139.
 96. Li, G. C., Li, L. G., Liu, Y. K., Mak, J. Y., Chen, L. L., Lee, W. M. (1991)
Thermal response of rat fibroblasts stably transfected with the human 70-kDa heat shock protein-encoding gene.
Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A 88[5], 1681-1685.
 97. Lindquist, S. (1986)
The heat-shock response.
Annu.Rev.Biochem. 55, 1151-1191.
 98. London, G. M., Drueke, T. B. (1997)

- Atherosclerosis and arteriosclerosis in chronic renal failure [editorial].
Kidney Int. 51[6], 1678-1695.
99. Luger, A., Kovarik, J., Stummvoll, H. K., Urbanska, A., Luger, T. A. (1987)
Blood-membrane interaction in hemodialysis leads to increased cytokine
production.
Kidney Int. 32[1], 84-88.
100. Mahoney, C. A., Arieff, A. I. (1982)
Uremic encephalopathies: clinical, biochemical, and experimental features.
Am.J.Kidney Dis. 2[3], 324-336.
101. Mallette, L. E., Patten, B. M., Engel, W. K. (1975)
Neuromuscular disease in secondary hyperparathyroidism.
Ann.Intern.Med. 82[4], 474-483.
102. Marr, K. A., Kong, L., Fowler, V. G., Gopal, A., Sexton, D. J., Conlon, P. J.,
Corey, G. R. (1998)
Incidence and outcome of Staphylococcus aureus bacteremia in hemodialysis
patients.
Kidney Int. 54[5], 1684-1689.
103. Marshall, C. J. (1995)
Specificity of receptor tyrosine kinase signaling: transient versus sustained
extracellular signal-regulated kinase activation.
Cell 80[2], 179-185.
104. Memoli, B., Libetta, C., Rampino, T., De Simone, W., Meccariello, S.,
Stangherlin, P., Dal Canton, A., Andreucci, V. E. (1991)
Interleukin-6 production of uraemic haemodialysed patients: effects of different
membranes.
Nephrol.Dial.Transplant. 6 Suppl 2, 96-98.
105. Mettang, T., Fischer, F. P., Kuhlmann, U. (1996)
[Uremic pruritus. Pathophysiologic and therapeutic concepts].
Dtsch.Med.Wochenschr. 121[33], 1025-1031.
106. Moia, M., Mannucci, P. M., Vizzotto, L., Casati, S., Cattaneo, M., Ponticelli, C.
(1987)
Improvement in the haemostatic defect of uraemia after treatment with
recombinant human erythropoietin.

- Lancet 2[8570], 1227-1229.
107. Moseley, P. L. (1998)
Heat shock proteins and the inflammatory response.
Ann.N.Y.Acad.Sci. 856, 206-213.
 108. Multhoff, G., Botzler, C. (1998)
Heat-shock proteins and the immune response.
Ann.N.Y.Acad.Sci. 851, 86-93.
 109. Neupert, W., Pfanner, N. (1993)
Roles of molecular chaperones in protein targeting to mitochondria.
Philos.Trans.R.Soc.Lond B Biol.Sci. 339[1289], 355-361.
 110. Obrig, T. G., Culp, W. J., McKeehan, W. L., Hardesty, B. (1971)
The mechanism by which cycloheximide and related glutarimide antibiotics inhibit peptide synthesis on reticulocyte ribosomes.
J.Biol.Chem. 246[1], 174-181.
 111. Peer, G., Kivity, S., Agami, O., Fireman, E., Silverberg, D., Blum, M., Iaina, A. (1996)
Randomised crossover trial of naltrexone in uraemic pruritus.
Lancet 348[9041], 1552-1554.
 112. Perdrizet, G. A., Kaneko, H., Buckley, T. M., Fishman, M. A., Schweizer, R. T. (1990)
Heat shock protects pig kidneys against warm ischemic injury.
Transplant.Proc. 22[2], 460-461.
 113. Pereira, B. J., Poutsika, D. D., King, A. J., Strom, J. A., Narayan, G., Levey, A. S., Dinarello, C. A. (1992)
In vitro production of interleukin-1 receptor antagonist in chronic renal failure, CAPD and HD.
Kidney Int. 42[6], 1419-1424.
 114. Pertosa, G., Marfella, C., Tarantino, E. A., Di Cillo, M., Manno, C., Russo, R., Schena, F. P. (1991)
Involvement of peripheral blood monocytes in haemodialysis: in vivo induction of tumour necrosis factor alpha, interleukin 6 and beta 2-microglobulin.
Nephrol.Dial.Transplant. 6 Suppl 2, 18-23.
 115. Polla, B. S., Bachelet, M., Elia, G., Santoro, M. G. (1998)

- Stress proteins in inflammation.
Ann.N.Y.Acad.Sci. 851, 75-85.
116. Polla, B. S., Healy, A. M., Wojno, W. C., Krane, S. M. (1987)
Hormone 1 alpha,25-dihydroxyvitamin D3 modulates heat shock response in monocytes.
Am.J.Physiol 252[6 Pt 1], C640-C649.
117. Polla, B. S., Stubbe, H., Kantengwa, S., Maridonneau-Parini, I., Jacquier-Sarlin, M. R. (1995)
Differential induction of stress proteins and functional effects of heat shock in human phagocytes.
Inflammation 19[3], 363-378.
118. Ponticelli, C.Bencini, P. L. (1992)
Uremic pruritus: a review [editorial].
Nephron 60[1], 1-5.
119. Pouyssegur, J., Shiu, R. P., Pastan, I. (1977)
Induction of two transformation-sensitive membrane polypeptides in normal fibroblasts by a block in glycoprotein synthesis or glucose deprivation.
Cell 11[4], 941-947.
120. Powe, N. R., Jaar, B., Furth, S. L., Hermann, J., Briggs, W. (1999)
Septicemia in dialysis patients: incidence, risk factors, and prognosis.
Kidney Int. 55[3], 1081-1090.
121. Price, B. D.Calderwood, S. K. (1991)
Ca²⁺ is essential for multistep activation of the heat shock factor in permeabilized cells.
Mol.Cell Biol. 11[6], 3365-3368.
122. Rabelink, T. J., Zwaginga, J. J., Koomans, H. A., Sixma, J. J. (1994)
Thrombosis and hemostasis in renal disease.
Kidney Int. 46[2], 287-296.
123. Raskin, N. H.Fishman, R. A. (1976)
Neurologic disorders in renal failure (first of two parts).
N.Engl.J.Med. 294[3], 143-148.
124. Raskin, N. H.Fishman, R. A. (1976)
Neurologic disorders in renal failure (second of two parts).

- N.Engl.J.Med. 294[4], 204-210.
125. Riabowol, K. T., Mizzen, L. A., Welch, W. J. (1988)
Heat shock is lethal to fibroblasts microinjected with antibodies against hsp70.
Science 242[4877], 433-436.
 126. Ringoir, S. (1997)
An update on uremic toxins.
Kidney Int.Suppl 62, S2-S4.
 127. Ritossa (1962)
A new puffing pattern.
Experientia 18, 571.
 128. Ritz, E., Boland, R., Kreusser, W. (1980)
Effects of vitamin D and parathyroid hormone on muscle: potential role in uremic myopathy.
Am.J.Clin.Nutr. 33[7], 1522-1529.
 129. Ritz, E., Stefanski, A. (1996)
Diabetic nephropathy in type II diabetes.
Am.J.Kidney Dis. 27[2], 167-194.
 130. RoittMale (1997)
Kurzes Lehrbuch der Immunologie. 3, 145ff.
 131. Rostand, S. G., Sanders, C., Kirk, K. A., Rutsky, E. A., Fraser, R. G. (1988)
Myocardial calcification and cardiac dysfunction in chronic renal failure.
Am.J.Med. 85[5], 651-657.
 132. Rouse, J., Cohen, P., Trigon, S., Morange, M., Alonso-Llamazares, A., Zamanillo, D., Hunt, T., Nebreda, A. R. (1994)
A novel kinase cascade triggered by stress and heat shock that stimulates MAPKAP kinase-2 and phosphorylation of the small heat shock proteins.
Cell 78[6], 1027-1037.
 133. Sagripanti, A., Barsotti, G. (1997)
Bleeding and thrombosis in chronic uremia [editorial].
Nephron 75[2], 125-139.
 134. Salem, M. M., Rosa, R. M., Batlle, D. C. (1991)
Extrarenal potassium tolerance in chronic renal failure: implications for the treatment of acute hyperkalemia [see comments].

- Am.J.Kidney Dis. 18[4], 421-440.
135. Samali, A., Cotter, T. G. (1996)
Heat shock proteins increase resistance to apoptosis.
Exp.Cell Res. 223[1], 163-170.
136. Santoro, M. G. (2000)
Heat shock factors and the control of the stress response.
Biochem.Pharmacol. 59[1], 55-63.
137. Sargent, C. A., Dunham, I., Trowsdale, J., Campbell, R. D. (1989)
Human major histocompatibility complex contains genes for the major heat shock protein HSP70.
Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A 86[6], 1968-1972.
138. Savill, J., Hogg, N., Ren, Y., Haslett, C. (1992)
Thrombospondin cooperates with CD36 and the vitronectin receptor in macrophage recognition of neutrophils undergoing apoptosis.
J.Clin.Invest 90[4], 1513-1522.
139. Schaefer, R. M., Paczek, L., Heidland, A. (1991)
Cytokine production by monocytes during haemodialysis.
Nephrol.Dial.Transplant. 6 Suppl 2, 14-17.
140. Schiffl, H., Fischeder, M., Sitter, T. (1999)
[Biocompatibility of renal replacement therapy].
Internist (Berl) 40[1], 37-48.
141. Schiller, B., Ziegler-Heitbrock, H. W., Meyer, N., Schmidt, B., Blumenstein, M. (1991)
Monocyte phenotype and interleukin-1 production in patients undergoing haemodialysis.
Nephron 59[4], 573-579.
142. Schlesinger, M. J. (1990)
Heat shock proteins.
J.Biol.Chem. 265[21], 12111-12114.
143. Schmidt R.F., Thews G (1995)
Lehrbuch der Physiologie. [26], 425f.
144. Schroeder, S., Lindemann, C., Hoeft, A., Putensen, C., Decker, D., von Ruecker, A. A., Stuber, F. (1999)

- Impaired inducibility of heat shock protein 70 in peripheral blood lymphocytes of patients with severe sepsis.
Crit Care Med. 27[6], 1080-1084.
145. Setkov, N. A., Kazakov, V. N., Rosenwald, I. B., Makarova, G. F., Epifanova, O. I. (1992)
Protein synthesis inhibitors, like growth factors, may render resting 3T3 cells competent for DNA synthesis: a radioautographic and cell fusion study.
Cell Prolif. 25[3], 181-191.
146. Shi, Y. Thomas, J. O. (1992)
The transport of proteins into the nucleus requires the 70-kilodalton heat shock protein or its cytosolic cognate.
Mol. Cell Biol. 12[5], 2186-2192.
147. Stein, B., Brady, H., Yang, M. X., Young, D. B., Barbosa, M. S. (1996)
Cloning and characterization of MEK6, a novel member of the mitogen-activated protein kinase kinase cascade.
J. Biol. Chem. 271[19], 11427-11433.
148. Takano, M., Arai, T., Mokuno, Y., Nishimura, H., Nimura, Y., Yoshikai, Y. (1998)
Dibutyl cyclic adenosine monophosphate protects mice against tumor necrosis factor- α -induced hepatocyte apoptosis accompanied by increased heat shock protein 70 expression.
Cell Stress. Chaperones. 3[2], 109-117.
149. Tibbles, L. A. Woodgett, J. R. (1999)
The stress-activated protein kinase pathways.
Cell Mol. Life Sci. 55[10], 1230-1254.
150. Tissieres, A., Mitchell, H. K., Tracy, U. M. (1974)
Protein synthesis in salivary glands of *Drosophila melanogaster*: relation to chromosome puffs.
J. Mol. Biol. 84[3], 389-398.
151. Valderrabano, F., Jones, E. H., Mallick, N. P. (1995)
Report on management of renal failure in Europe, XXIV, 1993.
Nephrol. Dial. Transplant. 10 Suppl 5, 1-25.
152. Vanholder, R. Ringoir, S. (1993)

Infectious morbidity and defects of phagocytic function in end-stage renal disease:
a review.

J.Am.Soc.Nephrol. 3[9], 1541-1554.

153. Vanholder, R., Ringoir, S., Dhondt, A., Hakim, R. (1991)
Phagocytosis in uremic and hemodialysis patients: a prospective and cross
sectional study.
Kidney Int. 39[2], 320-327.
154. Vanholder, R., Van Loo, A., Dhondt, A. M., De Smet, R., Ringoir, S. (1996)
Influence of uraemia and haemodialysis on host defence and infection.
Nephrol.Dial.Transplant. 11[4], 593-598.
155. Vayssier, M.Polla, B. S. (1998)
Heat shock proteins chaperoning life and death.
Cell Stress.Chaperones. 3[4], 221-227.
156. Vigano, G., Benigni, A., Mendogni, D., Mingardi, G., Mecca, G., Remuzzi, G.
(1991)
Recombinant human erythropoietin to correct uremic bleeding.
Am.J.Kidney Dis. 18[1], 44-49.
157. Whyte, M. K., Hardwick, S. J., Meagher, L. C., Savill, J. S., Haslett, C. (1993)
Transient elevations of cytosolic free calcium retard subsequent apoptosis in
neutrophils in vitro.
J.Clin.Invest 92[1], 446-455.
158. Williams, D. B.Watts, T. H. (1995)
Molecular chaperones in antigen presentation.
Curr.Opin.Immunol. 7[1], 77-84.
159. Winearls, C. G., Oliver, D. O., Pippard, M. J., Reid, C., Downing, M. R., Cotes, P.
M. (1986)
Effect of human erythropoietin derived from recombinant DNA on the anaemia of
patients maintained by chronic haemodialysis.
Lancet 2[8517], 1175-1178.
160. Young, P. R., McLaughlin, M. M., Kumar, S., Kassis, S., Doyle, M. L., McNulty,
D., Gallagher, T. F., Fisher, S., McDonnell, P. C., Carr, S. A., Huddleston, M. J.,
Seibel, G., Porter, T. G., Livi, G. P., Adams, J. L., Lee, J. C. (1997)

Pyridinyl imidazole inhibitors of p38 mitogen-activated protein kinase bind in the ATP site.

J.Biol.Chem. 272[18], 12116-12121.

161. Young, R. A. (1990)

Stress proteins and immunology.

Annu.Rev.Immunol. 8, 401-420.

162. Zugel, U.Kaufmann, S. H. (1999)

Role of heat shock proteins in protection from and pathogenesis of infectious diseases.

Clin.Microbiol.Rev. 12[1], 19-39.

7 Lebenslauf

Name:	Bangen
Vorname:	Philip
Geburtsdatum/-ort:	23.12.1974 in Hiltrup
Eltern:	Dr.med Wolfgang Bangen, Marion Bangen, geb. Aymanns
1981 – 1985	Grundschule Clemensschule Münster-Hiltrup
1985 – 1994	Kardinal-von-Galen Gymnasium Münster
20. 05.1994	Zeugnis der allgemeinen Hochschulreife
1994 – 1995	Wehrdienst
1995 – 1997	Universität des Saarlandes in Homburg: Studiengang: Medizin
1997	Ärztliche Vorprüfung
1997 – 1998	Ein Jahr Studium an der Faculté de Médecine, Université de Rennes I, Rennes, Frankreich
1998 - 2002	Westfälische-Wilhelms-Universität Münster
1999	Erster Abschnitt der ärztlichen Prüfung
2001	Zweiter Abschnitt der ärztlichen Prüfung
2002	Dritter Abschnitt der ärztlichen Prüfung
31.05.2002	Ärztliche Prüfung
10.06.2002	Approbation

Münster, den 07.03.2003