

**Untersuchungen zur Rolle von Zytokinen bei der  
Beta-2-Mikroglobulin-Synthese in verschiedenen humanen  
Zelltypen**

**Thomas Vraetz**



# **Untersuchungen zur Rolle von Zytokinen bei der Beta-2-Mikroglobulin-Synthese in verschiedenen humanen Zelltypen**

Von der Medizinischen Fakultät  
der Rheinisch-Westfälischen Technischen Hochschule Aachen  
zur Erlangung des akademischen Grades  
eines Doktors der Medizin  
genehmigte Dissertation

vorgelegt von

**Thomas Vraetz**

aus

Geilenkirchen

**Berichter:**

**Herr Professor**

**Dr. rer. nat. Lutz Graeve**

**Herr Universitätsprofessor**

**Dr. rer. nat. Peter C. Heinrich**

**Tag der mündlichen Prüfung:**

**14.09.2006**



Wesentliche Teile dieser Arbeit wurden als Originalarbeit veröffentlicht:

Thomas Vraetz, Thomas H. Ittel, Michelle G. van Mackelenbergh, Peter C. Heinrich,  
Heinz G. Sieberth und Lutz Graeve

***Regulation of Beta-2-Microglobulin Expression in Different Human Cell Lines  
by Proinflammatory Cytokines***

Nephrology, Dialysis, Transplantation (1999) 14: 2137 – 2143



# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b> .....	<b>10</b>
1.1	Beta-2-Mikroglobulin-Amyloidose .....	11
1.2	Beta-2-Mikroglobulin.....	14
1.3	Makrophagen / Monozyten .....	17
1.4	Zytokine.....	18
1.5	Interferone .....	22
1.6	Extrakorporale Eliminationsverfahren.....	24
1.7	Bioinkompatibilität .....	26
1.8	Pathogenese der Beta-2-Mikroglobulin-Amyloidose .....	28
1.9	Zusammenfassung .....	31
1.10	Fragestellung.....	32
1.11	Methodik.....	33
<b>2</b>	<b>Material</b> .....	<b>34</b>
2.1	Geräte .....	34
2.2	Chemikalien.....	36
2.3	Biochemikalien .....	38
<b>3</b>	<b>Methoden</b> .....	<b>42</b>
3.1	Kultur eukaryotischer Zellen .....	42
3.2	Molekularbiologische und molekulargenetische Methoden .....	52
<b>4</b>	<b>Ergebnisse</b> .....	<b>68</b>
4.1	Vorbemerkung.....	68
4.2	Einfluss von Zytokinen auf die $\beta_2$ -Mikroglobulin-mRNA .....	69
4.3	Einfluss von Zytokinen auf die $\beta_2$ M-Neusynthese.....	82
4.4	Einfluss von Zytokinen auf die $\beta_2$ M-Protein-Konzentration .....	94
4.5	Zusammenfassung der Ergebnisse .....	109
4.6	Ergebnisse für $\beta_2$ M-Expression in tabellarischer Form .....	110

5	Diskussion .....	112
6	Ausblick .....	118
7	Zusammenfassung.....	122
8	Literaturverzeichnis .....	124
9	Abkürzungen .....	146
10	Danksagung.....	148
11	Lebenslauf .....	150





## **1 Einleitung**

Die Bioinkompatibilität der bei der extrakorporalen Elimination von harnpflichtigen Substanzen durch Hämodialyse verwendeten Membranen ist ein pathogenetisch bedeutsamer Faktor bei der Entstehung der Beta-2-Mikroglobulin-Amyloidose. In der vorliegenden Arbeit wird die pathogenetische Relevanz von Interleukin-6 (IL-6) und weiteren Zytokinen aus mononukleären Zellen für die Bioinkompatibilität und die Induktion der Beta-2-Mikroglobulin-Synthese in verschiedenen Zellsystemen molekularbiologisch untersucht.

## 1.1 Beta-2-Mikroglobulin-Amyloidose

Die Beta-2-Mikroglobulin-Amyloidose ( $\beta_2$ M-Amyloidose) ist eine pathognomonisch bei Langzeit-Hämodialyse-Patienten vorkommende Krankheit. Sie ist aufgrund ihrer Pathologie zu den Amyloidosen zu zählen, da sich bei der  $\beta_2$ M-Amyloidose - wie auch bei allen anderen Amyloidosen - extrazelluläre Proteinablagerungen nachweisen lassen. Im histologischen Präparat erscheinen diese nach Kongorot-Färbung in gekreuztem polarisiertem Licht (Dichroismus) als grün-gelblich aufleuchtende Substanz. Seit 1985 ist Beta-2-Mikroglobulin ( $\beta_2$ M) als Hauptbestandteil dieser extrazellulären Ablagerungen bekannt (Gejyo 1985, 1986; Gorevic 1985, 1986). Dies lässt sich durch elektronenmikroskopische und immunhistochemische Methoden bestätigen. Darüber hinaus konnten in weitaus geringeren Anteilen andere Serumproteine wie Proteasen, Ubiquitin, Immunglobulin-Leichtketten, Serum-Amyloid P oder Glykosaminoglykane gefunden werden (Brancaccio 1995; Garcia-Garcia 1999).

Die extrazellulären  $\beta_2$ M-Depots entstehen ausschließlich bei Hämodialyse-Patienten und sind somit eine spezifische, sekundäre Erscheinung der extrakorporalen Eliminationsverfahren. Nach einer Behandlungsdauer (extrakorporale Elimination von harnpflichtigen Substanzen durch Hämodialyse oder -filtration) von 5 bis 10 Jahren sind bei der Mehrheit der Patienten die ersten Symptome der  $\beta_2$ M-Ablagerungen im Gewebe feststellbar (Bardin 1986). Bei 65 % der Hämodialyse-Patienten sind nach 10 Jahren radiologische Zeichen (s. u.) von Amyloiddepots zu erkennen, nach 15 Jahren Dialyse sind die meisten Patienten vom Vollbild der Krankheit betroffen (Ferreira 1995).

Die Amyloid-Depots befinden sich bevorzugt in den osteoartikulären Geweben des Körpers, wie Gelenkstrukturen (Sehnen, Bänder, Gelenkkapseln) oder periartikulärem Knochengewebe. Diese erscheinen als zystische Knochenläsionen der Knochenmatrix (sog. braune Tumoren). Durch die bevorzugte Manifestation der

$\beta_2$ M-Amyloidose in den Geweben des Bewegungsapparates sind die klinischen Symptome durch Komplikationen in diesen Bereichen beherrscht.

Die Patienten leiden zu einem hohen Prozentsatz an chronischen Arthropathien. Es finden sich dabei, bedingt durch die Deposition von  $\beta_2$ M-Amyloid-Fibrillen, Schwellungen der Gelenke und periartikuläre Weichteilschwellungen. In der Synovialflüssigkeit sind kleine Fragmente von  $\beta_2$ M-Amyloid nachweisbar. In Biopsien aus Gelenkkapseln kann eine zellarme Synovitis diagnostiziert werden. Die hauptsächlich betroffenen Gelenke sind die Gelenke des Schultergürtels, die Kniegelenke sowie die Handwurzelgelenke und die kleinen Gelenke der Hand. Meist treten die Gelenkmanifestationen bilateral auf. Die Patienten leiden an Arthralgien. Die Schmerzen und die zunehmende Ankyloisierung (Versteifung) der Gelenke führen zu einer Bewegungseinschränkung, die in schweren Fällen bis zur Immobilisation der Patienten führen kann.

Eine weitere typische, schon frühzeitig auftretende Komplikation der dialyseassoziierten Amyloidose ist das Carpal-Tunnel-Syndrom (Drueke 2000). Durch die Proteinablagerung im *Retinaculum flexuorum* und in den Sehnenscheiden der Finger-Flexoren kommt es zur Kompression des durch den Carpal-Tunnel verlaufenden *Nervus medianus*. Daraus resultiert eine typische Parästhesie in den ersten drei, durch diesen Nerv versorgten Fingern der betroffenen Hand. Bei prolongierter Kompression (ohne chirurgische Intervention) kommt es zu motorischen Ausfällen der Finger-Flexoren und zur Thenar-Atrophie.

Bedingt durch die Amyloiddepots in den periartikulären Knochen und durch solitäre, zystische Läsionen in den langen Röhrenknochen kommt es bei  $\beta_2$ M-Amyloidose-Patienten zu einer erhöhten Inzidenz an pathologischen Knochenfrakturen und deren schwerwiegenden Komplikationen (Bardin 1986; Floege und Ehlerding 1996; Saito 1994).

Die extrakorporalen Eliminationsverfahren und verbesserten supportiven Therapien tragen zu einer signifikanten Erhöhung der Lebenserwartung der niereninsuffizienten Patienten bei. Daher hat auch die  $\beta_2$ M-Amyloidose durch die verlängerte Behandlungsdauer mittels Hämodialyse eine erhebliche klinische Bedeutung

gewonnen. Die Patienten erleiden durch die starken Auswirkungen der Krankheit auf die Mobilität eine zunehmende Einschränkung ihrer Lebensqualität.

Als einzige Therapie der  $\beta_2$ M-Amyloidose steht bisher nur die Transplantation einer Spenderniere zur Verfügung. Nach einer Transplantation kommt es jedoch nur zu einem Sistieren der Progredienz der Amyloidablagerungen, so dass die Patienten weiterhin mit den Komplikationen der vorangegangenen Dialysebehandlung leben müssen.

## 1.2 Beta-2-Mikroglobulin

$\beta_2$ M ist ein aus 99 Aminosäuren bestehendes, 11,8 Kilo Dalton (kD) schweres, nicht glykosyliertes Polypeptid, das als leichte invariante Kette der MHC-Klasse I-Antigene (*Major Histocompatibility Complex* oder *Human Leucocyte Antigene* (HLA-A, HLA-B, HLA-C)) auf der extraplasmatischen Oberfläche aller kernhaltigen Körperzellen (mit Ausnahme der Trophoblast-Zellen der Plazenta) zu finden ist. Die Moleküle des MH-Komplexes sind im wesentlichen bei der Identifizierung der körpereigenen oder körperfremden Zellen involviert, z. B. erfolgt die Abstoßung eines transplantierten Organs durch Interaktion der MHC-Moleküle mit den Zellen des T-lymphozytären Systems.  $\beta_2$ M ist in non-kovalenter Bindung mit der schweren Kette des MH-Komplexes assoziiert (siehe Fig. 1.2) (Cresswell 1974; Hyafil und Strominger 1979; Reisfeld 1976). In der dreidimensionalen Struktur zeigt sich ein Beta-Faltblatt-reiches Molekül (Becker und Reeke 1985). Strukturell ist eine hohe Homologie zum  $C_{H3}$ -Abschnitt der konstanten Domäne der Immunglobulin G-Moleküle feststellbar.  $\beta_2$ M kann daher als Produkt der Immunglobulin-Superfamilie angesehen werden und ist wahrscheinlich im Verlauf der phylogenetischen Entwicklung aus einem für die einzelnen Domänen der Immunglobuline verantwortlichen Ur-Gen entstanden (Parham 1987; Peterson 1972; Strominger 1974). Humanes  $\beta_2$ M weist im Vergleich zu anderen Säugerspezies einen hohen Grad an konservierter Strukturhomologie auf (Gill 1980).  $\beta_2$ M wird getrennt vom MH-Komplex (Chromosom 2) auf dem Chromosom 15 kodiert (Goodfellow 1975; Kucherlapati 1976).

Durch die relativ lockere Bindung zur  $\alpha_3$ -Domäne des MHC kommt es zur Dissoziation des  $\beta_2$ M. Dabei stellt sich ein Gleichgewicht zwischen Assoziation auf der Zelloberfläche und Dissoziation in die humoralen Flüssigkeiten ein (Hyafil und Strominger 1979). Aus diesem Grunde ist  $\beta_2$ M in fast allen Körperflüssigkeiten (Plasma, Urin, Liquor, Speichel) zu finden.

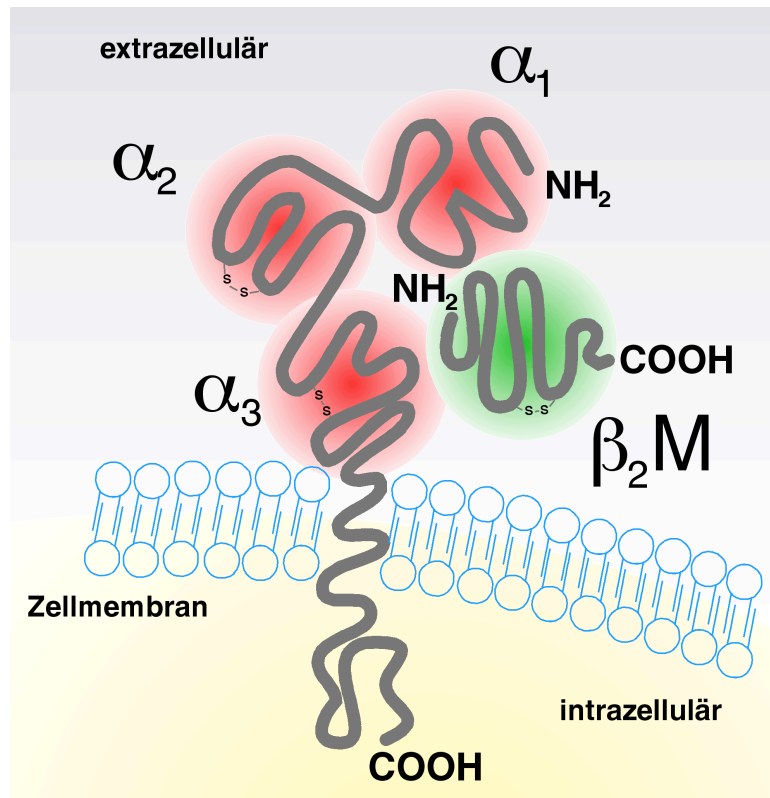


Fig. 1.2: Schematische Struktur des MH-Komplexes und des  $\beta_2$ -Mikroglobulins

Nichtkovalente Bindung des  $\beta_2$ -Mikroglobulins mit der  $\alpha_3$ -Domäne des extrazellulären Anteils des MH-Komplexes

1968 wurde  $\beta_2$ M von Berggård und Bearn erstmals aus dem Urin von niereninsuffizienten Patienten isoliert (Berggård und Bearn 1968). Beim Nierengesunden wird das meist als Monomer vorliegende Protein glomerulär quantitativ filtriert und zu 99,9 % im proximalen Tubulus reabsorbiert und katabolisiert. Beim niereninsuffizienten Menschen mit einer verminderten renalen *Clearance* kommt es zu einer Akkumulation des  $\beta_2$ M aufgrund des Untergangs der Tubulusepithelien. Erhöhte  $\beta_2$ M-Spiegel sind aber auch bei Personen mit gesteigerter  $\beta_2$ M-Produktion wie z.B. bei Autoimmunkrankheiten, chronisch-entzündlichen Erkrankungen (z. B. Rheumatoide Polyarthritis), Viruserkrankungen (z. B. HIV-Infektionen) oder lymphatischen Neoplasien (Lymphome, Plasmozytom) zu finden (Bataille 1984; Campos 1984; Dunne 1996; Lifson 1992; Morfeldt-Manson 1988; Nakao 1981; Planella 1998; Revillard 1982; Sadamori 1995; Ullum 2000; Walters 1989).

Die biologische Funktion des  $\beta_2\text{M}$  ist noch weitgehend unbekannt. Die Zellen der humanen Burkitt-Lymphom-Zelllinie Daudi, die defizient für  $\beta_2\text{M}$  sind, können auch die MHC-Klasse I-Determinanten nicht an ihrer Zelloberfläche exprimieren. Ebenso sind verschiedene andere HLA-defiziente Tumorzelllinien bekannt, bei denen Mutationen im Bereich des  $\beta_2\text{M}$ -Promotors oder der kodierenden Sequenz gefunden wurden. Dies deutet darauf hin, dass  $\beta_2\text{M}$  nach der Assemblierung mit dem neu synthetisierten HLA-Molekül im endoplasmatischen Retikulum für die Ausschleusung (sog. *Trafficking*) des Komplexes an die Außenseite der Plasmamembran benötigt wird (Algranati 1980; Arce-Gomez 1978; Hughes 1997; Ostberg 1976; Owen 1980; Rosa 1983; Seong 1988).

Des Weiteren gibt es Hinweise und Meinungen in der Literatur, dass  $\beta_2\text{M}$  aufgrund von Strukturhomologien zu Wachstumsfaktoren in der Regulation der Entwicklung eine Rolle spielen könnte. Wenn  $\beta_2\text{M}$  in höheren Konzentrationen dendritischen Zellen in einem Kulturmedium zugesetzt wurde, konnten Xie *et al.* zeigen, dass  $\beta_2\text{M}$  das Wachstum und die weitere Differenzierung von dendritischen Zellen unterbindet (Xie 2003).

In anderen Untersuchungen gelang der Nachweis einer Korrelation zwischen  $\beta_2\text{M}$  und dem Umsatz von Knochensubstanz bei chronisch hämodialysierten Patienten sowie Patientinnen mit Osteoporose nach der Menopause (Ferreira 1995; Ripoll 1996).

Die Beobachtung, dass  $\beta_2\text{M}$ -*Knockout*-Mäuse aufgrund einer fehlenden T-Zell-Funktion keine Immunantwort auf parasitäre Gewebeinfektionen zeigen und häufig durch solche Infektionen früh sterben, unterstreicht die bedeutsame Rolle des  $\beta_2\text{M}$  für das Immunsystem (Flynn 1992; Tarleton 1992; Zijlstra 1990).

Bei  $\beta_2\text{M}$ -defizienten Mäusen entwickelt sich darüber hinaus rasch eine hepatische Eisenüberladung. Ein Zusammenhang von  $\beta_2\text{M}$  mit der Pathogenese der hereditären Hämatochromatose liegt somit nahe (De Sousa 1994; Santos 1996).

In neueren Untersuchungen gelang es Mori *et al.* einen Anti-Tumoreffekt durch Auslösung von Apoptose in Mäusen nachzuweisen (Mori 2001). Diese Ergebnisse deuten auf eine mögliche Rolle von  $\beta_2\text{M}$  als wachstumsregulierenden Faktor hin.

### 1.3 Makrophagen / Monozyten

Monozyten sind immunkompetente Zellen, die zur Gruppe der mononukleären Zellen gehören. Sie entstehen, wie andere weiße Blutzellen, im Knochenmark aus einer noch nicht eindeutig identifizierten pluripotenten hämatopoetischen Stammzelle. Nach Ausreifung im Knochenmark kommt es zur Ausschwemmung der Monozyten in das periphere Blut. Durch Migration ins Gewebe oder durch eine Aktivierung werden sie zu Makrophagen. Sie besitzen die Fähigkeit zur Chemotaxis, Zytokinese und Phagozytose. Durch Prozessierung phagozytierter Antigene und Präsentation durch den MHC Klasse II-Komplex auf der Zelloberfläche spielen Makrophagen eine wichtige Rolle in der unspezifischen und spezifischen Immunabwehr.

Makrophagen können durch bakterielle Lipopolysaccharide (LPS), durch Fremdartigene oder durch Komplementfaktoren aktiviert werden. Eine Aktivierung und Differenzierung von Monozyten führt zu einer Freisetzung von Zytokinen, wie Tumor-Nekrose Faktor, Interleukin-1 und Interleukin-6.

1988 wurde von Ziegler-Heitbrock *et al.* eine permanente Monozyten-Zelllinie aus dem Blut eines an einer monozytären Leukämie erkrankten Patienten etabliert (Ziegler-Heitbrock 1988b). Diese wurde in der vorliegenden Arbeit - neben primären Monozyten aus Spenderblut - als repräsentative Zelllinie zur Untersuchung der Rolle von monozytären Zellen für die  $\beta_2$ M-Amyloidose verwendet.

## 1.4 Zytokine

### 1.4.1 Tumor-Nekrose Faktor

Tumor-Nekrose Faktor-alpha ( $\text{TNF}\alpha$ ) ist ein nicht glykosiliertes Protein, das vornehmlich von Makrophagen und Monozyten, aber auch von neutrophilen Granulozyten, T-Zellen sowie natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) nach Stimulation durch LPS oder Interleukin-1 (IL-1) in die Umgebung freigesetzt wird.  $\text{TNF}\alpha$  ist ein Stimulus für die Sekretion von IL-6 in Makrophagen, dabei wird die Synthese von  $\text{TNF}\alpha$  durch IL-6, das am Ende einer Zytokin-Kaskade steht, inhibiert.

$\text{TNF}\alpha$  wirkt über spezifische Rezeptoren, die zur Superfamilie der sogenannten Todesrezeptoren gehören. Diese Rezeptoren kommen auf fast allen somatischen Körperzellen vor und verursachen *in vitro* die Zytostase und Zytolyse einiger Tumorzelllinien (Apoptose) (Baker und Reddy 1996; Krammer 2000). *In vivo* ist  $\text{TNF}\alpha$  essentiell für eine suffiziente Immunantwort.  $\text{TNF}\alpha$  ist zusammen mit IL-1 und IL-6 ein wesentlicher Entzündungsmediator.  $\text{TNF}\alpha$  erreicht bei der gramnegativen Sepsis *in vivo* sehr hohe Serumspiegel und ist mitverantwortlich für deren fulminanten Verlauf.

### 1.4.2 Interleukin-1

IL-1 ist ein weiteres zur Familie der Monokine gehörendes Polypeptid. Als primäre Quelle für die überwiegende Beta-Form (IL-1 $\beta$ ) wurden Makrophagen identifiziert, aber auch epitheliale und endotheliale Zellen sezernieren IL-1 $\beta$ . Es wird bei Infektionen und Verletzungen - vermittelt durch mikrobielle Antigene und aktivierte Komplementfaktoren als Hauptstimulatoren - an die systemische Zirkulation abgegeben. IL-1 $\beta$  bewirkt, durch Signaltransduktion an seinem spezifischen Rezeptor, ein weites Spektrum an proinflammatorischen, metabolischen,

neurologischen, immunologischen sowie hämatopoetischen Reaktionen. IL-1 $\beta$  führt im Hypothalamus zu einer Erhöhung der Körperkerntemperatur, induziert die Synthese von Cyclo- und Lipoxygenasen, bewirkt die Aktivierung von T-Lymphozyten, ist an der Pathogenese des toxischen Schocks beteiligt und reguliert zusammen mit IL-6 die Expression der Akute-Phase-Gene in Hepatozyten (siehe Kapitel 1.4.3) (Dinarello 1984, 1988; Dinarello und Savage 1989).

### 1.4.3 Interleukin-6

IL-6 ist ein pleiotropes Zytokin, das von zahlreichen Zellen nach Stimulation synthetisiert und sekretiert wird.

Hauptsyntheseorte für IL-6 sind Monozyten bzw. Makrophagen, Fibroblasten und Endothelzellen. Es wird als Folge einer Aktivierung von diesen Zellen ausgeschüttet. Stimulatoren sind neben bakteriellen Toxinen (LPS) auch andere Zytokine, z. B. TNF $\alpha$  und IL-1 $\beta$ . Zusammen mit diesen Zytokinen löst IL-6 eine systemische Reaktion im Gesamtorganismus aus. Ein Teil dieser systemischen Reaktion ist die sogenannte Akute-Phase-Antwort der Leber. Hierbei zählt IL-6 neben IL-1 $\beta$  *in vivo* und *in vitro* zu den Hauptstimulatoren (Andus 1989; Castell 1989, 1990; Heinrich 1990). Während der Akute-Phase-Reaktion der Leber kommt es zur Neusynthese und erhöhten Sekretion von Plasmaproteinen wie C-reaktivem Protein, Serum-Amyloid A,  $\alpha_1$ -Antichymotrypsin, Haptoglobin, Fibrinogen und  $\alpha_1$ -azidem Glykoprotein. Im Gegensatz zu einer vermehrten Produktion kommt es im Verlauf einer Akute-Phase-Reaktion auch zum Abfall der Serumkonzentrationen verschiedener Proteine, z. B. von Albumin und Transferrin als sogenannte negative Akute-Phase-Proteine.

IL-6 induziert ebenso die Immunglobulin-Produktion in aktivierten B-Lymphozyten, stimuliert die Koloniebildung hämatopoetischer Progenitorzellen, führt zu einer Differenzierung von T-Lymphozyten zu zytotoxischen T-Zellen, induziert neuronale Differenzierungsprozesse, ist ein Wachstumsfaktor für Plasmazytomzellen,

Mesangiumzellen oder Keratinozyten und fördert die Resorption der Knochenmatrix durch Osteoklasten (siehe Fig. 1.4.3). Des Weiteren ist IL-6 ein früher klinisch-chemischer Marker der neonatalen Sepsis (Berner 1998; Buck 1994).

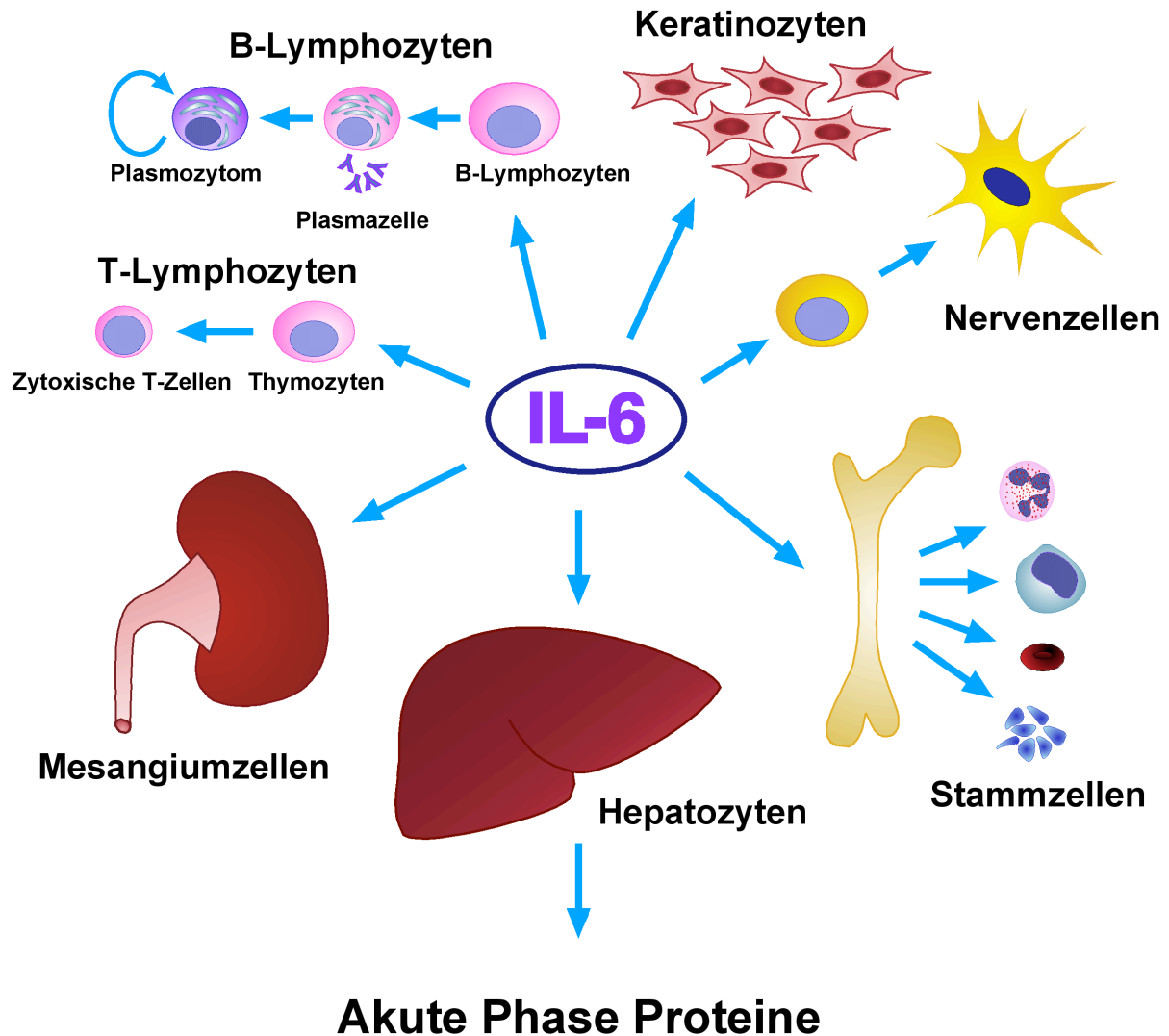


Fig. 1.4.3 : **Pleiotropes Wirkungsprektrum von Interleukin-6**

IL-6 übt auf verschiedene Zellen ganz unterschiedliche Wirkungen aus. Es induziert die Immunglobulinsynthese in aktivierten B-Lymphozyten, ist autokriner Wachstumsfaktor von Plasmazytomzellen, induziert die Differenzierung von T-Lymphozyten, ist Wachstumsfaktor für Mesangiumzellen der Nieren, induziert die Akute-Phase-Antwort der Leber, spielt eine Rolle bei der Differenzierung hämatopoetischer Vorläuferzellen, induziert die neuronale Differenzierung von neuronalen Vorläuferzellen und stimuliert die Proliferation von Keratinozyten.

Der IL-6-Rezeptor, an den das Zytokin auf der Zelloberfläche seiner Zielzellen bindet, setzt sich aus zwei Untereinheiten zusammen: Einem 80 kD großen löslichen, nicht fest auf der Oberfläche gebundenen Glykoprotein (*gp80*), das IL-6 bindet, und einer signaltransduzierenden, transmembranen, als *gp130* bezeichneten 130 kD Untereinheit (Rose-John 1990; Rose-John und Heinrich 1994). Nach Bindung eines IL-6-Moleküls an das *gp80* kommt es zur Assoziation mit der signaltransduzierenden Untereinheit, es entsteht ein ternärer Komplex. Durch eine anschließend stattfindende Dimerisierung mit einem weiteren IL-6-Rezeptorkomplex kommt es zur Signaltransduktion ins Zellinnere durch die *gp130*-Untereinheiten. Dabei werden die zytoplasmatischen Domänen des *gp130* durch sich autophosphorylierende, assoziierte Janus-Kinasen (*Jak*) an ihren Tyrosinseitenketten phosphoryliert. Die aktivierten *Jak* phosphorylieren wiederum zytoplasmatische Faktoren der STAT-Familie (*Signal Transducer and Activator of Transcription*) an den Tyrosinseitenketten ihrer SH<sub>2</sub>-Domänen. Nach Signaltransduktion durch IL-6 kommt es so zu einer Rekrutierung von STAT1 und STAT3 (APRF (*Acute Phase Response Factor*)). Nach Homo- oder Heterodimerisierung der STAT-Faktoren translozieren diese als Transkriptionsfaktoren in den Nukleus und binden dort an genregulatorische Elemente im Promotor-Bereich der Akute-Phase-Gene (Lütticken 1994; Wegenka 1993, 1994). Dies führt zu einer transkriptionellen Aktivierung dieser Gene.

Die pleiotrope Wirkung des IL-6 auf verschiedene Zellsysteme und dessen große Potenz zur Aktivierung der Akute-Phase-Antwort machen IL-6 zu einem potentiell bedeutsamen pathogenetischen Faktor bei der Expression von  $\beta_2$ M als Hauptbestandteil der  $\beta_2$ M-Amyloidose.

## 1.5 Interferone

Interferone sind von Körperzellen gebildete Zytokine mit einer komplexen Wirkung auf die Immunität und die Zellfunktion. Sie wirken auf verschiedenen Ebenen antiviral. Das von infizierten Körperzellen gebildete Interferon schützt die benachbarten Zellen vor einer voranschreitenden Virusinfektion. Des Weiteren beeinflussen Interferone über die Kontrolle der Expression von MHC Klasse I und Klasse II vor allem das zelluläre Immunsystem. Wegen ihrer nachgewiesenen indirekten antitumoralen Aktivität werden Interferone in der Tumorthherapie eingesetzt. Nach ihren unterschiedlichen Wirkungsspektren werden zwei verschiedene Typen von Interferonen unterschieden. Zu den Typ I-Interferonen gehören Interferon-alpha und Interferon-beta, zu den Typ II-Interferonen gehört Interferon-gamma.

### 1.5.1 Interferon-alpha

Interferon-alpha ( $\text{IFN}\alpha$ ) wird von Monozyten/Makrophagen, lymphoblastoiden Zellen, Fibroblasten und anderen Zellen produziert. Die  $\text{IFN}\alpha$ -Subtypen vermitteln durch ihre Rezeptoren eine antivirale, antiproliferative Wirkung und führen zur Aktivierung von NK-Zellen.  $\text{IFN}\alpha$  wird u. a. zur Therapie von Tumorerkrankungen wie z. B. dem malignen Melanom, der chronisch myeloischen Leukämie oder der Haarzelleukämie sowie Viruserkrankungen, wie der chronischen Hepatitiden B und C, eingesetzt (Lindemann 1988).

### 1.5.2 Interferon-gamma

Interferon-gamma ( $\text{IFN}\gamma$ ) wird von aktivierten T- und B-Lymphozyten sowie in NK-Zellen exprimiert und dient durch seinen antiproliferativen, antiviralen Effekt - vermittelt durch die erhöhte Expression von MHC Klasse II- und Klasse I-Molekülen -

der Elimination von Viren und Parasiten (Boehm 1997; Schroder 2004). Der IFN $\gamma$ -Rezeptor kann auf allen kernhaltigen Körperzellen nachgewiesen werden.

Interferone führen durch transkriptionelle Regulation zu einer vermehrten Produktion des MH-Komplexes. Darüber hinaus sind sie als potenter Induktor von  $\beta_2$ M lange bekannt (Fellous 1979, 1982; Heron 1978; Hokland 1981; Wallach 1982).

## 1.6 Extrakorporale Eliminationsverfahren

Extrakorporale Eliminationsverfahren wurden entwickelt, um die exkretorische Funktion der Niere so weit zu ersetzen, dass langfristig eine urämische Intoxikation bei Patienten mit terminaler Niereninsuffizienz vermieden werden kann.

Hierzu dienen die extrakorporalen Techniken der Hämodialyse oder der Hämofiltration. Als nicht extrakorporales Eliminationsverfahren steht die Peritonealdialyse in Form der sog. *Continuous Ambulatory Peritoneal Dialysis* (CAPD) oder als *Continuous Cycling Peritoneal Dialysis* (CCPD) zur Verfügung. Hierbei wird das Peritoneum zur Elimination der harnpflichtigen Substanzen als Membran genutzt.

### 1.6.1 Hämodialyse

Bei der Hämodialyse (HD) werden die harnpflichtigen Substanzen durch Diffusion entlang eines Konzentrationsgradienten zwischen Blut und Dialysat über eine semipermeable Membran entfernt. Blut und Dialysat werden dabei nach dem Gegenstromprinzip aneinander vorbeigeführt. Durch die Porengröße der verwendeten Dialysemembranen wird die Durchlässigkeit für die Substanzen definiert.

Mittels HD können dem Patienten gleichzeitig mangelnde Substanzen (Kalzium, Glukose oder auch Bikarbonat zur Pufferung) zugeführt werden, indem ihre Konzentration im Dialysat höher als ihr entsprechender Plasmaspiegel gewählt werden.

Durch eine in neuerer Zeit simultan stattfindende Ultrafiltration (Überdruck auf der Blutseite und daraus folgend ein hydraulisches Gefälle, s. u.) ist es möglich, dem Patienten eingelagerte Flüssigkeits-Volumina in Form von Plasmawasser zu entfernen.

### 1.6.2 Hämofiltration

Bei der Hämofiltration werden durch einen starken hydraulischen Gradienten über eine großporige Membran pro Sitzung große Volumina von Plasmawasser (bis zu 20 Liter) eliminiert. Durch konvektiven Transport können dabei die harnpflichtigen Substanzen und Elektrolyte entfernt werden. Die negative Volumenbilanz wird mittels spezieller steriler Elektrolytlösungen ausgeglichen. Durch Kombination von HD und Ultrafiltration ist die Hämofiltration zunehmend in den Hintergrund getreten, da bei der Kombination von HD und Ultrafiltration die Vorteile beider Verfahren miteinander vereint wurden.

## 1.7 Bioinkompatibilität

Der Kontakt zwischen Blut und Blutbestandteilen und Hämodialyse-Membranen führt zu einer großen Anzahl von Interaktionen zwischen den Blutelementen und den artifiziellen Dialysemembranen (Basile und Druke 1989; Cheung 1990; Dinarello 1990).

Die in den Anfängen der extrakorporalen Eliminationsverfahren verwendeten Zellulose-Membranen wurden durch chemisch modifizierte Zellulose-Membranen (beispielsweise Zelluloseacetat, Cuprammoniumzellulose (Cuprophan®)) ersetzt. Im heutigen klinischen Alltag kommen immer mehr synthetische Membranen (Polysulfon-, Polyacrylonitrilmembranen) zum Einsatz.

Da die Oberfläche dieser Membranen nicht völlig inert ist, reagieren Proteine und Zellen mit den Strukturen der Oberfläche. Es kommt im Rahmen dieser Auseinandersetzung mit dem körperfremden Material zu einer Entzündungsantwort. Dies führt zu einer am Patienten objektivierbaren Bioinkompatibilität (Hakim 1993). Die Patienten klagen akut über Symptome wie z. B. Kopfschmerzen, Nausea, Erbrechen, Lethargie (sog. *Slow Wave Sleep* im EEG) und Fieber. Die Patienten haben aufgrund einer Bronchokonstriktion eine nachweisliche Erhöhung der Atemfrequenz und einen Abfall des Blutdrucks bedingt durch eine Vasodilatation und negativ inotrope Effekte auf das Herz.

Nach durchgeführter Dialyse ist bei den Patienten regelmäßig eine Leukopenie als Ausdruck eines erhöhten *Turn Overs* von Leukozyten und Adsorption an den verwendeten Dialysemembranen feststellbar (Kaplow und Goffinet 1968).

Bei Langzeit-HD weisen alle Patienten eine unspezifische Erhöhung der Morbidität und Mortalität auf. Viele Patienten leiden unter teilweise schweren lebensbedrohlichen Infektionen (Mailloux 1991). Möglicherweise wird dies durch die während der HD in vielfältiger Form aktivierten Entzündungsreaktionen verursacht, da diese aufgrund dieser Aktivierung nicht mehr die eigentlichen Abwehrfunktionen zur Verfügung stehen oder refraktär sind (Hakim 1993). Die Aktivierung der monozytärer Immunreaktionen lässt sich durch *ex vivo* Messungen objektivieren.

Während und nach der HD kommt es zur messbaren Konzentrationserhöhungen proinflammatorischer Zytokine wie TNF, IL-1 und IL-6 (Luger 1987; Mege 1991; Pereira und Dinarello 1994; Pertosa 1993).

Eine andere Form der Immunantwort auf Dialysematerialien ist die Aktivierung der Komplementkaskade über den alternativen *Pathway*, wodurch wiederum immunologische Systeme des monozytären Systems aktiviert werden (siehe Kapitel 1.3) (Agostoni und Gardinali 1989).

In klinischen Untersuchungen konnte ebenso die Aktivierung anderer humoraler und zellulärer Abwehrmechanismen nach dem Dialysevorgang festgestellt werden. Arnaout *et al.* und Castiglione *et al.* konnten nach durchgeführter HD eine vermehrte Expression von granulozytären Adhäsionsproteinen an den Zellen nachweisen (Arnaout 1985; Castiglione 1991). Ebenso ist die Ausschüttung von Sauerstoffradikalen und lysosomalen Enzymen oder Leukotrienen aus Monozyten als Ausdruck der Aktivierung beschrieben (Himmelfarb 1991; Strasser und Schiffel 1991). Daneben treten Störungen der Thrombozytenfunktion und Gerinnungsstörungen auf. Zwar werden während des Dialysevorgangs Antikoagulantien wie Heparin verwendet, jedoch ist eine Aktivierung der Gerinnungskaskade an den Dialysemembranen nie vollkommen zu verhindern (Hakim und Schafer 1985).

Darüber hinaus sind die Effekte der neben den Membranen verwendeten Materialien (Schlauchsysteme) und Chemikalien (wie Sterilisationsmittel/-verfahren, PVC-Weichmacher oder Kunststoffadditive), des verwendeten Dialysats oder Kontaminationen mit Bakterien oder deren Bestandteilen wie Lipopolysacchariden (LPS) zu berücksichtigen. Hierbei kommt es ebenfalls zu Interaktionen zwischen körperfremden Oberflächen bzw. Substanzen und dem Immunsystem.

## 1.8 Pathogenese der Beta-2-Mikroglobulin-Amyloidose

Die Pathogenese der  $\beta_2$ M-Amyloidose ist bis heute nicht geklärt. Die sehr hohen Serumspiegel und die zum Teil massiven Amyloiddepots bei Patienten unter chronischer Nierenersatztherapie können nicht allein auf eine verminderte *Clearance* von  $\beta_2$ M über die verwendeten Dialysemembranen zurückgeführt werden. Zwar sind vereinzelte Berichte einer  $\beta_2$ M-Amyloidose bei Patienten mit chronischer Peritonealdialyse oder langem urämischem Stadium bekannt, jedoch ist die  $\beta_2$ M-Amyloidose im Vergleich zur Inzidenz unter chronischer HD unterrepräsentiert (Gagnon 1988; Moriniere 1991; Zingraff 1990).

Neben den unter chronischer Dialysebehandlung auftretenden Volumen- und Elektrolytstörungen und einer oft begleitenden Malnutrition können für die obengenannten Nebenwirkungen der HD immunologische Effekte und deren Folgen verantwortlich gemacht werden.

In verschiedenen Publikationen wurde die Adhärenz von Makrophagen an Membranen und demnächst subsequente Aktivierung beschrieben. Hierbei kommt es zur Aktivierung der Zellen und in der Folge zur Freisetzung monozytärer, proinflammatorischer Zytokine. Es kann daher angenommen werden, dass es an den Membranen zur direkten Stimulation der Monozyten kommt. Daraus folgt ein im Patientenserum und nach *in vitro* Dialyse messbarer Anstieg von proinflammatorischen Zytokinen ( $\text{TNF}\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6) (Anderson 1991; Chollet-Martin 1991; Dinarello 1990; Haeffner-Cavaillon 1989; Luger 1987; Mege 1991; Memoli 1991, 1992; Pereira und Dinarello 1994; Pereira 1995; Pertosa 1993; Schindler 1993). Ebenso kommt es zur Generierung freier Sauerstoffradikale und zur Freisetzung lysosomaler Proteasen aus aktivierten Makrophagen. Parallel dazu wird die Komplementkaskade über den alternativen *Pathway* an den Oberflächenstrukturen der Membranen durch die Faktoren C3 und C5 aktiviert, an deren Ende wiederum die Sekretion proinflammatorischer Zytokine und die Chemotaxis von Makrophagen und weiteren Entzündungszellen steht (siehe Kapitel 1.7) (Agostoni und Gardinali 1989).

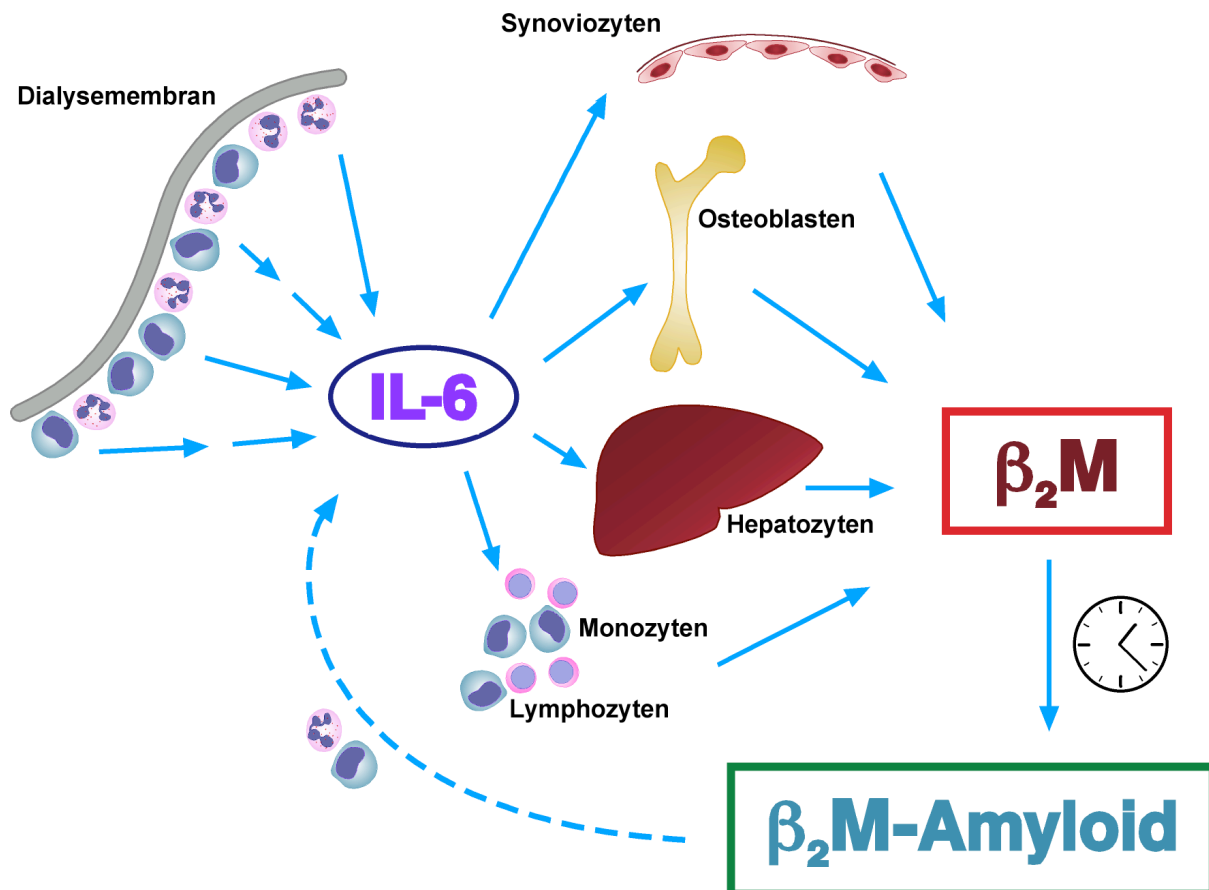


Fig. 1.8: **Mögliche Pathogenese der Beta-2-Mikroglobulin-Amyloidose**

Zellen des Immunsystems, wie Monozyten und neutrophile Granulozyten, werden an den biokompatiblen Hämodialyse-Membranen aktiviert. Dadurch kommt es auf direktem Wege oder über weitere Zellsysteme zu einer Ausschüttung proinflammatorischer Proteine, wie z. B. IL-6. Die durch IL-6 aus gelöste Akute-Phase-Antwort führt zur Produktion und Freisetzung von  $\beta_2$ M in Hepatozyten und Zellen des Immunsystems, wie Monozyten oder Lymphozyten. Weitere mögliche Zielzellen des IL-6-Signals könnten Zellen in der unmittelbaren Umgebung des von der  $\beta_2$ M-Amyloidose betroffenen osteoartikulären Gewebes sein.

Das durch Modifikationen im Laufe der Zeit entstehende  $\beta_2$ M-Amyloid könnte seinerseits wiederum zur Stimulation von Abwehrzellen führen und über eine IL-6-Antwort eine Verstärkung der pathologischen Reaktion bewirken.

Zusätzlich zu dieser materiellen Biokompatibilität der verwendeten Dialysemembranen ist eine Kontamination des Dialysates mit Pyrogenen wie Lipopolysacchariden (LPS) ein Problem. Schon in kleinen Mengen können die Bestandteile der Bakterien als sehr potentes Stimulanz auf Makrophagen wirken und als Ursache von

Nebenwirkungen der HD gesehen werden (Baz 1991; Haeffner-Cavaillon und Cavaillon 1987; Laude-Sharp 1990).

All diese Effekte der HD könnten direkt zur Freisetzung von  $\beta_2$ M aus zytoplasmatischen Granula, von der Zelloberfläche oder zur *de novo*-Synthese des  $\beta_2$ M in aktivierten Monozyten führen. Denkbar ist aber ebenso ein Umweg über eine Stimulation durch sezernierte Zytokine, die eine erhöhte Produktion von  $\beta_2$ M in anderen Körperzellen bewirken. Hepatozyten, Zellen des lymphatischen Systems, wären potentielle Zielzellen dieser Aktivierungskaskaden. Es ist bekannt, dass Hepatozyten bei vielen inflammatorischen Reaktionen am Ende der Signalkette stehen und systemische Reaktionen auslösen (siehe Kapitel 1.4). Die Zellen des lymphatischen Systems sind ebenfalls als Effektorzellen von Entzündungsreaktionen bekannt und könnten in der Pathogenese der  $\beta_2$ M-Amyloidose eine entscheidene Rolle spielen (siehe Fig. 1.8).

Eine weitere Relevanz könnten Zellen spielen, die sich in der Nähe der Amyloiddepots befinden, wie z. B. die Zellen des Bewegungsapparates (Chondrozyten, Synoviozyten, Osteoklasten/-blasten). Die sich nach weiterer Modifikation bildenden  $\beta_2$ M-Amyloidfibrillen könnten durch ihre veränderte Molekülstruktur zur Stimulation gewebständiger Entzündungszellen führen und wiederum eine Verstärkung der Pathogenese herbeiführen.

## 1.9 Zusammenfassung

Die HD-assoziierte  $\beta_2$ M-Amyloidose ist, bedingt durch den medizinischen Fortschritt und Mangel an entsprechenden Spenderorganen, eine Komplikation der maschinellen extrakorporalen Eliminationsverfahren, die in den letzten Jahren zunehmend an Bedeutung gewonnen hat. Die Patienten leiden unter teilweise erheblicher Immobilität und ausgeprägten Schmerzen. Es kommt im weiteren Verlauf zu einer Morbiditätssteigerung. Die Folgen der Erkrankungen führen zu einer zusätzlichen Hospitalisation der Patienten. In Einzelfällen kommt es zu einer erhöhten Mortalität (Floege und Ehlerding 1996). Die Pathogenese dieser progressiv verlaufenden Krankheit ist bis heute nicht geklärt. Basierend auf den neuen Kenntnissen in den letzten Jahren hinsichtlich der Biokompatibilität, liegt eine entzündliche Genese der  $\beta_2$ M-Amyloidose nahe.

Die vorliegende Arbeit untersucht die Bedeutung von Zytokinen, wie IL-1 $\beta$ , IL-6, und Interferonen als zentrale Mediatoren der Entzündung in Bezug auf die Entwicklung und den Verlauf der  $\beta_2$ M-Amyloidose.

## 1.10 Fragestellung

In dieser Arbeit soll zur Klärung der Pathogenese der  $\beta_2$ M-Amyloidose die Rolle von proinflammatorischen Zytokinen für die erhöhte Produktion oder Freisetzung von  $\beta_2$ M untersucht werden. Zytokine, die während eines Dialyseverfahrens im Körper generiert werden, könnten für die genetische Regulation des  $\beta_2$ M oder dessen Freisetzung verantwortlich sein.

In bisherigen Studien wurden die Experimente häufig auf die direkten Auswirkungen der Dialyse bzw. der Dialyse-Membranen auf die Konzentration von  $\beta_2$ M ausgerichtet. Klinische Studien zeigten, dass es durch den Kontakt zwischen Blutkompartimenten und Hämodialysemembranen zur Aktivierung der verschiedenen humoralen Abwehrsysteme in hämodialysierten Patienten kommt. Nach und während der Dialyse konnten erhöhte Spiegel von Zytokinen gemessen werden (Carreno 1997; Herbelin 1990; Luger 1987; Mege 1991; Pertosa 1993). Daher wäre es denkbar, dass die Induktion der  $\beta_2$ M-Freisetzung in Geweben und Zellsystemen stattfindet, die keinen direkten Kontakt zu den in der Dialyse eingesetzten Membranen haben. Hierbei könnte IL-6 eine entscheidene Rolle als Mediator der Akute-Phase-Reaktion spielen. Dies könnte bedeuten, dass  $\beta_2$ M als ein weiteres Protein der Akute-Phase-Reaktion anzusehen wäre.

## 1.11 Methodik

Zur Untersuchung des Einflusses von proinflammatorischen Zytokinen werden in den Experimenten Zelllinien aus der Leber (HepG2, HuH7) und aus den mononukleären Zellsystem (Jurkat, MonoMac6) als Modelle für ihre entsprechenden Organe untersucht. Als Quelle für primäre Zellen stehen aus Spenderblut isolierte Monozyten sowie kultivierte Synoviozyten aus einem operativen Präparat zur Verfügung.

Die Zelllinien und primären Zellen werden unter Kulturbedingungen mit rekombinanten IL-6 und IL-1 $\beta$  inkubiert. Unter diesen Bedingungen ist es möglich, die Wirkung der einzelnen verwendeten Zytokine auf die *de novo*-Synthese von  $\beta_2$ M bzw. die Freisetzung aus zellulären Speichern der Zellen zu untersuchen. Störende oder additive Einflüsse, die bei Untersuchungen *in vivo* auftreten können, werden durch diese Vorgehensweise eliminiert. Nach den Beendigungen der Inkubation über variierte Zeitintervalle und Konzentrationen wird durch Präparationen von  $\beta_2$ M-mRNA und  $\beta_2$ M-Protein der Einfluss der Zytokine mit verschiedenen Analysemethoden untersucht.

Als Methoden stehen klassische Verfahren der Molekularbiologie zur Verfügung. Durch den qualitativen Vergleich der entsprechenden mRNA im *Northern Blot* ist es möglich, den Einfluss der Monokine auf die Transkription des  $\beta_2$ M-Gens zu bestimmen. Die Untersuchungstechnik der Immunpräzipitation erlaubt nach radioaktiver Markierung aller neu synthetisierten Zellproteine sowohl die Abschätzung der *de novo*-Synthese als auch der Freisetzung von  $\beta_2$ M. Durch einen *Immuno Blot* kann freies  $\beta_2$ M im Kulturüberstand detektiert werden. Eine quantitative Analyse des  $\beta_2$ M im Medium ist mittels ELISA (*Enzym Linked Immuno Sorbent Assay*) möglich.

## 2 Material

### 2.1 Geräte

Begasungsbrutschrank T10A	(Heraeus Sepatech, Osterode)
DNA/RNA-Elektrophoresekammern	
RNA SubCell	
DNA WideMini SubCell	
DNA Mini SubCell	(Biorad Laboratories, München)
ELISA Reader Spectra Shell	(SLT, Salzburg, (Österreich))
Geltrockner Modell 583	(Biorad Laboratories, München)
Heizblock Thermostat 5320	(Eppendorf, Hamburg)
Kühlfalle <i>Vapor Trap</i>	(Biorad Laboratories, München)
Magnetrührer M 20/1	(Framo-Gerrätetechnik, Eisenbach)
Mikroskop (invertiert) DM IL	(Leitz, Wetzlar)
Netzgeräte	
PowerPac 300	
PowerPac 3000	(Biorad Laboratories, München)

---

pH-Meter 761 calimatic	(Knick, GmbH & Co., Berlin)
Pipetten Gilson	
P2, P10, P20, P100, P200, P1000	(Gilson, Villiers-le-Bel (Frankreich))
Proteinelektrophoresekammern	
Protean Iixi	
MiniProtean II	(Biorad Laboratories, München)
MidiCell	(Biometra, Goettingen)
<i>Immuno Blot</i> Kammer cti	(Chemie + Werkstoff Technik, Idstein)
Photometer GeneQuant II	(Pharmacia Biotech, Freiburg)
Reinstwasseranlage Milli-Q UF plus	(Millipore, Eschborn)
Sterilarbeitsbank LaminAir HBB 2472	(Heraeus Sepatech, Osterode)
Szintillationszähler 112219 RackBeta	(LKB, Bromma, (Finnland))
Trockenschrank T5042E	(Heraeus Sepatech, Osterode)
Vakuumpumpe	(Biorad Laboratories, München)
Waagen	
AC 211S, LC 621S	(Sartorius AG, Göttingen)
Wasserbad Julabo SW 21	(Julabo Labortechnik GmbH ,Seelgut)
Zentrifugen	
5410, 5415 C	(Eppendorf, Hamburg)
Megafuge 1.0R	(Heraeus Sepatech, Osterode)

## 2.2 Chemikalien

Acrylamid	(Serva, Heidelberg)
Agarose SeaKem LE	(Biozym, Hess. Oldendorf)
Albumin, bovines Fraktion V (BSA)	(Serva, Heidelberg)
$\epsilon$ -Amino-n-Caprinsäure	(Sigma, Dreisenhofen)
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	(Merck, Darmstadt)
Antifoam A	(Sigma, Dreisenhofen)
Borsäure	(Merck, Darmstadt)
Bromphenolblau	(Serva, Heidelberg)
Calciumchlorid	(Sigma, Dreisenhofen)
Chloroform	(Merck, Darmstadt)
Dextransulfat	(Pharmacia, Freiburg)
Di-Natriumhydrogenphosphat-dihydrat	(Merck, Darmstadt)
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	(Sigma, Dreisenhofen)
Dimethylsulfoxid (DMSO)	(Sigma, Dreisenhofen)
Essigsäure	(Merck, Darmstadt)
Ethanol	(Merck, Darmstadt)
Ethidiumbromid	(Sigma, Dreisenhofen)
Formaldehyd	(Merck, Darmstadt)
Formamid	(Merck, Darmstadt)
Glucose	(Gibco BRL, Eggenstein)
Glycerol	(Sigma, Dreisenhofen)
Glycin	(Serva, Heidelberg)
Guanidiniumisothiocyanat (GTC)	(Sigma, Dreisenhofen)
Insulin	(Sigma, Dreisenhofen)
Kaliumchlorid	(Merck, Darmstadt)
Kaliumdihydrogenphosphat	(Merck, Darmstadt)
Magnesiumchloridhexahydrat	(Merck, Darmstadt)
$\beta$ -Mercaptoethanol	(Merck, Darmstadt)

---

Methanol	(Merck, Darmstadt)
Morpholinopropansulfonsäure (MOPS)	(Sigma, Dreisenhofen)
Natriumacetat	(Merck, Darmstadt)
Natriumcarbonat	(Merck, Darmstadt)
Natriumchlorid	(Merck, Darmstadt)
Natriumcitrat-monohydrat	(Merck, Darmstadt)
Natriumlaurylsulfat (SDS)	(Sigma, Dreisenhofen)
Natriummethyldiamintetraacetat (EDTA)	(Boehringer, Mannheim)
Dinatriumhydrogenphosphat	(Merck, Darmstadt)
N-Natriumlaurylsacrosin	(Sigma, Dreisenhofen)
Natriumsalicylat	(Merck, Darmstadt)
Natriumthiosulfatpentahydrat	(Merck, Darmstadt)
Oxalacetat	(Sigma, Dreisenhofen)
Penicillin/Streptomycin	(Gibco BRL, Eggenstein)
Phenol	(Merck, Darmstadt)
p-Phenylendimin	(Sigma, Dreisenhofen)
Propan-(2)-ol	(Merck, Darmstadt)
Pyruvat	(Sigma, Dreisenhofen)
Rotiszint	(Roth, Karlsruhe)
Silbernitrat	(Merck, Darmstadt)
N, N ,N', N'-Tetramethyldiamin (TEMED)	(Serva, Heidelberg)
Trichloressigsäure (TCA)	(Merck, Darmstadt)
Tris(hydroxymethyl)aminomethan	(Roth, Karlsruhe)
Triton X-100	(Serva, Heidelberg)
Trypanblau	(Sigma, Dreisenhofen)
Tween 20	(Sigma, Dreisenhofen)

## 2.3 Biochemikalien

### 2.3.1 Zytokine

- rhIL-6 präpariert nach Arcone *et al.* aus *E.coli* (Arcone 1991)  
( $1 \times 10^6$  *B-Cell Stimulatory Factor-2 units*/mg Protein).
- rhIL-1 $\beta$  Dr. A. Shaw (Glaxo, Institut für Molekularbiologie, Genf (Schweiz))  
( $1.3 \times 10^7$  *units*/mg)
- rhIFN $\gamma$  Dr. Friedemann Horn, Institut für Biochemie, RWTH Aachen
- rhIFN $\alpha_{\square\square}$  Roferon<sup>®</sup>, Firma Roche, Basel (Schweiz)

### 2.3.2 Komplementäre DNA-Sonden (cDNA)

pBluescript SK(+/-) Plasmid, enthält die komplette humane  $\beta_2$ M-cDNA  
(freundlicherweise zur Verfügung gestellt von W. Mikultis (Institut für Molekulare  
Biologie, Universität Wien, Österreich)) (Krimpenfort 1987; Ploegh 1979)

$\alpha_1$ -Anti-Chymotrypsin

Institut für Biochemie RWTH Aachen

### 2.3.3 Proteine

humanes  $\beta_2$ -Mikroglobulin, gewonnen aus Urin

Sigma Immunochemicals M-4890

### 2.3.4 Lipopolysaccharid

Lipopolysaccharid (LPS), generiert aus *Listeria monocytogenes*

### 2.3.5 Antikörper

anti-humanes  $\beta_2$ -Mikroglobulin (monoklonal, aus der Maus, Klon BM-63)

Sigma Immunochemicals, M-7398, für *Immuno Blots*

anti-humanes  $\beta_2$ -Mikroglobulin (polyklonal, aus dem Kaninchen)

Sigma Immunochemicals, M-8523, für Immunpräzipitation

anti-humanes HLA Klasse I-Antigen Klon W<sub>6/32</sub> (monoklonal, aus der Maus)

DAKO Diagnostika, M 0736, Hamburg, für *Immuno Blots*

anti-humanes  $\alpha_1$ -Antichymotrypsin (polyklonal, aus dem Kaninchen)

DAKO Diagnostika, A 0022, Hamburg, für Immunpräzipitation

### 2.3.6 ELISA

$\beta_2$ -Mikroglobulin ELISA (*Enzym Linked Immuno Sorbent Assay*)

Immuno Biological Laboratories, Hamburg

### 2.3.7 Enzyme

*Random Primed DNA Labeling Kit*  
Boehringer, Mannheim

Restriktionsendonuklease *EcoRI*  
Boehringer, Mannheim

Restriktionsendonuklease *XhoI*  
Boehringer, Mannheim

Trypsin [0,25 % in PBS]  
Gibco BRL, Eggenstein

### 2.3.8 Radiochemikalien

$\alpha$ -[<sup>32</sup>P]-dATP (3000 Ci/mmol)  
Amersham Buchler, Braunschweig

Tran-[<sup>35</sup>S]-label (37 TBq/mmol)  
ICN Biomedicals GmbH, Meckenheim

### 2.3.9 Zellkulturartikel

Falcon Petrischalen für Gewebekultur, 35 mm Durchmesser

Falcon 3046 Multiwell mit 6 Vertiefungen, Flachboden

Falcon 3047 Multiwell mit 24 Vertiefungen, Flachboden

Falcon 3072 Mikrotest mit 96 Vertiefungen, Flachboden

Greiner Gewebekulturflasche, 75 cm<sup>2</sup>, 250 ml

Greiner Gewebekulturschalen für Gewebekultur, 100 mm Durchmesser

Falcon 50 ml Zentrifugenröhrchen

### 2.3.10 Eukaryotische Zelllinien

#### B9-Zellen

permanente Maus-Hybridoma-Zelllinie, in Suspensionskultur wachsend von Dr. I. Aarden, Amsterdam, Niederlande (Aarden 1987; Brakenhoff 1987)

#### D10N-Zellen

permanente Maus-T-Helfer-Zelllinie, in Suspensionskultur wachsend (Sauerwein 1987)

#### MonoMac6-Zellen

permanente, monozytische Zelllinie, in Suspensionskultur wachsend, von Dr. Ziegler-Heitbrock, München (Ziegler-Heitbrock 1988b)

#### HepG2-Zellen

permanente, adhärent wachsende, humane Hepatom-Zelllinie (ATCC; HB 8058) (Aden 1979; Knowles 1980)

#### HuH7-Zellen

permanente, adhärent wachsende, humane Hepatom-Zelllinie (Nakabayashi 1982, 1984)

#### Jurkat-Zellen

permanente T-Zell-Leukämie-Zelllinie, in Suspensionskultur wachsend (Schneider 1977)

### 2.3.11 Zellkulturmedien

Alle verwendeten Medien und Zellkultursupplemente wurden von der Firma Gibco BRL, Eggenstein, bezogen.

## **3 Methoden**

### **3.1 Kultur eukaryotischer Zellen**

Die Kultivierung aller Zellen erfolgte bei 37°C in Wasser-gesättigter Luft mit 5 % CO<sub>2</sub>-Anteil. Die Medien enthielten, soweit nicht anders angegeben, 10 % FCS (*Fetal Calf Serum*), 200 U/ml Penicillin G und 200 µg/ml Streptomycin.

#### **3.1.1 Einfrieren von Zelllinien**

Zum Einfrieren wurden Zellen in Suspensionskultur bei 400x *g* für 5 Minuten (min) sedimentiert. Adhärente Zellen wurden zuvor mit 0,25 %-iger Trypsin-Lösung von der Kulturplatte abgelöst. Das Sediment wurde in Einfriermedium (4°C) resuspendiert und in gekühlte Kryoröhrchen aliquotiert. Der Zusatz von Dimethylsulfoxid (DMSO) verhindert die Schädigung der Zellstrukturen durch Vermeidung von Kristallbildung während des Einfriervorgangs. In 1 ml der Zellsuspension befanden sich ca. 2 x 10<sup>6</sup> Zellen. Die Zellen wurden langsam für mindestens 24 Stunden (h) auf -80°C

heruntergekühlt (ca. 1°C/min) und anschließend zur Langzeitaufbewahrung in flüssigen Stickstoff (-170°C) überführt.

<b>Einfriermedium:</b>	70 %	Kulturmedium
	20 %	FCS
	10 %	Dimethylsulfoxid (DMSO)

### 3.1.2 Auftauen von Zelllinien

Die in Kryoröhrchen eingefrorenen Zellen wurden aus dem flüssigen Stickstoff genommen und schnell bei 37°C im Wasserbad so weit aufgetaut, dass noch ein Eiskern im Inneren der Zellsuspension erhalten blieb. Der Inhalt des Röhrchens wurde sofort in 50 ml vorgewärmtes Kulturmedium gegeben und die Zellen bei 400x *g* sedimentiert. Der Überstand wurde abgenommen, um zytotoxisches DMSO zu entfernen. Die Zellen wurden noch einmal mit Kulturmedium gewaschen, anschließend in neuem Kulturmedium aufgenommen und in eine Kulturflasche gegeben.

### 3.1.3 Kulturbedingungen für B9-Zellen

Bei den B9-Zellen handelt es sich um eine murine Hybridoma-Zelllinie, die 1987 von Aarden *et al.* etabliert wurde (Aarden 1987; Brakenhoff 1987; Lansdorp 1986). Die Zellen reagieren in ihrem Wachstumsverhalten sehr empfindlich auf IL-6 und eignen sich daher zur Detektion von IL-6 in einem *Bioassay* (s. u.). Mit diesem Proliferationstest ist die Quantifizierung von IL-6 im Picogramm-Bereich möglich.

Dem Kulturmedium der Zellen muss daher IL-6 als wachstumsfördernder Faktor zugesetzt werden. Die Zellen wachsen in Suspensionskultur und bilden nach Mitose kleinere Zellaggregate.

<b>Kulturmedium:</b>	Iscolve's Modified Dulbecco's Medium (IMDM)
	+ 5 % FCS
	+ 2 mM Glutamin
	+ 50 mM 2-Mercaptoethanol
	+ 100 U/ml Interleukin-6

<b>Waschmedium:</b>	Iscolve's Modified Dulbecco's Medium
	+ 2 mM Glutamin
	+ 50 mM 2-Mercaptoethanol

### 3.1.3.1 B9-Proliferations-Assay

Von den zu testenden IL-6-haltigen Proben wurden auf einer 96-er-Mikrotiter-Zellkulturschale Verdünnungsreihen angesetzt (12 Verdünnungsstufen, Verdünnung 1:1). Bei jedem Versuch wurde eine IL-6-Standardverdünnungsreihe (10 pg rhIL-6/100  $\mu$ l aus *E. coli* als Ausgangskonzentration) parallel mitgeführt. Je 100  $\mu$ l Probe wurde in die erste Vertiefung gegeben, in alle anderen Vertiefungen wurden je 50  $\mu$ l Testmedium (s. u.) vorgelegt. Es erfolgte die sukzessive Verdünnung mit je 50  $\mu$ l Volumen der ersten Vertiefung. Nach abgeschlossener Verdünnung wurden pro Vertiefung 5000 B9-Zellen (zweimal mit Waschmedium zur Entfernung des IL-6 aus dem Kulturmedium gewaschen) in 50  $\mu$ l Testmedium gegeben. Nach 68 h Inkubation wurde die Proliferationsrate bestimmt. Hierzu wurde 3-(4,5-Dimethylthiazolyl-2)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT) zu den Zellen gegeben. MTT wird von stoffwechselaktiven Zellen zu Formazan umgesetzt. Nach vier weiteren Stunden Inkubation erfolgte die photometrische Messung des MTT-Umsatzes. Der Formazan-Farbstoff wurde in 100  $\mu$ l Isopropanol inkl. 0,01 N HCl gelöst und bei einer Anregungswellenlänge von  $\lambda=550$  nm und einer Emissionswellenlänge von  $\lambda=690$  nm quantifiziert.

<b>Testmedium:</b>	Iscolve's Modified Dulbecco's Medium
	+ 5 % FCS
	+ 2 mM Glutamin
	+ 50 mM 2-Mercaptoethanol

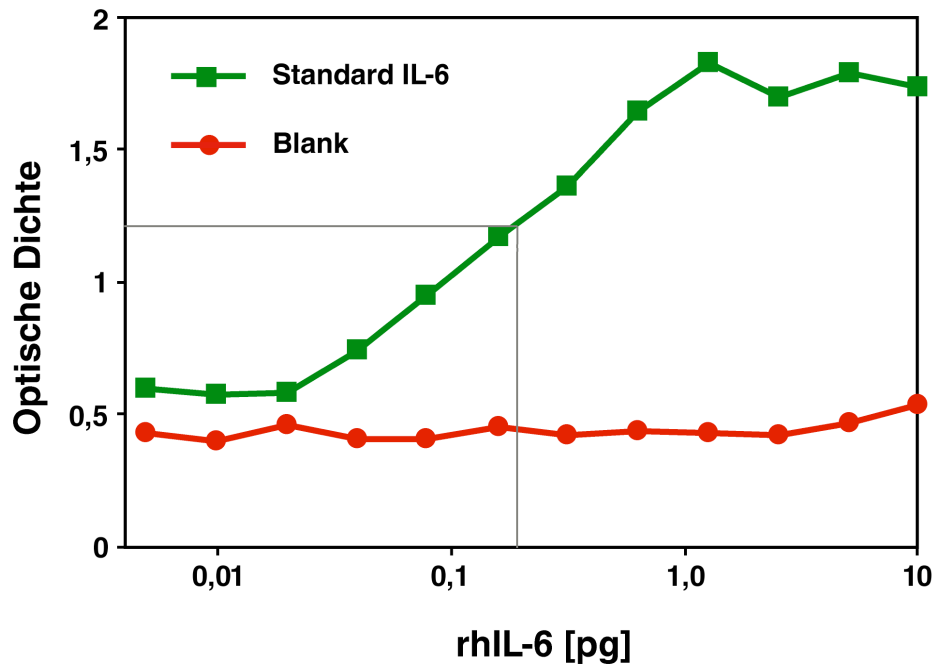


Fig. 3.1.3: **Typischer Verlauf einer IL-6-Standardkurve im B9-Proliferationstest**

Das B9-Kulturmedium wurde im Verhältnis von 1:1 mit dem zu testenden Medium (hier ein IL-6-Standard) über die 12 Vertiefungen einer Mikrotiterplatte verdünnt. Nach 68 h erfolgte die Zugabe des MTT-Farbstoffs, nach weiteren 4 h Inkubation bei 37°C wurden die entstandenen Farbpigmente mit Isopropanol gelöst und es erfolgte die Ermittlung der Zellproliferation über die Messung der optischen Dichte. In der Abbildung ist eine B9-Einheit eingezeichnet (graue Linie), definiert durch die IL-6-Konzentration, bei der die Zellen ihr halbmaximales Wachstum erreicht haben.

### 3.1.4 Kulturbedingungen für D10N-Zellen

Die D10N-Zelllinie ist eine von T-Helfer-Zellen abstammende, permanente Zelllinie aus der Maus. Sie ist in ihrem Wachstumsverhalten abhängig vom Zusatz von IL-1 und IL-2 und als weiteres Supplement von Concanavalin A, das als Antigensersatz wirkt (Sauerwein 1987). Durch diese spezifischen Eigenschaften der D10N-Zellen ist es möglich, IL-1 $\beta$  in einem Proliferationstest zu quantifizieren.

Die Zellen sind relativ groß und rund, mit starker Neigung zur Aggregatbildung. Die Kultur erfolgt in Suspensionskultur.

<b>Kulturmedium:</b>	RPMI 1640
	+ 10 % FCS
	+ 2 mM L-Glutamin
	+ 50 mM 2-Mercaptoethanol
	+ 1 ng/ml rhIL-1 $\beta$ oder ca. 2 % LPS-Monozytenüberstand)
	+ 10 U/ml rhIL-2
	+ 3 $\mu$ g/ml Concanavalin A
	+ 1 x Nichtessentielle Aminosäuren
	+ 1 mM Natriumpyruvat

<b>Waschmedium:</b>	RPMI 1640
	+ 2 mM L-Glutamin
	+ 50 mM 2-Mercaptoethanol
	+ 1 x Nichtessentielle Aminosäuren
	+ 1 mM Natriumpyruvat

<b>Testmedium:</b>	RPMI 1640
	+ 10 % FCS
	+ 2 mM L-Glutamin
	+ 50 mM 2-Mercaptoethanol
	+ 1 x Nichtessentielle Aminosäuren
	+ 1 mM Natriumpyruvat

### 3.1.5 Kulturbedingungen für HepG2-Zellen

HepG2-Zellen wurden von Aden und Knowles aus dem Leberzellkarzinom eines Patienten isoliert und als Zelllinie etabliert (Aden 1979, Knowles 1980). Die Zellen sind sehr stoffwechselaktiv und reagieren auf Stimulation durch Zytokine – ähnlich wie primäre Hepatozyten - mit der Produktion von Akute-Phase-Proteinen. HepG2-Zellen können als Modellzellen für humane Hepatozyten angesehen werden. Die Kultivierung der HepG2 erfolgte in einem DMEM/F-12-Gemisch. Die Zellen wachsen adhärent.

Zur Passage wurden die subkonfluenten Zellen einmal mit warmem (37°C) PBS (*Phosphate Buffered Saline*) gewaschen, um Trypsin-inhibierende Serumrückstände zu entfernen, und anschließend mit Trypsin-Lösung [0,25 % in PBS] für 5 - 7 min bei

37°C inkubiert. Die überstehende Trypsin-Lösung wurde entfernt und die Zellen mit Kulturmedium aufgenommen. Um verbliebene Zellaggregate zu lösen, wurden die Zellen durch mehrmaliges Scheren mit einer Kanüle (21 G) vereinzelt und anschließend in frischem Kulturmedium (Verdünnung 1:5) ausplattiert. Nach zwei bis drei Tagen erfolgte ein Wechsel des verbrauchten Mediums, nach weiteren zwei Tagen waren die Zellen bis zur Konfluenz gewachsen und konnten erneut passagiert werden.

**Kulturmedium:** Dulbecco's Modified Eagle's Medium/Nut-Mix F-12 + Glutamax™  
+ 10 % FCS

**PBS [1x]:** 137 mM NaCl  
2,7 mM KCl  
8 mM Na<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>  
1 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>  
mit HCl auf pH=7,4 einstellen

**Trypsin-Lösung:** 0,25 % in PBS [1x]

### 3.1.6 Kulturbedingungen von HuH7-Zellen

HuH7-Zellen sind aus einem humanen hepatozellulären Karzinom etabliert worden (Nakabayashi 1982, 1984). Zur Passage wurden konfluente Kulturen mit warmen PBS gespült und danach mit Hilfe von Trypsin-Lösung vom Schalenboden gelöst (5 min bei 37°C), in frischem Kulturmedium aufgenommen und bei 400x *g* für 5 min sedimentiert, um zellschädigendes Trypsin zu entfernen. Das Zellpellet wurde in frischem Kulturmedium aufgenommen und die Zellen in einer Verdünnung von 1:5 weiterkultiviert.

**Kulturmedium:** DMEM/Nut-Mix F-12 + Glutamax I™  
+ 10 % FCS

### 3.1.7 Kulturbedingungen von MonoMac6-Zellen

MonoMac6-Zellen sind 1988 von Ziegler-Heitbrock *et al.* aus dem Blut eines an monoblastischer Leukämie erkrankten Patienten isoliert worden. Sie zeigen die funktionellen und phänotypischen Eigenschaften des reifen Monozyten. So exprimieren sie NaF-sensitive, unspezifische Esterase, bilden reaktiven Sauerstoff und werden von dem Monozyten-typischen monoklonalen Antikörper *My4* erkannt (Ziegler-Heitbrock 1988a, 1988b). Des Weiteren sind sie zur Phagozytose befähigt. MonoMac6-Zellen wachsen in Suspensionskultur und haben eine Verdoppelungszeit von ca. 36 h. Sie reagieren sehr empfindlich auf Veränderungen ihrer Mikroumgebung (Bewegungen des Mediums), weshalb eine optimale Proliferationsrate nur in 24 *Well*-Kulturplatten erzielt werden konnte. Die Zellen wurden zu je  $5 \times 10^4$  Zellen pro Vertiefung in 2 ml RPMI 1640-Medium ausgesät. Nach ca. vier Tagen Inkubation wurde eine Passage der Zellen notwendig. Dazu wurden die Zellen mittels einer Pipette aus den Vertiefungen gespült (1 - 2-maliges Spülen war notwendig, um die zum Teil adhäsiven Zellen von der Wand der Kulturschalen zu lösen). Es erfolgte eine Aufteilung der Zellen im Verhältnis 1:4.

<b>Kulturmedium:</b>	RPMI 1640	
	+ 10 %	FCS, endotoxinfrei (SERVA, Heidelberg)
	+ 2 mM	L-Glutamin
	+ 2 x	Nichtessentielle Aminosäuren
	+ 9 mg/ml	Insulin
	+ 1 mM	Oxalat
	+ 1 mM	Natriumpyruvat

Insulin wurde in einem Gemisch (5:6 (v/v)) aus phosphatfreien Puffer A und 7,5 % NaHCO<sub>3</sub>-Puffer, pH=8,2, gelöst.

<b>Puffer A:</b>	8000 mg	NaCl
	400 mg	KCl
	1000 mg	D-(+)-Glucose
	350 mg	NaHCO <sub>3</sub>
	ad 1000 ml	H <sub>2</sub> O
	mit	CO <sub>2</sub> auf pH=6,0 eingestellt

Bei der Herstellung aller Lösungen wurde Lipopolysaccharid-freies *Aqua ad iniectabilae* verwendet, da MonoMac6-Zellen sehr sensibel auf LPS mit Bildung von *Clustern* und Aktivierung reagieren.

Alle Lösungen wurden vor Gebrauch sterilfiltriert.

### 3.1.8 Isolierung von Monozyten aus dem *Buffy Coat* und deren Kultivierung

Ausgangsmaterial zur Monozytengewinnung waren *Buffy Coats* (ca. 40 - 50 ml), die aus Frischblut (ca. 500 ml) von gesunden Blutspendern (Institut für Transfusionsmedizin des Klinikums Aachen) durch Zentrifugation (3100x *g*, 20 min, bei Raumtemperatur (RT)) gewonnen wurden.

Die Isolierung der mononukleären Zellen aus den Gesamt-Leukozyten erfolgte über einen Ficoll-Paque-Gradienten (Bøyum 1964, 1968). Der *Buffy Coat* wurde auf zwei vorgelegte Ficoll-Kissen (je 20 ml) aufgeteilt und bei RT zentrifugiert (532x *g*, 40 min, ungebremst). Die Monozyten und Lymphozyten, die sich nach der Zentrifugation oberhalb des Gradienten befanden, wurden mittels einer Pasteurpipette in ein steriles Röhrchen pipettiert. Zur Entfernung des restlichen Ficoll - und um eine Aktivierung der sich in der Zellsuspension befindenden Thrombozyten zu vermeiden - wurden die Zellen einmal mit PBS + 2 mM EDTA und anschließend dreimal mit Waschmedium gewaschen (jeweils 250x *g*, 10 min). Die schließlich in ca. 5 ml Waschmedium resuspendierten Zellen wurden dann über einen präformierten Percoll-Gradienten weiter aufgereinigt (Gutierrez 1979; Kurnick 1979; Pertoft 1978). Dazu wurde ein 35 ml-Percoll-Gradient hergestellt (17000x *g*, 10 min, 4°C, ungebremst) und die Zellen vorsichtig auf diesen Gradienten geschichtet. Nach Zentrifugation (532x *g*, 40 min, 4°C, ungebremst) konnten die Monozyten oberhalb des Gradienten isoliert werden. Nach drei weiteren Waschschrritten zur Entfernung von Percoll-Verunreinigungen wurden die Zellen mittels Türkscher Lösung (Gentianaviolett + Essigsäure) gefärbt und gezählt. Hierbei werden nur die Leukozyten angefärbt und evtl. verunreinigende Erythrozyten werden lysiert. Anhand der Zellzahl lässt sich die Effizienz der Isolierung monozytärer Zellen abschätzen, mittels FACS-Analyse (*Fluorescence*

*Activated Cell Sorter*) konnte nach morphologischen und immunologischen Kriterien die Reinheit der Präparation bestimmt werden.

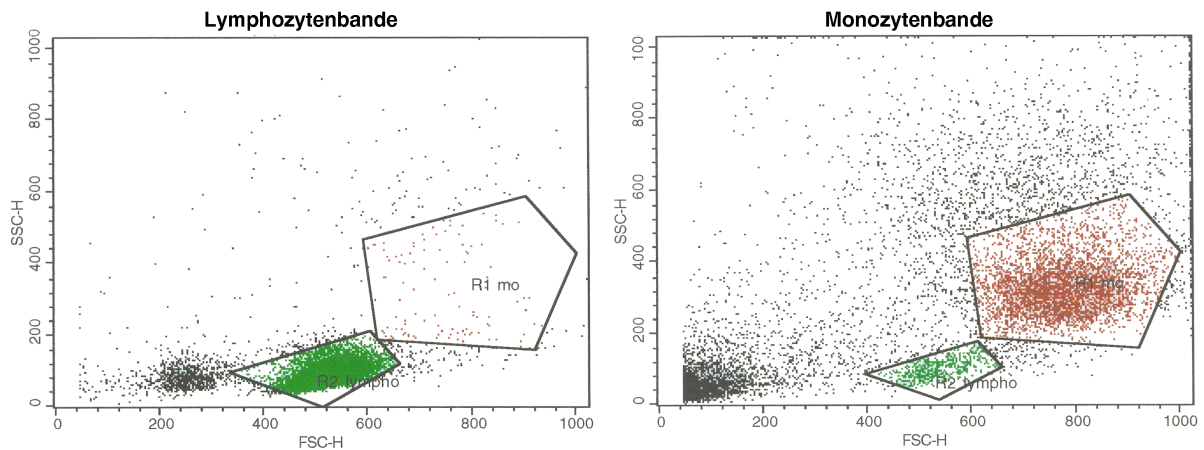


Fig. 3.1.8: **Analyse der isolierten Monozyten im FACS nach Isolierung über Percoll-Gradienten**

Die Zellen wurden in einem *Plot* nach Größe (FSC) und Granularität (SSC) aufgetragen. In der linken Darstellung ist der hohe Lymphozytengehalt der Lymphozytenbande nach durchgeführtem Percoll-Gradienten sichtbar. In der Darstellung der Monozytenbande (rechts) erscheinen die Monozyten als größere und granulierte Zellen. In der Quantifizierung betrug der Monozyten-Anteil der vitalen Zellen über 80 %.

Die Kultivierung der Monozyten erfolgte in PTFE-beschichteten Foliensäckchen. Hierdurch konnte eine Adhäsion und Aktivierung durch das Polystyrol konventioneller Kulturschalen mit folgender Differenzierung der Zellen zu Makrophagen-Spezies verhindert werden. Die Zellen wurden einer Konzentration von  $2 \times 10^6$  Zellen/ml in Kulturmedium kultiviert. Die Experimente wurden 5 h nach Präparation der Zellen gestartet.

**Waschmedium:**

S-MEM with Earle's Salts

- + 5 mM  $\text{NaHCO}_3$
- + 2 mM L-Glutamin

<b>Percoll-Gradient:</b>	49,5 %	Percoll
	5,5 %	PBS [10x]
	45 %	Waschmedium

<b>Kulturmedium:</b>	RPMI 1640	
	+ 2 %	FCS (LPS getestet)
	+ 2 mM	L-Glutamin
	+ 2 mM	Hepes

### 3.1.8.1 Gewinnung von Lipopolysaccharid-konditionierten Monozytenüberständen

Zur Gewinnung von Lipopolysaccharid-(LPS)-konditionierten Monozyten-überständen erfolgte eine Inkubation mit LPS aus *Listeria monocytogenes* über variierte Zeitintervalle und in Konzentrationen bis 125 ng/ml LPS. Die Inkubation erfolgte in RPMI mit 0,5 % FCS-Zusatz. Eine längere serumfreie Inkubation wird von den Zellen nur schlecht toleriert und es kommt zur Apoptose. Durch die unterschiedliche Dauer der LPS-Inkubation war es möglich, sowohl eine frühe als auch eine späte Zytokinantwort der Monozyten zu erhalten. In einer frühen Reaktion setzen aktivierte Monozyten TNF frei, in einer späten Reaktion erfolgt die Freisetzung der Interleukine. Nach Beendigung der Inkubation wurden die Überstände abgenommen, darin befindliche Zellen mittels Zentrifugation entfernt und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

## 3.2 Molekularbiologische und molekulargenetische Methoden

### 3.2.1 Transformation und Kultur von Bakterien

Plasmid-DNA wurde zur Amplifikation in das Bakterium *Escherichia coli* eingebracht. Die zur Transformation kompetenten Bakterien wurden stets auf Eis gehalten. Nach Zugabe von 5 - 10 ng Plasmid-DNA wurden die Bakterien für weitere 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden sie für exakt 2 min auf 42°C erhitzt und direkt im Eisbad abgekühlt. Die Bakterien wurden in 1 ml Luria-Bertani-Medium (LB-Medium) suspendiert und 60 min bei 37°C vorinkubiert. Das nach kurzer Zentrifugation (10000x *g*) erhaltene Pellet wurde auf Agarplatten (1 % Agar in LB-Medium) unter Zusatz des entsprechenden Antibiotikums der korrespondierenden Resistenz im Plasmid ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert. Die gewachsenen Kolonien wurden mit einer sterilen Öse in 500 ml mit LB-Medium mit entsprechendem Antibiotikumzusatz gebracht und bis zum Erreichen ihrer logarithmischen Wachstumsphase (16 - 20 h) bei 37°C auf dem Horizontalschüttler inkubiert.

<b>LB-Medium:</b>	5 g/l	NaCl
	5 g/l	<i>Yeast Extract</i>
	10 g/l	Bactotrypton
	10 mM	Tris/HCl, pH=8
	100 µg/ml	Tetracyclin

### 3.2.2 Präparation von Plasmid-DNA

Zur Präparation von Plasmid-DNA aus Bakterien wurde ein *Plasmid Maxi Kit* der Firma Qiagen (Deutschland) benutzt.

Nachdem die Bakterien die logarithmische Wachstumsphase erreicht hatten, wurden sie durch Zentrifugation (10 min, 3000x *g*, 4°C) pelletiert und in 10 ml Puffer P1 (inkl.

RNase A) resuspendiert. Nach Zugabe von 10 ml Puffer P2 erfolgte die Lyse der Bakterien. Nach 5 min Inkubation bei RT wurde gekühlter Puffer P3 zugegeben und das Bakterienlysat auf Eis gestellt. Nach 20 min wurde das Lysat zentrifugiert (20000x *g*, 30 min, 4°C) und der Überstand abgenommen und erneut zentrifugiert (20000x *g*, 15 min, 4°C). Der so erhaltene Überstand wurde auf eine voräquilibrierte Qiagen-Säule (Äquilibrierung mit 10 ml Puffer QBT) gegeben. Nach zwei Waschschritten mit Puffer QC wurde die in der Säule befindliche Plasmid-DNA mit 15 ml Puffer QF eluiert. Die DNA wurde mit 0,7 Volumen Isopropanol (RT) gefällt und anschließend zentrifugiert (15000x *g*, 30 min, 4°C). Das Präzipitat wurde zweimal mit 70 %-igem Ethanol gewaschen und an der Luft getrocknet. Das so erhaltene Plasmid wurde in Tris-EDTA-Puffer (TE) gelöst und die Konzentration photometrisch bei  $OD_{\lambda=260/280 \text{ nm}}$  bestimmt. Die Lösung wurde anschließend auf eine Konzentration von 1  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  eingestellt und bei -70°C gelagert.

**TE (6.6.0,2)-Puffer:**

6 mM	Tris, pH=7,4
6 mM	Natriumchlorid
0,2 mM	EDTA

### 3.2.3 Analyse von Plasmid-DNA durch Restriktionsenzyme

Zum Verdau durch Restriktionsenzyme von Plasmid-DNA wurde das Ein-Puffer-System der Firma Boehringer-Mannheim verwendet.

Aus der Plasmid-DNA wurden mit den geeigneten Restriktionsenzymen die entsprechenden DNA-Fragmente bei 37°C (1 - 3 h) herausgeschnitten.

### 3.2.4 Analyse von Plasmid-DNA durch Agarosegel-Elektrophorese

Diese Methode erfolgte zu analytischen und präparativen Zwecken. Die Agarosekonzentration wurde entsprechend der Größe der aufzutrennenden

Fragmente gewählt. Als Molekulargewichtsmarker diente DNA des Lambda-Phagen, geschnitten mit *EcoRI* und *HindIII*.

Nach Inkubation mit den Restriktionsenzymen wurden die DNA-Fragmente über eine Agarosegel-Elektrophorese analysiert. Dazu wurden die Proben mit DNA-Probenpuffer vermischt und auf ein Agarosegel aufgetragen. Bei einer konstanten Spannung von 130 V wurden die DNA-Fragmente nach ihrer Größe aufgetrennt. Durch die Einlagerung von Ethidiumbromid sind die Banden bei Betrachtung unter UV-Licht sichtbar. Zu Präparationszwecken sollte die DNA ausschließlich bei langwelligem UV-Licht betrachtet werden, um eine Thymidin-Dimerisierung der DNA durch energiereiche UV-Strahlen zu vermeiden.

<b>TBE [1x]:</b>	0,045 mM	Tris-Base
	0,045 mM	Borsäure (H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> )
	10 mM	EDTA, pH=8,0
	0,1 ng/ml	Ethidiumbromid
<b>DNA-Probenpuffer [6x]:</b>	15 %	Ficoll
	0,25 %	Xylenecyanol FF
	0,25 %	Bromphenolblau
<b>Agarosegel:</b>	1 %	Agarose in TBE [1x]

### 3.2.5 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Die Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen erfolgte mit Hilfe des QIAex *DNA Gel Extraction Kits* der Firma Qiagen. Dabei wird die DNA an eine Silicagel-Matrix kleiner Partikel gebunden und kann anschließend davon wieder eluiert werden.

Nach beendeter Elektrophorese wurde das dem *Insert* entsprechende Fragment unter UV-Kontrolle ( $\lambda=356$  nm) aus dem Gel geschnitten. Das Agarosegelstück wurde 5 min in Tris-HCl-Puffer äquillibriert und anschließend mit Puffer QX1 (300  $\mu$ l pro 100 mg Gel) versetzt. Pro 5  $\mu$ g DNA wurden darufhin 10  $\mu$ l QIAex-Partikel zugefügt und durch häufiges Schütteln bei 50°C für 10 min in Suspension gehalten.

Die Partikel, an denen sich jetzt die DNA befindet, wurden mittels Tischzentrifuge kurz pelletiert und zweimal mit Puffer QX2 und zweimal mit Puffer QX3 gewaschen. Nach Lufttrocknung des Pellets wurde die DNA mit TE-Puffer eluiert und die Konzentration photometrisch bei  $OD_{\lambda=260/280 \text{ nm}}$  bestimmt. Die so erhaltene cDNA wurde zur Synthese einer Probe für die Hybridisierung von *Northern Blots* (siehe Kapitel 3.2.8, Seite 58) eingesetzt.

### 3.2.6 RNA-Präparation aus eukaryotischen Zellen

Da bei der Präparation von RNA die Gefahr einer Degradation durch RNasen besteht, wurden alle Arbeitsschritte mit autoklavierten Materialien und Lösungen durchgeführt. Das verwendete Wasser war mit Diethylpyrocarbonat (DEPC) [0,07 % (v/v)] versetzt. Während der Präparation wurden Einmal-Latex-Handschuhe getragen. Die meisten Schritte erfolgten auf Eis, um eine eventuelle RNase-Aktivität gering zu halten.

#### 3.2.6.1 RNA-Isolierung aus adhärenenten Zellen einer permanenten Zelllinie

Die Isolierung von RNA aus adhärenenten Zellen einer Zelllinie (hier HepG2 und HuH7) erfolgte nach der von Chomczynski und Sacchi etablierten Methode (Chomczynski und Sacchi 1987).

Die Zellen wurden in 35 mm Zellkulturschalen kultiviert. Das Medium wurde durch Absaugen entfernt, danach die Zellen zweimal mit PBS (4°C) gewaschen. Die Lyse erfolgte durch Zugabe von 1 ml *RNAzol*. Die Kulturschalen wurden dann 5 min auf dem Horizontalschüttler bei RT inkubiert, um eine vollständige Lyse aller Zellen zu erreichen. Durch mehrmaliges Scheren des zähflüssigem Lysates durch eine englumige Kanüle (26 G) wurden die vorhandenen DNA-Fragmente verkleinert. Dass dadurch erhaltene dünnflüssigere Lysat wurde in ein 2 ml Mikroreaktionsgefäß überführt, mit 1/10 Volumen Chloroform versetzt und auf dem Vortex für 15

Sekunden (sec) gemischt. In der anschließenden 15-minütigen Inkubation auf Eis erreicht man eine Phasentrennung in die lipophile untere Phase mit den DNA-Fragmenten und den Zellproteinen und einen hydrophilen Überstand in dem sich die Gesamt-RNA befindet. Dazwischen befindet sich eine Interphase aus Proteinverunreinigungen. Nach Zentrifugation (15 min, 15000x *g*, 4°C) wurde die obere wässrige Phase vorsichtig abpipettiert und die RNA mit einem Volumen Isopropanol gefällt (15 min, 4°C). Nach einem weiterem Zentrifugationsschritt (5 min, 15000x *g*, 4°C) wurde das erhaltene RNA-Pellet zweimal mit 70 %-igem Ethanol (-20°C) gewaschen und anschließend kurz bei 37°C im Heizblock getrocknet. Das Pellet wurde danach in 400  $\mu$ l 0,4 % SDS/DEPC-H<sub>2</sub>O durch Erhitzen auf 56°C gelöst und nicht lösliche Bestandteile abzentrifugiert (5 min, 15000x *g*). Zur Entfernung der restlichen Verunreinigungen wurde der Überstand mit 1/10 Volumen 3 molarer Natriumacetat-Lösung (pH=5,0) sowie 2 Volumen Ethanol [96 %] versetzt und erneut für mindestens 30 min bei -20°C gefällt. Die nun unlösliche RNA wurde durch Zentrifugation pelletiert (15 min, 15000x *g*, 4°C) und zweimal mit Ethanol [70 %] gewaschen (jeweils 5 min, 15000x *g*). Nach Trocknung des Pellets (37°C) konnte die RNA in DEPC-H<sub>2</sub>O gelöst werden. Die Konzentration und Reinheit wurde photometrisch bestimmt ( $\lambda=260/280$  nm).

<b>RNAzol:</b>	0,42 M	Guanidiumthiocyanat
	0,5 %	Natrium-N-Laurylsacrosine [w/v]
	0,4 M	Natriumacetat, pH=4,0
	0,33 %	Antifoam A
	0,7 %	2-Mercaptoethanol [v/v]
	ad 100 ml	DEPC-□□□

### 3.2.6.2 RNA-Isolierung aus Zellen in Suspensionskultur

Die Präparation von RNA aus in Suspensionskultur wachsenden Zellen erfolgte analog der Präparation der RNA aus adhären Zellen. Im Unterschied hierzu wurden die Zellen jedoch direkt nach Beendigung der Inkubation durch Zentrifugation pelletiert, das Medium entfernt und die Zellen zweimal mit PBS (4°C) gewaschen.

Anschließend konnten die Zellen wie oben beschrieben lysiert und die RNA präpariert werden.

### 3.2.7 RNA-Agarosegel-Elektrophorese

5  $\mu\text{g}$  der präparierten RNA (siehe Seite 55, Kap. 3.2.6) wurden in 10  $\mu\text{l}$  DEPC- $\text{H}_2\text{O}$  aufgenommen, mit 32  $\mu\text{l}$  RNA-Probenpuffer versetzt, für 5 min bei 65°C denaturiert, sofort auf Eis abgekühlt, kurz zentrifugiert und direkt in die Taschen eines denaturierenden Agarose-Gels pipettiert. Die Auftrennung der Proben erfolgte bei einer konstanten Spannung von 170 V, bis eine deutliche Trennung der ribosomalen 18 S- und 28 S-RNA-Banden erreicht werden konnte (ca. zwei Drittel der Gesamtlaufstrecke des Bromphenolblaus). Während der Elektrophorese wurde der sich verbrauchende Elektrophoresepuffer mittels einer Schlauchpumpe kontinuierlich umgewälzt und bei Wärmeentwicklung gekühlt. Eine Anfärbung der ribosomalen RNA-Banden gelang durch das sich im Gel befindliche Ethidiumbromid (UV-Licht,  $\lambda=254$  nm). Dadurch war auch vorab eine Kontrolle der gleichmäßigen Beladung möglich.

<b>Agarosegel:</b>	1 %	Agarose
	1 x	MOPS
	1,8 %	Formaldehyd [37 %]
	0,1 ng/ml	Ethidiumbromid
<b>RNA-Probenpuffer:</b>	12 %	MOPS
	12 %	RNA dye
	20 %	Formaldehyd [37 %]
	56 %	Formamid
<b>RNA dye:</b>	47 %	Formamid
	11 %	MOPS
	18 %	Formaldehyd [37 %]
	5,5 %	Glycerol [86 %]
	5,5 %	Bromphenolblau (gesättigt)
	in	DEPC- $\text{H}_2\text{O}$

<b>10x MOPS-Puffer:</b>	200 mM	MOPS
	50 mM	Natriumacetat
	10 mM	EDTA; pH=7,5, autoklaviert
<b>Elektrophoresepuffer:</b>	1 x	MOPS-Puffer

### 3.2.8 Northern Blot

#### 3.2.8.1 Transfer von RNA auf eine Nitrozellulose-Membran

In einem wannenartigem Gefäß wurde 20x SSC-Laufpuffer vorgelegt, darüber befand sich eine Glasplatte als Brücke, über die ein breiter Streifen Whatman®-Filterpapier gelegt wurde, so dass dessen Enden in den SSC-Puffer ragten. Auf einem weiteren Stück Filterpapier wurde das - nach der Elektrophorese zur Entfernung der Formaldehyd-Reste für 30 min in DEPC-H<sub>2</sub>O gespülte - Gel luftblasenfrei gelegt. Darauf wurde die positiv geladene Nitrozellulose (10 min in 20x SSC getränkt) und eine weitere Lage Whatman-Filterpapier geschichtet. Darüber wurden Zellulose-Tücher aufgebracht und mit ca. 1 kg Gewicht beschwert. Um ein Verdunsten des Laufpuffers und Bypässe zu verhindern, wurde der Aufbau mit Polyethylen-Folie abgedichtet. Die Übertragung der RNA auf die Nitrozellulose erfolgte durch Kapillarkräfte.

Nach ca. 20 h wurde der *Northern Blot* abgebaut und der vollständige Transfer unter UV-Licht kontrolliert. Die 18 S- und 28 S-Banden konnten zur späteren Orientierung markiert werden. Die Membran wurde nach 5-minütigem Spülen in 2x SSC bei 80°C zwischen Filterpapieren inkubiert, um die RNA irreversibel an die Oberfläche der Nitrozellulose zu binden.

<b>20x SSC:</b>	3 M	Natriumchlorid
	0,3 M	Natriumcitrat
	mit	HCl auf pH=7,0 eingestellt

### 3.2.8.2 Synthese einer $\alpha$ -[ $^{32}\text{P}$ ]-markierten cDNA-Sonde

Die Markierung der DNA-Sonden wurde nach Feinberg und Vogelstein mit dem *Random Primed DNA Labeling Kit* der Firma Boehringer (Mannheim) durchgeführt (Feinberg und Vogelstein 1983). Das Prinzip der DNA-Markierung beruht auf der Hybridisierung einer Mischung unterschiedlicher Hexanukleotide mit randomisierter Basensequenz an die zu markierende cDNA. Diese Hexanukleotide werden vom Klenow-Enzym, einer DNA-abhängigen DNA-Polymerase, als *Primer* zur Synthese eines komplementären Stranges verwendet. Dabei wird ein radioaktiv markiertes Desoxynukleotid-triphosphat,  $\alpha$ -[ $^{32}\text{P}$ ]-dATP, zugesetzt, so dass dieses in den neu synthetisierten Strang eingebaut wird (T=37°C).

Zunächst wurde das DNA-Fragment aus Plasmid-DNA (20 ng) denaturiert (10 min bei 95°C, dann 5 min auf Eis). Nach Zugabe der unmodifizierten Desoxynukleotidtriphosphate (dGTP, dCTP, dTTP), des Reaktionspuffers [10x],  $\alpha$ -[ $^{32}\text{P}$ ]-dATP und des Klenow-Enzyms [2 U pro Ansatz] erfolgte die Synthese der radioaktiv markierten DNA-Sonde über 30 min bei 37°C.

Die nicht eingebauten Nukleotide wurden danach mit dem *QIAquick Nucleotide Removal Kit* der Firma Qiagen entfernt. Dazu wurde die Reaktion mittels Puffer PN [10 Vol.] gestoppt und auf eine Säule mit einem adhäsiven Filter pipettiert. Der Puffer wurde abzentrifugiert (6000x *g*, 1 min) und die auf dem Filter befindliche DNA zweimal mit einem Waschpuffer PE gereinigt. Anschließend konnte die DNA mit 50  $\mu\text{l}$  Wasser eluiert werden (15000x *g*, 1 min).

Die so erhaltenen [ $^{32}\text{P}$ ]-markierten DNA-Sonden wurden zur Hybridisierung von *Northern Blots* eingesetzt.

### 3.2.8.3 Hybridisierung mit der radioaktiven Sonde

Um die unspezifischen Nukleinsäurebindungsstellen auf der Nitrocellulose-Membran abzusättigen, wurde diese mit einer Prähybridisierungslösung (enthält einzelsträngige DNA aus Lachsspermien) in einer Glasröhre bei ständiger Rotation für 2 h bei 42°C vorinkubiert.

Die radioaktiv markierten Sonden wurden 10 min bei 95°C denaturiert, auf Eis abgekühlt, zur Hybridisierungslösung (ca. 15 ml) gegeben und für ca. 18 h bei 42°C mit der Membran inkubiert.

Nach Beendigung der Inkubation wurde die Nitrozellulose bei RT zweimal für 30 min in 2x SSC/0,2 % SDS und einmal bei 65°C mit 0,2x SSC/0,2 % SDS gewaschen, zwischen Filterpapier getrocknet und in Folie verpackt. Die Exposition erfolgte bei -80°C auf einem Röntgenfilm oder bei RT auf einem Kodak *PhosphoScreen*.

Die Dauer der Exposition richtete sich nach der Aktivität der radioaktiven Sonde, der Hybridisierungseffizienz und der Menge der mRNA. Sie reichte von wenigen Stunden bis zu mehreren Tagen.

<b>Prähybridisierungslösung:</b>	0,1 M	NaPO <sub>4</sub> , pH=6,5
	10 x	SSC
	0,4 mg/ml	ssDNA ( <i>Salmon Sperm</i> , denaturiert)
	2 x	Denhardts Reagenz
	2 %	Glycin
	50 %	Formamid

<b>Hybridisierungslösung:</b>	0,04 M	NaPO <sub>4</sub> , pH=6,5
	10 x	SSC
	0,4 mg/ml	[ <sup>32</sup> P]-markierten ssDNA (s.o.)
	0,04 %	BSA
	0,04 %	Polyvinylpyrrolidon (PVP)
	0,04 %	Ficoll
	20 %	Dextransulfat
	50 %	Formamid

### 3.2.9 Probengewinnung zur Proteinanalyse mittels *Immuno Blot* und ELISA

β<sub>2</sub>M wurde im Zellkulturüberstand durch *Immuno Blots* und ELISA qualitativ und quantitativ untersucht. Nach Beendigung der Inkubation wurde das Medium abgenommen und der darin befindliche Zelldebris durch Zentrifugation entfernt (15000x g, 5 min). Die Proben wurden anschließend bis zur endgültigen Messung bei -20°C gelagert. Die Zellzahl pro *Well* wurde für spätere Berechnungen bestimmt.

### 3.2.10 Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (SDS-PAGE)

Die 0,1% SDS-haltigen Polyacrylamidgele wurden verwendet, um Proteine nach ihrer Größe aufzutrennen. Die Eigenladung der Proteine wird durch das in den Lösungen befindliche Detergenz Natriumdodecylsulfat (SDS) überkompensiert (Bonner und Laskey 1974; Laemmli 1970a, 1970b). Nach ihrer Auftrennung können die Proteine über Antikörperreaktionen detektiert werden.

Die Proben aus den Zellkulturüberständen wurden vor der Auftragung auf das Gel in vierfach konzentriertem Laemmli-Puffer verdünnt, für 5 min auf 95°C erhitzt und kurz zentrifugiert. Die Tertiärstruktur wird einerseits durch das Detergenz, andererseits durch Reduktion der Disulfidbrücken mit 2-Mercaptoethanol aufgehoben.

Die Elektrophorese erfolgte bei RT mit einer konstanten Stromstärke von max. 100 mA. Zur Analyse von  $\beta_2$ M wurden 17 %-ige Polyacrylamid-Gele, für  $\alpha_1$ -Antichymotrypsin 10 %-ige Gele verwendet.

<b>Laemmli-Puffer:</b>	130 mM	Tris-HCl, pH=6,8
	10 %	Glycerin [v/v]
	5 %	2-Mercaptoethanol [v/v]
	2 %	SDS
	0,01 %	Bromphenolblau
<b>Sammelgel:</b>	5 %	Acrylamid
	0,13 %	N, N'-Methylenbisacrylamid
	130 mM	Tris-HCl, pH=6,8
	0,2 %	SDS
	0,05 %	TEMED
	0,05 %	Ammoniumperoxodisulfat (APS)
<b>Trenngel:</b>	x %	Acrylamid
	0,27 %	N, N'-Methylenbisacrylamid
	375 mM	Tris-HCl, pH=8,6
	0,1 %	SDS
	0,05 %	TEMED
	0,015 %	APS
<b>Elektrophoresepuffer:</b>	25 mM	Tris
	192 mM	Glycin
	0,1 %	SDS

### 3.2.11 Transfer der Proteinen auf eine Nitrozellulose-Membran - *Immuno Blot*

Nach beendeter SDS-PAGE konnten die Proteine durch quantitativen Transfer aus dem SDS-Gel auf eine Membran mit Enzym-gekoppelten Antikörpern schnell und spezifisch nachgewiesen werden.

Dazu wurde das Gel für ca. 15 min in Kathodenpuffer äquilibriert. Ein auf die Größe des Gels zugeschnittenes Stück Polyvinylidendifluorid-(PVDF)-Membran wurde zuerst 5 sec in Methanol aktiviert, anschließend 5 min in Wasser gelegt und danach für 15 - 20 min in Anodenpuffer II äquilibriert. Auf die gleiche Größe gebrachte Whatman®-Filterpapiere wurden mit Kathodenpuffer, Anodenpuffer I und Anodenpuffer II getränkt. Darauf folgte der Aufbau des *Immuno Blots* zwischen zwei Graphitelektroden. Auf die Anodenplatte wurden 5 in Anodenpuffer I getränkte Whatman®-Papiere gelegt, darüber folgten 3 Whatman®-Filter mit Anodenpuffer II. Anschließend wurde die PVDF-Membran luftblasenfrei aufgebracht. Auf die Membran folgte - unter Ausschluss der Bildung von Luftblasen - das äquilibrierte SDS-Gel, darüber wurden sechs weitere mit Kathodenpuffer getränkte Whatman®-Filterpapiere geschichtet. Auf diesen Stapel wurde die Kathode gelegt und mit einem Gewicht beschwert (ca. 500 g). Die Übertragung der Proteine aus dem Gel auf die Membran erfolgte bei einer konstanten Stromstärke von 0,8 mA pro cm<sup>2</sup> Gelfläche über 1 h. Nach Beendigung des *Blots* wurde die Membran in Blockpuffer (entspr. Waschpuffer mit 5 % bovinem Serumalbumin (BSA)) gegeben. Zur Kontrolle der Vollständigkeit des Transfers können die restlichen Proteine optional im Gel mit Silbernitrat angefärbt werden. Durch 60 min Inkubation im Blockpuffer konnten alle unspezifischen Proteinbindungsstellen der Membranoberfläche abgesättigt werden. Die Membran wurde zur Entfernung des überschüssigen BSA mit Waschpuffer gewaschen (1x 15 min, 1x 10 min, 2x 5 min auf dem Horizontalschüttler). Darauf folgte die Inkubation mit dem Primäantikörper über 2 h [1:2000 in Waschpuffer inkl. 0,3 % BSA verdünnt]. Nach weiteren Waschschritten (s. o.) schloss sich die Inkubation mit dem sekundären - mit Meerrettich-Peroxidase-(HRP)-konjugierten - Antikörper gegen die F<sub>c</sub>-Domäne des Primäantikörpers an [1:7500 in Waschpuffer verdünnt, Inkubationsdauer 1 h]. Danach wurde die Membran erneut gespült, um die nicht gebundenen Antikörper zu entfernen. Die Entwicklung erfolgte durch Chemiluminiszenz

mit dem ECL-Kit der Firma Amersham-Buchler (Deutschland). Mit Hilfe der konjugierten Peroxidase werden in Gegenwart von Wasserstoffperoxid Diazylhydrazide wie Luminol oxidiert. Ein dabei entstehendes aktiviertes Intermediat kehrt durch die Freisetzung von Licht in den energetischen Grundzustand zurück. Beide Entwickler-Lösungen wurden im Verhältnis 1:1 gemischt und für 1 min mit der Membran inkubiert. Die Detektion erfolgte durch Exposition von 5 sec bis mehreren Minuten auf einem Röntgenfilm bei RT.

<b>Anodenpuffer I:</b>	0,3 M	Tris-Base
	20 %	Methanol [v/v]
<b>Anodenpuffer II:</b>	0,025 M	Tris-Base
	20 %	Methanol [v/v]
<b>Kathodenpuffer:</b>	0,04 M	$\epsilon$ -Aminocaprinsäure
	20 %	Methanol [v/v]
	0,01 %	SDS
<b>Waschpuffer:</b>	PBS, pH=7,4 + Tween 20 [0,2 % (v/v)]	

### 3.2.12 ELISA

Zur quantitativen Bestimmung des  $\beta_2$ M in Zellkulturüberständen wurde der kommerziell erhältliche, in der klinisch-chemischen Diagnostik verwendete ELISA der Firma IBL, Hamburg verwendet. Hierbei erfolgt die Bindung des  $\beta_2$ M an einen immobilisierten Antikörper. In einem zweiten Schritt kann über einen weiteren Enzym-konjugierten Antikörper mit Hilfe einer enzymatischen Farbreaktion die Konzentration im Vergleich zu standardisierten Kontrollen gemessen werden. Der Assay wurde nach den Angaben des Herstellers durchgeführt. Wegen der geringeren Konzentration des  $\beta_2$ M in den Überständen im Vergleich zu den  $\beta_2$ M-Spiegeln *in vivo* wurden die Proben nur 1:5 vorverdünnt (Empfehlung der Firma IBL: 1:50). Die Ausführung erfolgte in einer Mikrotiterplatte (MTP) jeweils in Doppelbestimmungen.

Pro Vertiefung der MTP wurde 200  $\mu\text{l}$  Natriumchlorid [0,9 %] vorgelegt und dazu jeweils 10  $\mu\text{l}$  der vorverdünnten Proben pipettiert. Nach 15 min Inkubation unter stetem Schütteln (150 *rpm* bei RT) wurde das zu messende Protein an den immobilisierten Antikörper gebunden und der Inhalt der Platte konnte verworfen werden. Nach drei Waschschritten mit je 250  $\mu\text{l}$  Waschpuffer erfolgte die Zugabe des zweiten Peroxidase-konjugierten Antikörpers [1:1000 verdünnt]. Nach weiteren 15 min Inkubation wurde der nicht hybridisierte Antikörper durch drei Waschschrritte (s. o.) entfernt. Anschließend wurden 200  $\mu\text{l}$  einer frischen Substratlösung zugeben. Nach 5 - 15 min Entwicklungszeit bei RT wurde bei ausreichend großer Farbintensität und -differenz die Reaktion durch Zugabe einer Stopplösung beendet und die optische Dichte im ELISA-Reader bei  $\lambda=492$  nm bestimmt. Aus den Doppelbestimmungen wurden der Mittelwert und die Standardabweichung berechnet. Die Konzentration wurde im Vergleich zu den Standardverdünnungen bestimmt. Die endgültige Konzentration wurde zum Zwecke der Vergleichbarkeit auf  $1 \times 10^6$  Zellen bezogen.

### 3.2.13 Immunpräzipitation

Die Synthese zellulärer Proteine wurde mit Hilfe einer Markierung mit [ $^{35}\text{S}$ ]-haltigen Cystein und Methionin untersucht. Hierbei kommt es zu einem Einbau der mit radioaktiven Schwefel-Isotopen markierten Aminosäuren in alle zum Zeitpunkt der Inkubation neusynthetisierten Zellproteine. Die Zellen werden anschließend lysiert. Die Proteine können durch spezifische Antikörper aus den Lysaten oder dem Kulturüberständen präzipitiert werden. Nach Auftrennung über ein SDS-Polyacrylamidgel (SDS-PAGE) erfolgt die Detektion über Autoradiographie.

### 3.2.13.1 Metabolische Markierung von adhärennten Zellen

Subkonfluente Zellen (in Kulturschalen, Durchmesser 35 mm) wurden einmal mit warmem PBS gewaschen und dann für 15 min mit Mangelmedium (MEM (*Minimal Essential Medium*) inkl. 0,2 % BSA) inkubiert, um alle nicht markierten schwefelhaltigen Aminosäuren zu entfernen. Danach wurde das Medium abgenommen und 1 ml frisches Mangelmedium mit 125  $\mu\text{Ci}$  tran- $^{35}\text{S}$ -label für 1 - 3 h bei 37°C markiert. Anschließend wurde das radioaktive Medium entfernt und frisches Kulturmedium inkl. 0,2 % BSA auf die Zellen gegeben und weiter kultiviert. Um die Kinetik der synthetisierten Proteine zu untersuchen, wurden die Zellüberstände nach definierten Zeiten abgenommen (siehe Versuchsbeschreibungen), tote Zellfragmente bei 15000x *g* abzentrifugiert und bei 4°C gelagert. Die Kulturschalen wurden bis zur weiteren Verwendung bei -20°C (siehe Kapitel 3.1.13.4, Seite 66) gelagert.

### 3.2.13.2 Metabolische Markierung von Suspensionskulturen

Bei der Markierung der  $^{35}\text{S}$ -Suspensionskulturen erfolgte jeweils zu den Waschsritten eine Pelletierung der Zellen durch Zentrifugation (15000x *g*, 1 min). Alle weiteren Schritte erfolgten wie oben (3.2.13.1) beschrieben.

### 3.2.13.3 Trichloressigsäure-Fällung

Der Anteil der eingebauten radioaktiven Aminosäuren ließ sich mit Hilfe einer Trichloressigsäure (TCA)-Fällung der Zelllysate und -überstände ermitteln (Mans und Novelli 1960; Rabson 1961). So konnte ausgeschlossen werden, dass es nach Zugabe der stimulierenden Reagenzien zu einer unspezifischen Proteinbiosyntheserhöhung kam.

10  $\mu\text{l}$  Aliquots der Lysate wurden auf Whatman®-Filterpapier GF/C (3MM) gegeben und an der Luft getrocknet. Es erfolgte eine 5-minütige Fällung der aller Proteine mit

10 %-iger TCA statt. Die Filter wurden anschließend für 2 - 3 min in 5 %-iger TCA gekocht und zwei weitere Male mit 5 %-iger TCA gewaschen. Durch zweimaliges Waschen mit Ethanol [96 %] wurden die tRNA-Fragmente mit den markierten Aminosäuren entfernt. Zu den Filtern wurde nach Trocknung (1 h bei 60°C) 2 ml Szintillationsflüssigkeit gegeben und die Radioaktivität der Proben in einem Szintillationsmessgerät gemessen.

#### 3.2.13.4 Präzipitation mit Antikörpern

Die Zellen in den Kulturschalen wurden mit 1 ml Lyse-Puffer bei 4°C über 30 min lysiert. Anschließend wurden die Kerntrümmer sedimentiert (11000x *g* über 3 min) und der Überstand abpipettiert.

Zur Immunpräzipitation wurde je 1 ml radioaktives Zelllysate bzw. Zellüberstand auf 1 % Triton X-100 eingestellt. Um unspezifische Antikörperreaktionen auszuschließen, folgte eine Behandlung der Ansätze mit vorbehandelten Pansorbin (Protein-A aus *Staphylococcus aureus*; 50 µl Pansorbin, 2x mit RIPA-Puffer gewaschen; 1 h bei 4°C über Kopf geschüttelt), danach wurde das Pansorbin 10 min bei 11000x *g* pelletiert. Der Überstand wurde mit SDS-Lösung auf eine Konzentration von 0,1 % gebracht und nach Zugabe des Antikörpers (2 µl pro Ansatz) für 2 h bei 4°C im Überkopfschüttler inkubiert. Zur Präzipitation der Antigen-Antikörper-Komplexe diente Protein A-Sepharose (5 mg Protein A-Sepharose in 100 µl H<sub>2</sub>O vorgequollen) (Kessler 1975). Die Ansätze wurden für 1 h bei 4°C über Kopf geschüttelt und dann zentrifugiert (11000x *g*, 30 sec). Das Pellet wurde viermal mit RIPA-Puffer gewaschen, der Puffer entfernt und der Antigen-Antikörper-Protein A-Sepharose-Komplex kurz bei RT getrocknet. Zur Trennung des Komplexes wurden 50 µl Laemmli-Puffer zugegeben, 5 min auf 95°C erhitzt und dann 5 min bei 11000x *g* zentrifugiert. Der Überstand wurde auf ein SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt.

<b>RIPA-Puffer:</b>	1 %	Triton X-100
	0,5 %	Natriumdesoxycholat
	0,1 %	SDS
	150 mM	Natriumchlorid
	10 mM	Tris-HCl, pH=7,4

<b>Lyse-Puffer:</b>	50 $\mu$ g	Aprotinin
	50 $\mu$ g	Pepstatin
	50 $\mu$ g	Leupeptin
	10 nM	PMSF
	1 %	Triton X-100
	0,4 %	Natriumdesoxycholat
	66 mM	EDTA
	10 mM	Tris-HCl, pH=7,4

### 3.2.13.5 Fluorographie

Um die Nachweisempfindlichkeit für [<sup>35</sup>S]-markierte Proteine zu erhöhen, wurden die Gele nach Beendigung der Elektrophorese 30 min in Fixierlösung inkubiert, anschließend 30 min mit Wasser gespült und danach weitere 30 min in 1-molarer Natriumsalicylatlösung äquilibriert (Chamberlain 1979). Die Gele wurden dann 3 h bei 50°C unter Vakuum getrocknet. Die Autoradiographie erfolgte bei -70°C auf Röntgenfilmen.

<b>Fixierlösung:</b>	40 %	Methanol [v/v]
	10 %	Essigsäure [v/v]

## **4 Ergebnisse**

### **4.1 Vorbemerkung**

Die gezeigten Abbildungen stellen repräsentative Ergebnisse der jeweiligen Versuche dar. Jeder Versuch wurde mindestens dreimal wiederholt. Quantitative Analysen wurden in Doppelbestimmungen durchgeführt und die Standardabweichung berechnet.

## 4.2 Einfluss von Zytokinen auf die $\beta_2$ -Mikroglobulin-mRNA

Zur Untersuchung des Einflusses von Zytokinen auf die mRNA-Konzentration von  $\beta_2$ M wurden *Northern Blot*-Analysen durchgeführt. Durch die Hybridisierung der elektrophoretisch aufgetrennten und auf einer Nitrozellulosemembran immobilisierten Gesamt-mRNA aus Zellen mit einer markierten cDNA-Sonde gelingt ein qualitativer Nachweis der mRNA-Spiegel nach Stimulation durch zugeführte Zytokine im Vergleich zu unstimulierten Kontrollen.

### 4.2.1 Einfluss von Zytokinen auf die $\beta_2$ M-mRNA-Konzentration in HepG2-Zellen

#### 4.2.1.1 *Northern Blot*-Analysen mit einer [ $^{32}$ P]- $\beta_2$ M-cDNA

HepG2-Zellen sind eine permanent und adhärent wachsende, humane Zelllinie hepatozellulären Ursprungs. Die Zellen konnten aus dem hepatozellulären Karzinom eines Patienten isoliert und als Zelllinie etabliert werden (Aden 1979; Knowles 1980). Die Zellen sind sehr stoffwechselaktiv und reagieren auf Stimulation durch Zytokine - vergleichbar wie primäre Hepatozyten - mit der Produktion von Akute-Phase-Proteinen. HepG2-Zellen können als Modellzellen für humane Hepatozyten angesehen werden.

Sie wurden eingesetzt, um den Einfluss der Zytokine auf die Transkription der  $\beta_2$ M-mRNA in Hepatozyten als Hauptproduzenten der Akute-Phase-Antwort zu studieren. Um den stimulatorischen Effekt der zahlreichen Serumzytokine zu begrenzen, wurden die Zellen unter serumfreien Bedingungen (Kulturmedium inkl. 0,2 % BSA) mit den entsprechenden Zytokinen inkubiert.

In der Größe und der Intensität des Hybridisierungssignals für  $\beta_2$ M-mRNA sind bei HepG2-Zellen - im Vergleich zu den unstimulierten Kontrollen - keine Unterschiede nach Stimulation mit IL-1 $\beta$  und IL-6 feststellbar. Durch submaximale Stimulation mit IL-1 $\beta$  und IL-6 wurde eine Konkurrenz der Zytokine an ihrem Rezeptor - und damit ein hemmender Einfluss der erhöhten Zytokine - ausgeschlossen. Die Dosis-variierte Zugabe von IL-1 $\beta$  und IL-6 ergab keine Wirkung auf die  $\beta_2$ M-Transkription. Ein positiver Effekt der Zytokine IL-1 $\beta$  und IL-6 scheint in HepG2 nicht zu bestehen (Fig. 4.2.1.a).

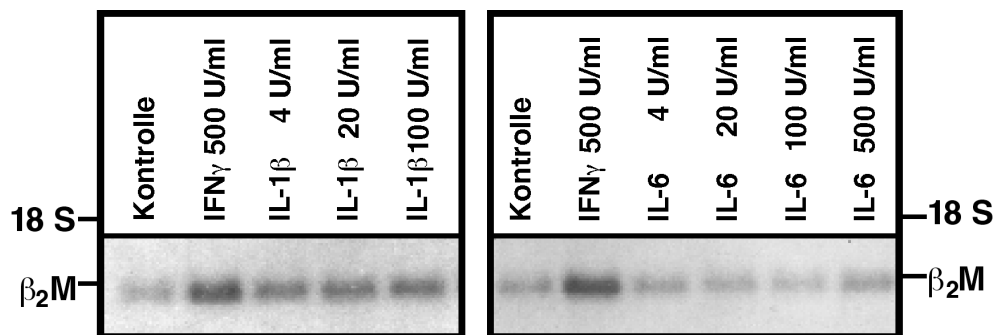


Fig. 4.2.1.a: **Einfluss von IFN $\gamma$ , IL-1 $\beta$  und IL-6 auf die  $\beta_2$ M-Expression in HepG2-Zellen**

Nach Trypsinisierung und Passage wurden die HepG2-Zellen ca. 24 h in DMEM/F-12 + 10 % FCS bis zur Subkonfluenz vorkultiviert. Anschließend wurden sie für 18 h in serumfreiem Medium (DMEM/F-12 + 0,2 % BSA) mit IL-1 $\beta$ , IFN $\gamma$ , IL-6 in den oben angegebenen Konzentrationen inkubiert. Nach Beendigung der Inkubationszeit wurden die Zellen in einer chaotropen Salzlösung (*RNAzol*) lysiert und die Gesamt-RNA präpariert. Die RNA wurde für *Northern-Blot*-Analysen elektrophoretisch aufgetrennt und auf eine Membran aus Nitrocellulose übertragen. Die Hybridisierung erfolgte mit einer [ $^{32}$ P]-markierten  $\beta_2$ M-cDNA.

Es erfolgte ebenso die Zugabe von 500 U/ml IFN $\gamma$ , einer Dosierung mit der eine Dimerisierung der STAT-Faktoren und transkriptionelle Aktivierung der Zellen erreicht werden kann (Yuan 1994). IFN $\gamma$  ist als Induktor des MH-Komplexes und von  $\beta_2$ M bekannt (Fellous 1979, 1982; Heron 1978; Hokland 1981; Wallach 1982). Ein Zusatz von IFN $\gamma$  führt auch in HepG2-Zellen zu einer Erhöhung der  $\beta_2$ M-mRNA-Konzentration.

Eine Hybridisierung der *Northern Blots* mit einer  $\alpha_1$ -Antichymotrypsin ( $\alpha_1$ ACT)-cDNA zeigte für die Inkubationen mit den IL-6 eine deutliche Erhöhung der  $\alpha_1$ ACT-Expression in den HepG2-Zellen und diente als Positivkontrolle zum Nachweis einer erfolgreichen Stimulation der Hepatomzellen (*Northern Blot* hierzu nicht gezeigt, siehe  $\alpha_1$ ACT-Immuno Blot Fig. 4.4.1.b, Seite 96).

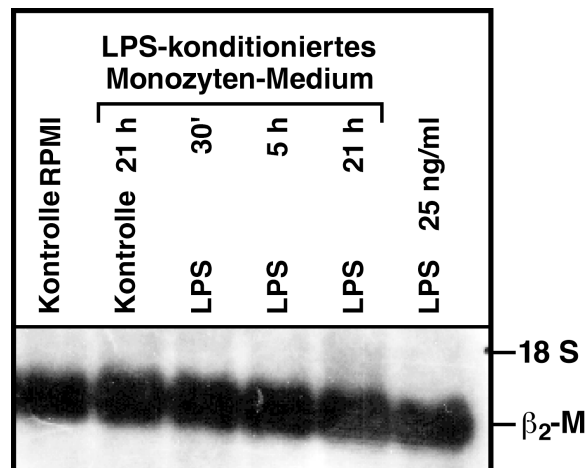


Fig. 4.2.1.b: **Einfluss verschiedener Zytokine und LPS-konditionierte Monozytenüberstände auf die  $\beta_2$ M-Expression in HepG2-Zellen**

Nach der Passage wurden die HepG2-Zellen ca. 24 h in DMEM/F-12 + 10 % FCS bis zur Subkonfluenz vorkultiviert. Anschließend wurden sie für 18 h in serumfreiem Medium (DMEM/F-12 + 0,2 % BSA) mit LPS-konditionierten Monozyten-Überständen (RPMI + 0,5 % FCS, siehe Kap. 3.1.8, Seite 49) inkubiert. Nach Beendigung der Inkubationzeit wurden die Zellen lysiert und die Gesamt-RNA präpariert. Die RNA wurde für *Northern Blot*-Analysen elektrophoretisch aufgetrennt und auf eine Membran aus Nitrocellulose übertragen. Die Hybridisierung erfolgte mit einer [<sup>32</sup>P]- $\beta_2$ M-cDNA.

In einem weiteren Experiment sollte geklärt werden, ob andere proinflammatorische Zytokine, welche beispielsweise durch Bioinkompatibilität während oder nach der Hämodialyse in Monozyten induziert werden, die Transkription der  $\beta_2$ M-mRNA steigern. Ebenso wäre eine Kombination und ein Synergismus mehrerer Entzündungsmediatoren - wie *in vivo* möglich - als potenter Stimulus für eine  $\beta_2$ M-Induktion denkbar. Dazu wurden HepG2-Zellen mit LPS-konditionierten Monozyten-

Überständen inkubiert. Durch Zugabe von Lipopolysacchariden aus der Zellwand von *Listeria monocytogenes* - die über den CD14-Rezeptor von Monozyten erkannt werden - wurden die aus dem *Buffy Coat* isolierten Monozyten aktiviert (siehe Kapitel 3.1.8, Seite 49). Durch zeitliche Variation der LPS-Inkubation war es möglich, sowohl verschiedene Zytokinprofile der Monozyten zu erhalten. In einer frühen Reaktion setzen aktivierte Monozyten TNF frei, zu späteren Zeitpunkten erfolgt die Freisetzung von Interleukinen. Die Zytokinantwort, der sich zu Makrophagen differenzierenden Monozyten kann im Überstand durch *Bio Assays* dokumentiert werden (siehe Kapitel 4.2.1.2).

Subkonfluente HepG2-Zellen wurde mit den dosis- und zeitabhängigen gewonnenen Überständen der LPS-Stimulation primärer Monozyten inkubiert. Die bis zu 18-stündige Inkubation der Hepatom-Zellen mit den LPS-konditionierten Monozytenmedien ergab jedoch keine Erhöhung der Konzentration der  $\beta_2$ M-mRNA im Vergleich zur Negativkontrolle (HepG2-Zellen mit unstimuliertem Monozyten-Kulturmedium inkubiert). Dieser Versuch zeigt, dass keines der von Monozyten ausgeschütteten Zytokine einen Einfluss auf die Regulation der  $\beta_2$ M-mRNA hat.

Die Zugabe von LPS zum HepG2-Kulturmedium zeigte ebenfalls keinen Einfluss auf die  $\beta_2$ M-mRNA (Fig. 4.2.1.b, Seite 71).

#### 4.2.1.2 B9-Proliferationstest zum Nachweis von IL-6 in Monozytenüberständen

Mit Hilfe von Zytokin-abhängigen *Bio Assays* konnte die erfolgte Stimulation der Monozyten verifiziert werden.

In Fig. 4.2.1.c ist zu erkennen, dass es in Abhängigkeit von der zunehmenden Konzentration des - den Überständen der isolierten Monozyten zugefügtem - LPS zu einem vermehrten Wachstum der B9-Zellen kommt (Linksverschiebung der Kurve im Vergleich zur IL-6-Standardwachstumskurve). Hierbei liegt eine weit höhere Proliferationsrate vor, als bei der Standarddosierung des IL-6 (wie es in den vorherigen Versuchen eingesetzt wurde). Dies bedeutet, dass es nach Inkubation der isolierten primären Monozyten zu einer entsprechenden Reaktion auf das LPS

kommt. Die gewonnenen Überstände enthalten eine ausreichende Zytokinkonzentration als Folge der Aktivierung der Monozyten. In den Überständen, denen kein LPS zugesetzt wurde, kommt es zu einem vergleichsweise geringen Wachstum.

Ähnliche Wachstumskurven lassen sich durch Inkubation der Überstände mit D10N-Zellen zur Dokumentation der IL-1 $\beta$ -Konzentration erreichen (Wachstumskurve hier nicht gezeigt).

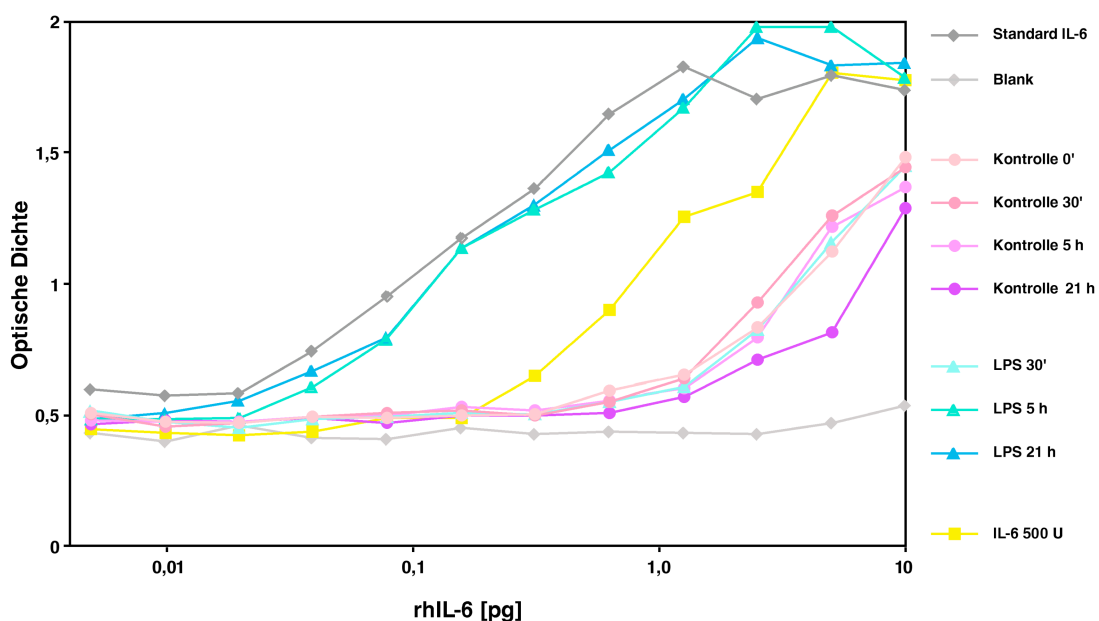


Fig. 4.2.1.c: **B9-Zellen-Proliferationstest mit LPS-konditionierten Überständen von primären Monozyten aus den *Buffy Coat***

Das B9-Kulturmedium wurde im Verhältnis von 1:1 mit den zu testenden Monozytenüberständen über die 12 Vertiefungen einer Mikrotiterplatte verdünnt. Nach 68 h erfolgte die Zugabe des MTT-Farbstoffs, nach weiteren 4 h Inkubation bei 37°C wurden die entstandenen Farbpigmente mit Isopropanol gelöst und es erfolgte die Ermittlung der Zellproliferation über die Messung der optischen Dichte.

Durch diese Experimente konnte gezeigt werden, dass die verwendeten konditionierten Monozytenüberstände eine ausreichende Zytokinantwort als Ausdruck der monozytären Aktivierung aufwiesen. Die Inkubation der HepG2-Zellen

erbrachte jedoch keinen Nachweis eines Einflusses der enthaltenen Zytokine auf die Synthese der  $\beta_2$ M-mRNA.

#### 4.2.2 Einfluss von Zytokinen auf die $\beta_2$ M-mRNA-Konzentration in HuH7-Zellen

Analog zu den *Northern Blot*-Experimenten zur Untersuchung des Einflusses von Zytokinen auf die  $\beta_2$ M-mRNA-Konzentration in HepG2-Zellen erfolgten die Untersuchungen von HuH7-Zellen, einer weiteren humanen Leberzelllinie. Die Zellen gelten als Hepatozyten-ähnlich und sollen als Ersatz für primäre Hepatozyten dienen. In einer Arbeit von Homma *et al.* wurde in Experimenten mit IL-6 eine erhöhte Konzentration von  $\beta_2$ M-Protein in Kulturüberständen von HuH7-Zellen gemessen (Homma 1992).

Nach Vorkultivierung der Zellen erfolgte die serumfreie Inkubation (18 h) mit IL-1 $\beta$ , IFN $\alpha$ , IFN $\gamma$  und IL-6 sowie mit LPS-konditionierten Überständen aktivierter Monozyten. Anschließend wurde die Gesamt-RNA isoliert und mittels *Northern Blot*-Analysen ausgewertet.

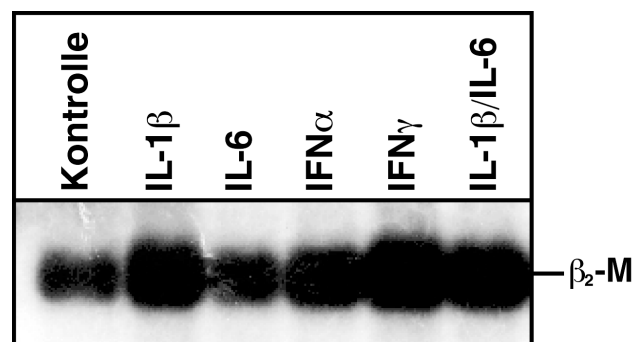


Fig. 4.2.2: Einfluss verschiedener Zytokine auf die  $\beta_2$ M-Expression in HuH7-Zellen

Nach der Passage wurden die HuH7-Zellen für ca. 24 h in DMEM/F-12 + 10 % FCS bis zur Subkonfluenz vorkultiviert. Anschließend erfolgte die Inkubation für 18 h in serumfreiem Medium (DMEM/F-12 + 0,2 % BSA) mit 100 U/ml IL-1 $\beta$ , 500 U/ml IFN $\alpha$ , 500 U/ml IFN $\gamma$ , 500 U/ml IL-6 und 100 U/ml IL-1 $\beta$  + 500 U/ml IL-6. Nach Beendigung der Inkubationszeit wurden die Zellen lysiert und die Gesamt-RNA präpariert. Die RNA wurde für *Northern Blot*-Analysen elektrophoretisch aufgetrennt. Die Hybridisierung erfolgte mit einer [ $^{32}$ P]- $\beta_2$ M-cDNA.

Durch Inkubation mit  $\text{IFN}\alpha$  und  $\text{IFN}\gamma$  in den bekannt wirksamen Dosierungen ergab sich im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle eine signifikante Erhöhung der  $\beta_2\text{M}$ -mRNA-Konzentration. Hierbei ist zu erkennen, dass der Einsatz von  $\text{IFN}\gamma$  zu einem vergleichsweise stärkeren Signal der  $\beta_2\text{M}$ -mRNA führte als der Einsatz von  $\text{IFN}\alpha$ . Die alleinige Zugabe von IL-6 hatte keinen stimulatorischen Effekt auf die Konzentration von  $\beta_2\text{M}$ -mRNA in HuH7-Zellen. Dieses Ergebnis steht im Widerspruch zu den von Homma *et al.* veröffentlichten Ergebnissen. Es zeigte sich in den HuH7-Zellen ein positiver Einfluss auf die  $\beta_2\text{M}$ -mRNA-Konzentration bei der Inkubation mit IL-1 $\beta$ . Dieser Einfluss ist ebenso bei der Kostimulation mit IL-1 $\beta$  und IL-6 zusehen. Durch die Kombination beider Zytokine sollte untersucht werden, ob die HuH7-Zellen durch eine Aktivierung durch IL-1 $\beta$  sensitiver für einen Stimulus mit IL-6 werden. Es zeigt jedoch kein größerer Einfluss durch die Kombination beider Interleukine (Fig. 4.2.2). Die Inkubation der Hepatom-Zellen HuH7 mit durch LPS-konditionierten Monozytenüberständen zeigte in Analogie zu den Experimenten mit HepG2 keine relevanten Einflüsse der darin enthaltenen Zytokine auf die  $\beta_2\text{M}$ -mRNA in HuH7-Zellen (Daten hier nicht gezeigt).

#### 4.2.3 Einfluss von Zytokinen auf die $\beta_2\text{M}$ -mRNA in Jurkat-Zellen

Als ein weiteres Ziel der Untersuchungen und mögliche Quelle einer erhöhten Bildung von  $\beta_2\text{M}$  wurden Lymphozyten untersucht. Lymphozyten sind schon im Rahmen viraler Erkrankungen und maligner Neoplasien als Ursprung erhöhter  $\beta_2\text{M}$ -Serumspiegel erkannt worden (Bernier und Fanger 1972; Campos 1984; Dunne 1996).

In unseren Untersuchungen diente die humane T-Zell-Leukämie-Zelllinie Jurkat als Modell für das Verhalten von Lymphozyten nach Exposition mit Zytokinen. Die Jurkat-Zellen wurden aus dem Blut eines an akuter T-Zell-Leukämie erkrankten Jungen isoliert und in zahlreichen anderen Veröffentlichungen als repräsentativer Ersatz für humane T-Zellen eingesetzt (Schneider 1977).

Die *Northern Blot*-Analysen von Jurkat-Zellen führten nach serumfreier Stimulation mit IL-1 $\beta$ , IFN $\alpha$ , IFN $\gamma$  und IL-6 zu folgenden Ergebnissen:

Eine 18-stündige Inkubation der Zellen mit 500 U/ml IFN $\alpha$  und 500 U/ml IFN $\gamma$  ergab eine Zunahme der hybridisierten  $\beta_2$ M-cDNA in den *Northern Blots*. Interferone haben auch hier den gleichen stimulatorischen Effekt auf die  $\beta_2$ M-Transkription wie in den Hepatom-Zelllinien. Auch in Jurkat-Zellen ergab sich der zuvor beobachtete schwächere Effekt des IFN $\alpha$ .

Die Inkubation der Jurkat-Zellen mit 100 U/ml IL-1 $\beta$ , 500 U/ml IL-6 und der Kombination beider Interleukine zeigte keinen Effekt auf die transkriptionelle Regulation von  $\beta_2$ M (Fig. 4.2.3).

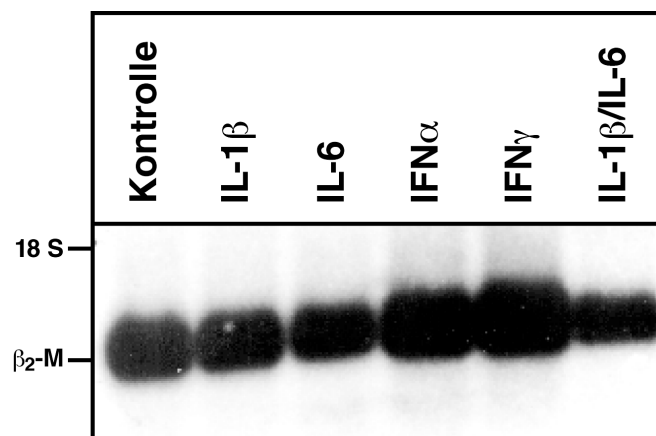


Fig. 4.2.3: Einfluss verschiedener Zytokine auf die  $\beta_2$ M-Expression in Jurkat-Zellen

Nach 24 h Vorkultivierung wurden die Jurkat-Zellen bei einer Zelldichte von  $3 \times 10^6$  Zellen/ml mit den Zytokinen IL-1 $\beta$  [100 U/ml], IFN $\alpha$  [500 U/ml], IFN $\gamma$  [500 U/ml] IL-6 sowie IL-1 $\beta$  + IL-6 [100/500 U/ml] inkubiert. Nach 18 h erfolgte die Lyse der Zellen mit anschließender RNA-Präparation. Die Hybridisierung des *Northern Blots* erfolgte mit der radioaktiv-markierten  $\beta_2$ M-cDNA.

In den ebenfalls durchgeführten Experimenten mit durch Endotoxin konditionierten Monozyten-Überständen war in *Northern Blots* mit RNA aus Jurkat-Zellen keine Zunahme der  $\beta_2$ M mRNA im Vergleich zu den Negativ-Kontrollen (Inkubation mit RPMI oder LPS) nachweisbar.

#### 4.2.4 Einfluss von Zytokinen auf die $\beta_2$ M-mRNA in MonoMac6-Zellen

Durch Untersuchung von weiteren Zellen des mononukleären Systems sollte geklärt werden, ob es in Zellen des Monozyten-Makrophagen-Systems durch eine eventuelle autokrine Stimulation ihrer Entzündungsmediatoren oder durch Vermittlung des Oberflächenproteins CD14 als Endotoxinrezeptor bei LPS-Exposition zu einer erhöhten Transkription von  $\beta_2$ M und damit zur Entwicklung der Hämodialyse-assoziierten Amyloidose kommt.

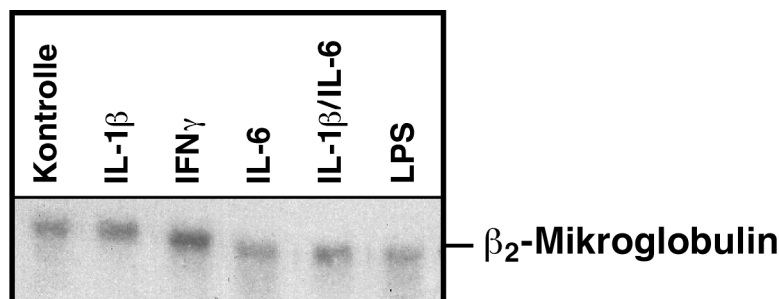


Fig. 4.2.4: Einfluss verschiedener Zytokine auf die  $\beta_2$ M-Expression in MonoMac6-Zellen

Nach 24 h Vorkultivierung wurden die MonoMac6-Zellen bei einer Zelldichte von  $2 \times 10^6$  Zellen/ml mit den Zytokinen IL-1 $\beta$  [100 U/ml], IFN $\alpha$  [500 U/ml], IFN $\gamma$  [500 U/ml] IL-6 [500 U/ml] und IL-1 $\beta$  + IL-6 [100/500 U/ml] sowie LPS [25 ng/ml] inkubiert. Nach 18 h erfolgte die Lyse der Zellen mit anschließender RNA-Präparation. Die Hybridisierung des *Northern Blots* erfolgte mit der radioaktiv-markierten  $\beta_2$ M-cDNA.

In der permanenten, monozytischen Zelllinie MonoMac6, die sowohl monozytische als auch Makrophagen-Eigenschaften aufweist, wurde der Einfluss der Entzündungsmediatoren IL-1 $\beta$ , IFN $\alpha$ , IFN $\gamma$ , IL-6 sowie LPS auf die  $\beta_2$ M-mRNA-Konzentration untersucht (Ziegler-Heitbrock 1988b).

Nach 18 h Inkubation mit 0,5 % FCS enthaltendem Medium (eine längere serumfreie Stimulation wird von den Zellen schlecht toleriert und es kommt zur Apoptose) zeigte sich nur ein schwacher Effekt von IFN $\gamma$  auf die  $\beta_2$ M-mRNA. Der Einsatz der Zytokine IL-1 und IL-6 ließ keinen Einfluss auf die  $\beta_2$ M-Transkription erkennen.

Des Weiteren führte die Inkubation der Zellen mit 25 ng/ml LPS als potenter Induktor der Zytokinantwort zu keiner Erhöhung der  $\beta_2$ M-mRNA im Vergleich zu den Negativkontrollen in MonoMac6-Zellen (Fig. 4.2.4). In den Experimenten konnte nach Stimulation mit LPS eine Bildung von *Clustern* in der Kulturschale beobachtet werden, so dass eine adäquate Aktivierung der monozytären Zellen angenommen werden konnte.

#### 4.2.5 Einfluss von Lipopolysacchariden auf die $\beta_2$ M-mRNA in primären Monozyten

Zur Weiterführung der aus den permanenten Zelllinien erhaltenen Ergebnisse, wurden die Experimente mit primären humanen Zellen durchgeführt. Mittels der Untersuchungen sollte bewiesen werden, dass der in den permanenten Zelllinien nicht vorhandene Einfluss der Zytokine IL-1 $\beta$  und IL-6 sowie von LPS auch in Zellen zu beobachten ist, die direkt aus dem humanen System stammen. Es sollte ausgeschlossen, dass dieser mangende Einfluss auf Phänomene der Tumorentdifferenzierung in der langen Generationszeit der immortalisierten Zelllinien zurückzuführen sein könnte.

Hierzu erfolgten Experimente mit humanen Monozyten. Die Zellen sind im Gegensatz zu primären Hepatozyten leicht aus peripherem Blut zu gewinnen. Als Quelle hierzu dienten *Buffy Coats*, die nach der Herstellung von Erythrozyten-Konzentraten aus Spenderblut im Institut für Transfusionsmedizin der RWTH Aachen anfielen und uns freundlicherweise zur Verfügung gestellt wurden.

Die Zellen wurden nach Isolierung aus den *Buffy Coats* für unterschiedliche Dauer und mit steigender Konzentration unter Zugabe von LPS inkubiert. Nach Ende der Inkubationszeiten wurden die Zellen abzentrifugiert, lysiert und deren Gesamt-RNA präpariert. Die Kulturüberstände wurden für Proteinanalysen asserviert (siehe Kapitel 4.4.5).

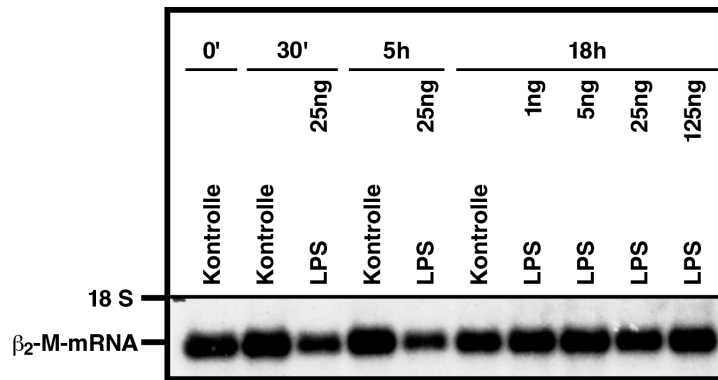


Fig. 4.2.5: **Einfluss von LPS auf die  $\beta_2$ M-Expression in primären Monozyten**

Die Monozyten wurden über Ficoll- und Percoll-Gradienten aus dem *Buffy Coat* isoliert und mit einer Zelldichte von  $2 \times 10^6$  Zellen/ml in Teflon-beschichteten Foliensäcken für 5 h kultiviert. Die Zellen wurden zu je 5 ml mit Lipopolysacchariden (LPS) stimuliert. Die Dauer der Inkubation wurde zwischen 0 h und 18 h variiert, wobei die LPS-Konzentration von 1 ng/ml bis zu 125 ng/ml gesteigert wurde. Zu den jeweiligen Messpunkten wurden unstimulierte Negativkontrollen hergestellt. Nach Beendigung der Inkubation erfolgte die Lyse der Zellen mit anschließender RNA-Präparation. Die Hybridisierung des *Northern Blots* erfolgte mit radioaktiv-markierter  $\beta_2$ M-cDNA.

Anhand der Zytokin-Spiegel ( $\text{TNF}\alpha$ ,  $\text{IL-1}\beta$ ,  $\text{IL-6}$ ), die mittels *Bio Assays* gemessen wurden, konnte eine erfolgreiche Aktivierung der Monozyten bzw. Makrophagen durch LPS festgestellt werden (siehe Fig. 4.2.1.c, Seite 73).

Die Analyse der monozytischen RNA ergab nach Hybridisierung der *Northern Blots* mit einer  $\beta_2$ M-cDNA-Probe auch bei sehr hohen LPS-Mediumspiegeln keine Abhängigkeit zwischen der  $\beta_2$ M-mRNA-Konzentration in primären Monozyten und LPS-Zugabe in das Kulturmedium. Unterschiede in den Bandenstärken bei der Zugabe von LPS bei 30' und 5 h sind auf eine geringere RNA-Beladung zurückzuführen (Fig. 4.2.5).

#### 4.2.6 Einfluss von Zytokinen auf die $\beta_2$ M-mRNA in primären Synoviozyten

Als weitere Möglichkeit, Zytokineffekte in primären Zellen zu untersuchen, standen *Northern Blots* aus Stimulationsexperimenten (ausgeführt von Dr. P. Gatsios, Institut für Biochemie, RWTH Aachen) mit aus primären Synoviozyten isolierter Gesamt-RNA zur Verfügung. Die Zellen wurden aus dem Kniegelenksknorpel eines Operationspräparates von Herrn E. Van De Heul (Institut für Klinische Chemie, RWTH Aachen) isoliert (Gatsios 1996; Haubeck 1995).

In der Pathogenese der  $\beta_2$ M-Amyloidose wäre eine lokale Produktion des  $\beta_2$ M-Amyloids als Reaktion auf eine Bioinkompatibilität an der Dialysemembran denkbar. Durch die generierten Zytokine kann es zu einer Stimulation der Zellen des osteoartikulären Gewebes kommen.

Da Synoviozyten den löslichen kleineren Bestandteil des IL-6-Rezeptors *gp80* nicht auf ihrer Zelloberfläche exprimieren, wurde dieser - ein in vielen Körperflüssigkeiten durch *Shedding* freigesetztes Glykoprotein - bei den Stimulationen mit IL-6 dem Medium zugefügt (Müllberg 1993). Die *Northern Blots* wurden mit einer [ $^{32}$ P]-markierten  $\beta_2$ M-cDNA hybridisiert.

Bei einer 18-stündigen Stimulation mit IL-1 $\beta$  und IL-6, inklusive des löslichen IL-6-Rezeptors *gp80*, sowie einer Kostimulation von IL-1 $\beta$  und IL-6, inklusive *gp80*, zeigte sich keine erhöhte Transkription der mRNA für  $\beta_2$ M in Relation zu den unstimulierten Kontrollen. Auch die Inkubation der Synoviozyten mit Oncostatin M (OSM), einem weiteren Hormon, das wie IL-6 sein Signal über den *gp130*-Rezeptor in die Zelle fortleitet, führte zu keiner signifikanten Änderung des  $\beta_2$ M-mRNA-Spiegels (Fig. 4.2.6) (Kuropatwinski 1997).

Experimente mit Synoviozyten und IFN $\alpha$ - oder IFN $\gamma$ -Inkubation wurden bislang nicht durchgeführt.

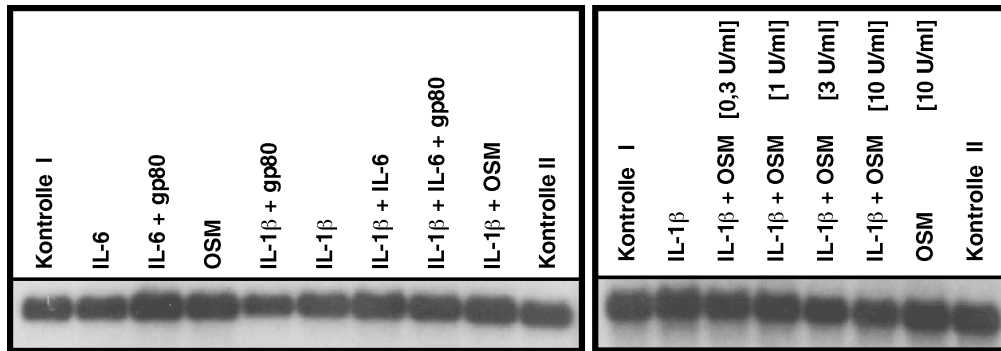


Fig. 4.2.6: **Einfluss von Zytokinen auf die  $\beta_2$ M-mRNA in primären Synoviozyten**

Die Kultur der Synoviozyten erfolgte nach Passage in einer Dichte von  $0,8 \times 10^6$  Zellen in einer 25 cm<sup>2</sup>-Flasche in Opti-MEM-1 mit 15 % FCS. Nach Erreichen der Konfluenz wurde das Medium entfernt, die Zellen gewaschen und mit Opti-MEM-1 inklusive 100 U/ml Superoxid-Dismutase und 250 U/ml Katalase ohne weitere Serumzusätze inkubiert. Zur Stimulation mit Zytokinen wurde das Medium erneut entfernt und die Zellen mit Opti-MEM ohne weitere Zusätze mit den oben angegebenen Zytokinen und gp80 für 24 h inkubiert. Anschließend erfolgte die Präparation der mRNA und die Hybridisierung der *Northern Blots* mit einer radioaktiv-markierten  $\beta_2$ M-cDNA (für weitere Details siehe Gatsios *et al.* 1996).

### 4.3 Einfluss von Zytokinen auf die $\beta_2$ M-Neusynthese in verschiedenen humanen Zelltypen

Zur Untersuchung der Protein-*de novo*-Synthese werden die von den Zellen produzierten Proteine radioaktiv markiert. Hierzu setzt man den Kulturmedien radioaktive Schwefel-Nuklide enthaltende Aminosäuren ( $[^{35}\text{S}]$ -Cystein und  $[^{35}\text{S}]$ -Methionin) zu. Es kommt dann zu einem Einbau dieser Nuklide in alle ab diesem Zeitpunkt neusynthetisierten Zellproteine. Anschließend erfolgt eine nicht denaturierende Lyse der Zellen, die Kulturüberstände werden asserviert, im folgenden Schritt können die zu untersuchenden Proteine mit einem polyklonalen Antikörper immunpräzipitiert werden. Die präzipitierten Proteine werden über Polyacrylamidgele elektrophoretisch aufgetrennt und mittels Autoradiographie detektiert.

Durch diese Technik ist es möglich, die Dynamik einer Stimulation zu erfassen, da sowohl das Protein innerhalb der Zellen als auch seine eventuelle Freisetzung ins Medium beurteilt werden kann.

Mittels sogenannter *Pulse Chase*-Experimente wird die zeitliche Kinetik der  $\beta_2$ M-*de novo*-Synthese in Abhängigkeit von  $\text{IFN}\gamma$  und IL-6 untersucht.

Durch eine Markierung der Zellen mit den  $[^{35}\text{S}]$ -haltigen Aminosäuren (*Pulse*) werden nach unterschiedlichen Zeiträumen die Überstände asserviert und die Zellen lysiert (*Chase*). Anschließend wird  $\beta_2$ M aus den Suspensionen immunpräzipitiert. Hierdurch lässt sich die Kinetik der Proteinbiosynthese und der Umsatz der zu untersuchenden Proteine analysieren.

#### 4.3.1 Einfluss von Zytokinen auf die $\beta_2$ M-*de novo*-Synthese in HepG2-Zellen

Die Analyse der Immunpräzipitation mit HepG2-Zellen zeigte folgendes Ergebnis: Nach vorheriger Stimulation über 18 h mit  $\text{IFN}\alpha$  und  $\text{IFN}\gamma$  ergab sich nach

dreistündiger Markierung eine Erhöhung der  $\beta_2$ M-Konzentration in bzw. auf der Zelle im Vergleich zur nicht stimulierten Kontrolle. Es ist gleichzeitig eine Akkumulation des  $\beta_2$ M im Medium zu beobachten. Hier ist anzunehmen, dass das neusynthetisierte  $\beta_2$ M zusammen mit dem MH-Komplex Klasse I auf die Zelloberfläche gelangt und es dann aus seiner nicht-kovalenten Bindung dissoziiert. Der stimulatorische Effekt der Interferone auf die Transkription des  $\beta_2$ M-Gens führt über die Zunahme der mRNA-Synthese (wie im *Northern Blot* zu beobachten) zu einer vermehrten Neusynthese des Proteins.

Nach Inkubation von HepG2 mit IL-1 $\beta$  und IL-6 sowie mit deren Kombination konnte nach Immunpräzipitation keine erhöhte Neusynthese von  $\beta_2$ M festgestellt werden. Das Signal des radioaktiven Proteins besitzt die gleiche Größe und Intensität wie das der Negativkontrolle (Fig. 4.3.1.a, Seite 84).

Durch diesen Versuchsansatz konnte gezeigt werden, dass auch kein Effekt auf eine posttranslationale Regulation des  $\beta_2$ M besteht. Es wird weder vermehrte mRNA transkribiert (*Northern Blot*), noch vermehrt vorhandene mRNA in Protein translatiert. Hierdurch kann ebenso ausgeschlossen werden, dass eventuell gebildetes  $\beta_2$ M als Speichergranula in den Zellen verbleibt oder nicht durch die Zellen ausgeschleust werden kann.

In der Immunpräzipitation ist ein weiteres Signal mit einer Größe von ca. 46 kD sichtbar. Hierbei handelt es sich um das koimmunpräzipitierte HLA-Protein. Im folgenden Versuchsansatz kann dies durch Fällung aus den Zellysaten mit einem spezifischen Antikörper gegen den MHC bewiesen werden.

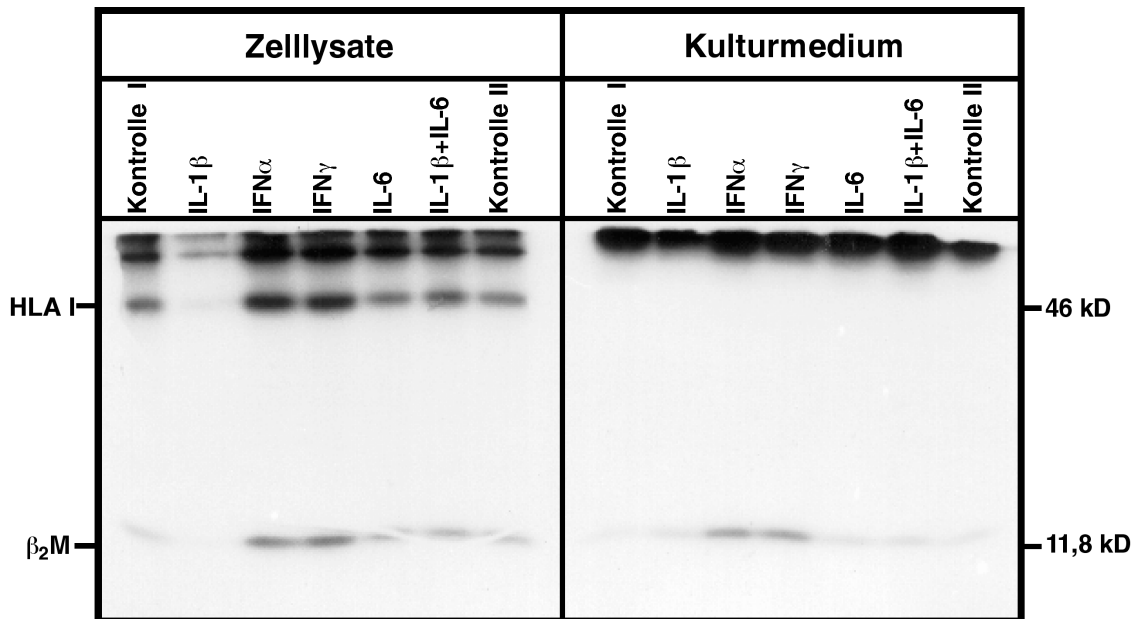


Fig. 4.3.1.a: Einfluss von IL-1 $\beta$ , IFN $\alpha$ , IFN $\gamma$  und IL-6 auf die  $\beta_2$ M-*de novo*-Synthese in HepG2-Zellen

Nach Vorkultivierung der Zellen in 10 % FCS-Kulturmedium erfolgte bei einer Konfluenz von 70 % bis 80 % ein Mediumwechsel und die Zellen wurden in 0,2 % BSA-Kulturmedium mit den Zytokinen IL-1 $\beta$  [100 U/ml], IFN $\alpha$  [500 U/ml], IFN $\gamma$  [500 U/ml], IL-6 [500 U/ml] und IL-1 $\beta$  [100 U/ml] + IL-6 [500 U/ml] inkubiert. Nach 18 h wurde das Medium abgenommen und die Zellen hinsichtlich Cystein und Methionin 'gemangelt' (15 min in MEM ohne Cystein und Methionin). Es folgte eine Inkubation der Zellen mit [ $^{35}$ S]-Cystein- und [ $^{35}$ S]-Methionin-haltigem Medium. Nach drei Stunden metabolischer Markierung wurde das Medium entfernt und die Zellen für weitere 3 h mit Kulturmedium inkl. 0,2 % BSA inkubiert. Die Überstände asserviert und die Zellen lysiert. Mit Hilfe eines Antikörpers wurde  $\beta_2$ M aus den Lysaten und Überständen präzipitiert, anschließend elektrophoretisch aufgetrennt (SDS-PAGE) und mittels von Autoradiographie detektiert.

#### 4.3.1.1 Einfluss von Zytokinen auf die MHC-*de novo*-Synthese in HepG2-Zellen

In einem Experiment, in dem die Präzipitation mit dem monoklonalen Antikörper W<sub>6/32</sub> gegen die  $\alpha_3$ -Domäne des MHC durchgeführt wurde, konnte bestätigt werden, dass es sich bei der 46 kD messenden Bande in der Immunpräzipitation mit dem  $\beta_2$ M-Antikörper um den membrangebundenen Teil des Komplexes handelt.  $\beta_2$ M wurde nur schwach koimmunpräzipitiert.

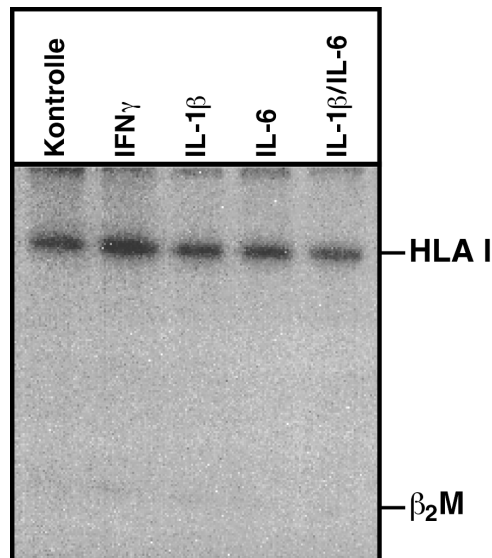


Fig. 4.3.1.b: **Einfluss von IL-1 $\beta$ , IFN $\gamma$  und IL-6 auf die MHC-*de novo*-Synthese in HepG2-Zellen**

Nach Vorkultivierung der Zellen in 10 % FCS-Kulturmedium erfolgte bei einer Konfluenz von 70 % bis 80 % ein Mediumwechsel und die Zellen wurden in 0,2 % BSA-Kulturmedium mit den Zytokinen IL-1 $\beta$  [100 U/ml], IFN $\gamma$  [500 U/ml], IL-6 [500 U/ml] und IL-1 $\beta$  [100 U/ml] + IL-6 [500 U/ml] inkubiert. Nach 18 h wurde das Medium abgenommen und die Zellen hinsichtlich Cystein und Methionin 'gemangelt' (15 min in MEM ohne Cystein und Methionin). Es folgte eine Inkubation der Zellen mit [ $^{35}$ S]-Cystein- und [ $^{35}$ S]-Methionin-haltigem Medium. Nach 3 h metabolischer Markierung wurde das Medium entfernt und die Zellen für weitere 3 h mit Kulturmedium inkl. 0,2 % BSA inkubiert. Die Überstände asserviert und die Zellen lysiert. Zur Immunpräzipitation des MH-Komplexes wurde der Antikörper Klon W<sub>6/32</sub> eingesetzt. Anschließend wurden die Proben elektrophoretisch aufgetrennt und mittels Fluorographie detektiert.

Auch hier ist der positive stimulatorische Effekt des IFN $\gamma$  festzustellen. Interferone führen also zur gleichzeitigen Expression vom MH-Komplex Klasse I auf Chromosom 15 und  $\beta_2$ M auf Chromosom 6 in Hepatozyten. Eine Präzipitation des MHC aus den Überständen konnte nicht gelingen, da dieser als membrangebundener Komplex nicht freigesetzt wird.

Die eingesetzten Interleukine haben auch hier keinen Einfluss (Fig 4.3.1.b).

#### 4.3.1.2 Trichloressigsäure-Fällung von radioaktiven Proteinen nach Stimulation mit IL-6 und IFN $\gamma$

Durch Fällung aller in den Lysaten befindlichen Proteine erfolgte die Kontrolle, dass es durch die Inkubation mit Interferon nicht zu einer unspezifischen Erhöhung der Proteinbiosynthese gekommen ist. Hierzu wurden die Proteine mit Trichloressigsäure gefällt und alle nicht in Proteine eingebauten Aminosäuren mit Ethanol entfernt. Die verbleibende Radioaktivität entsprach den in Zellproteine eingebauten Aminosäuren und wurde in einem Szintillationszähler ermittelt.

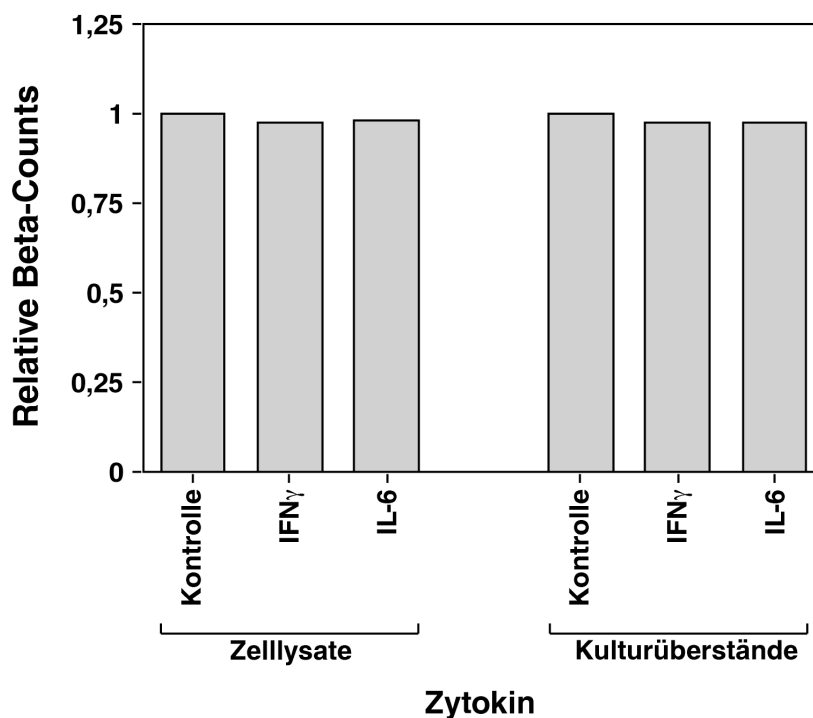


Fig. 4.3.1.c: Trichloressigsäure (TCA)-Fällung von radioaktiven Proteinen nach Stimulation mit IL-6 und IFN $\gamma$

10  $\mu$ l Aliquots der Lysate wurden auf Whatman-Filterpapier GF/C (3MM) gegeben und an der Luft getrocknet. Die Proteine für 5 min mit 10 %-iger TCA gefällt. Die Filter wurden anschließend für 2 - 3 min in 5 %-iger TCA gekocht und zwei weitere Male mit 5 % TCA gewaschen. Durch zweimaliges Waschen mit Ethanol [96 %] wurden die tRNA-Fragmente mit den markierten Aminosäuren entfernt. Zu den Filtern wurde nach Trocknung (1 h bei 60°C) 2 ml Szintillationsflüssigkeit gegeben und die Radioaktivität in einem Szintillationsmessgerät gemessen.

Hierbei zeigte sich eine ausgeglichene Radioaktivität in beiden Versuchsansätzen. Dies bedeutet, dass es zu keinem generellen Einfluss auf die Proteinbiosynthese durch Interferon- oder IL-6-Zugabe kommt und das erhöhte Signal nach Zugabe von  $\text{IFN}\gamma$  für  $\beta_2\text{M}$  spezifisch ist (Fig. 4.3.1.c).

#### 4.3.1.3 Zeitlicher Verlauf der $\beta_2\text{M}$ -*de novo*-Synthese in HepG2-Zellen

In einem weiteren Versuchsansatz sollte die zeitliche Kinetik der  $\beta_2\text{M}$ -*de novo*-Synthese in Abhängigkeit von  $\text{IFN}\gamma$  und IL-6 untersucht werden. Dazu wurde ein sogenanntes *Pulse Chase*-Experiment durchgeführt. Nach Markierung der Zellen mit den [ $^{35}\text{S}$ ]-haltigen Aminosäuren wurden nach definierten Zeiträumen die Überstände asserviert und die Zellen lysiert. Anschließend wurde  $\beta_2\text{M}$  aus den Suspensionen immunpräzipitiert.

Bei den Zellen der unstimulierten Kontrolle ist zu beobachten, dass das Maximum an eingebauten radioaktiv-markierten Aminosäuren in  $\beta_2\text{M}$  20 min nach Beendigung der Markierung in den Zellen bzw. ihrer Oberfläche zu finden ist. Nach 3 h ist der größte Teil des [ $^{35}\text{S}$ ]- $\beta_2\text{M}$  schon im Kulturmedium zu präzipitieren. Dies zeigt, dass gebundenes  $\beta_2\text{M}$  mit dem Umgebungsmilieu im Gleichgewicht steht und ein Teil ins Medium oder Körperflüssigkeiten dissoziieren kann. Des Weiteren lässt sich feststellen, dass nach ca. 1 h die Signalstärke des MHC in den Zelllysaten abnimmt. Dies deutet auf einen relativ hohen *Turn Over* dieses Proteins hin, da der Anteil des nicht radioaktiv-markierten Proteins wieder steigt.

Nach Inkubation der HepG2 mit  $\text{IFN}\gamma$  zeigte sich die gleiche Kinetik. Im Vergleich zu den unstimulierten Zellen ist aber zu jedem betreffendem Zeitpunkt das Signal des  $\beta_2\text{M}$  und MH-Komplexes stärker, d. h. es wird mehr  $\beta_2\text{M}$  und MHC synthetisiert.

Die Stimulation der Zellen mit IL-6 ergab zu keinem der untersuchten Zeitpunkte eine vermehrte *de novo*-Synthese des  $\beta_2\text{M}$  oder MHC. Es ist weder ein schnell eintretender noch ein retardierter Effekt (bis 18 h nach Markierung) des IL-6 auf die Synthese des  $\beta_2\text{M}$  zu erkennen (Fig. 4.3.1.d, Seite 88).

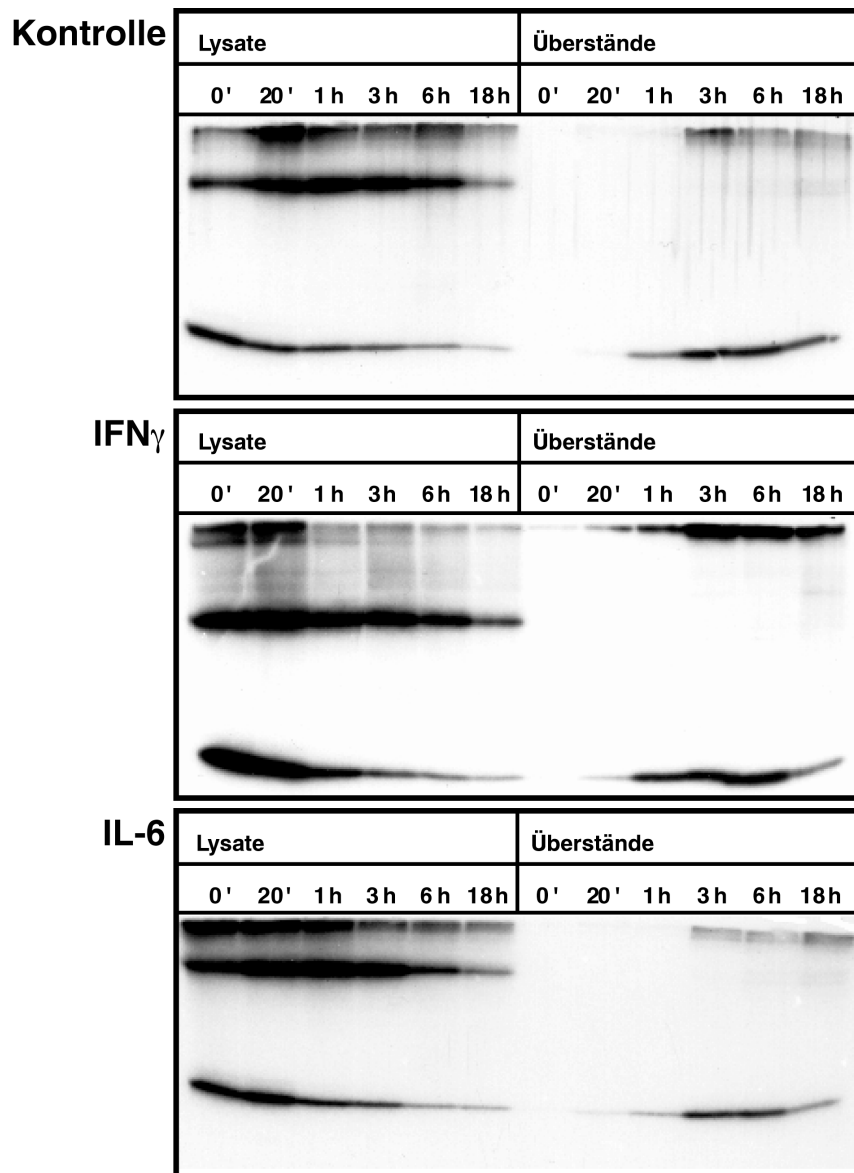


Fig. 4.3.1.d: Zeitlicher Verlauf der  $\beta_2$ M-*de novo*-Synthese in HepG2-Zellen nach Stimulation mit IFN $\gamma$  und IL-6

Nach Vorkultivierung der Zellen in 10 % FCS-Kulturmedium erfolgte bei einer Konfluenz von 70 % bis 80 % ein Mediumwechsel und die Zellen wurden in 0,2 % BSA-Kulturmedium mit den Zytokinen IFN $\gamma$  [500 U/ml] und IL-6 [500 U/ml] inkubiert. Nach 18 h wurde das Medium abgenommen und die Zellen hinsichtlich Cystein und Methionin 'gemangelt'. Es folgte eine Inkubation der Zellen mit [ $^{35}$ S]-Cystein- und [ $^{35}$ S]-Methionin-haltigem Medium. Nach einer Stunde metabolischer Markierung wurde das Medium entfernt und die Zellen für definierte Zeit mit Kulturmedium inkl. 0,2 % BSA inkubiert. Nach den oben angegebenen Zeitpunkten wurden die Überstände asserviert und die Zellen lysiert. Mit Hilfe eines Antikörpers wurde  $\beta_2$ M aus den Lysaten und Überständen präzipitiert, anschließend elektrophoretisch aufgetrennt und mittels Autoradiographie detektiert.

### 4.3.2 Einfluss von Zytokinen auf die $\beta_2$ M-*de novo*-Synthese in HuH7-Zellen

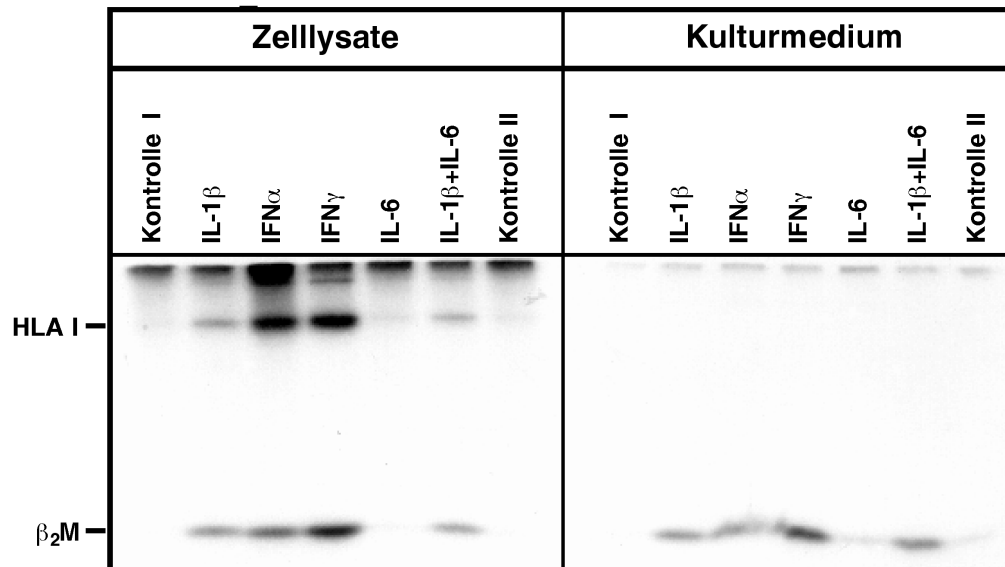


Fig. 4.3.2.a: Einfluss von IL-1 $\beta$ , IFN $\alpha$ , IFN $\gamma$  und IL-6 auf die  $\beta_2$ M-*de novo*-Synthese in HuH7-Zellen

Nach Vorkultivierung der Zellen in Kulturmedium inkl. 10 % FCS erfolgte bei einer Konfluenz von 70 % bis 80 % ein Mediumwechsel. Die Zellen wurden in Kulturmedium mit 0,2 % BSA mit den Zytokinen IL-1 $\beta$  [100 U/ml], IFN $\alpha$  [500 U/ml], IFN $\gamma$  [500 U/ml], IL-6 [500 U/ml] und IL-1 $\beta$  [100 U/ml] + IL-6 [500 U/ml] inkubiert. Nach 18 h wurde das Medium abgenommen und die Zellen hinsichtlich Cystein und Methionin 'gemangelt'. Es folgte eine Inkubation der Zellen mit [ $^{35}$ S]-Cystein- und [ $^{35}$ S]-Methionin-haltigem Medium. Nach 3 h metabolischer Markierung wurde das Medium entfernt und die Zellen mit Kulturmedium inkl. 0,2 % BSA inkubiert. Nach 3 h wurden die Überstände asserviert und die Zellen lysiert. Durch einen anti- $\beta_2$ M-Antikörper erfolgte die Präzipitation von  $\beta_2$ M aus den Lysaten und Überständen. Das Präzipitat wurde elektrophoretisch aufgetrennt und autoradiographisch detektiert.

In HuH7-Zellen zeigte sich nach Inkubation mit IFN $\alpha$  und insbesondere IFN $\gamma$  unter serumfreien Bedingungen eine verstärkte *de novo*-Synthese sowohl von  $\beta_2$ M als auch vom HLA-Klasse I-Molekülen.

Der bereits in den *Northern Blots* gezeigte positive Einfluss des IL-1 $\beta$  auf die  $\beta_2$ M-mRNA konnte auch in den Immunpräzipitationen bestätigt werden. Es zeigte sich der beobachtete - im Vergleich zu IFN - schwächere Effekt von IL-1 $\beta$  auf die Neusynthese von  $\beta_2$ M.

Nach Stimulation der Zellen mit IL-6 konnte im Vergleich zu den Kontrollen keine erhöhte Menge von radioaktiv markierten  $\beta_2$ M oder MHC aus den Zelllysaten bzw. Kulturüberständen präzipitiert werden. Auch eine Koinkubation beider Interleukine führte zu keinen erkennbaren additiven Effekt (Fig. 4.3.2.a).

Durch den oben beschriebenen *Pulse Chase*-Versuchsansatz wurde ebenso die *de novo*-Synthese von  $\beta_2$ M über einen längeren Zeitraum in Abhängigkeit von  $\text{IFN}\gamma$  und IL-6 in HuH7 untersucht.

Im Vergleich zu den unstimulierten Kontrollen wurde bei Inkubation mit  $\text{IFN}\gamma$  zu jedem Zeitpunkt der Präzipitation ein vermehrter Einbau der radioaktiver Aminosäure in  $\beta_2$ M und in den MH-Komplex festgestellt. Ein stimulatorischer Effekt von IL-6 auf die *de novo*-Synthese von  $\beta_2$ M oder MHC im Vergleich zu den unstimulierten Kontrollen konnte über den gesamten Zeitraum (von 0 bis 18 h nach Markierung) nicht nachgewiesen werden (siehe Fig. 4.3.2.b, Seite 91). Dies entspricht den Ergebnissen der humanen Hepatozyten-Zelllinie HepG2.

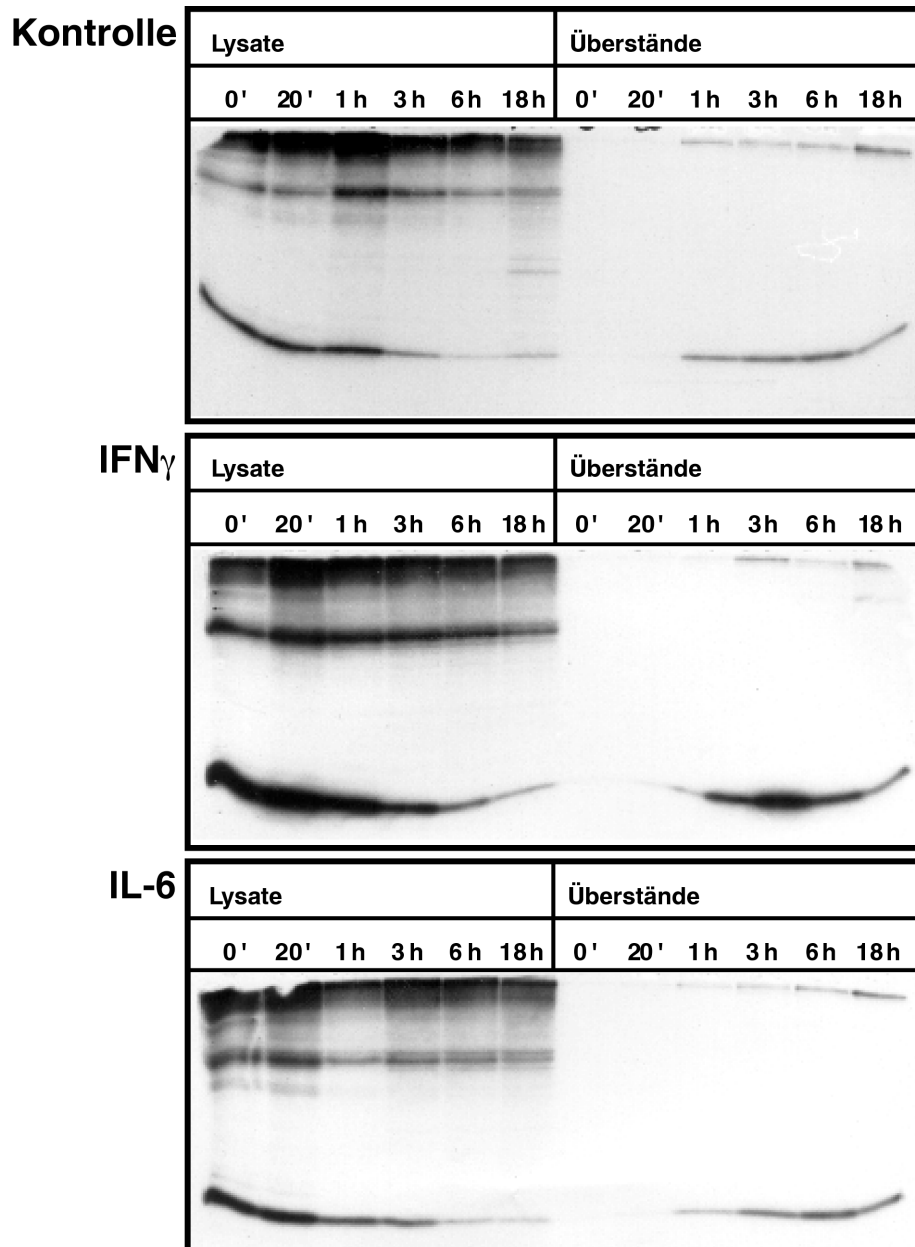


Fig. 4.3.2.b: Zeitlicher Verlauf der  $\beta_2$ M-*de novo*-Synthese in HuH7-Zellen nach Stimulation mit IFN $\gamma$  und IL-6

Nach Vorkultivierung der Zellen in 10 % FCS-Kulturmedium erfolgte bei einer Konfluenz von 70 % bis 80 % ein Mediumwechsel und die Zellen wurden in 0,2 % BSA-Kulturmedium mit den Zytokinen IFN $\gamma$  [500 U/ml] und IL-6 [500 U/ml] inkubiert. Nach 18 h wurde das Medium abgenommen und die Zellen hinsichtlich Cystein und Methionin 'gemangelt'. Es folgte eine Inkubation der Zellen mit [ $^{35}$ S]-Cystein- und [ $^{35}$ S]-Methionin-haltigem Medium. Nach einer Stunde metabolischer Markierung wurde das Medium entfernt und die Zellen für weitere Zeit mit Kulturmedium inkl. 0,2 % BSA inkubiert. Nach definierten Zeitpunkten (wie oben angegeben) wurden die Überstände asserviert und die Zellen lysiert. Mit Hilfe des Antikörpers wurde  $\beta_2$ M aus den Lysaten und Überständen präzipitiert, anschließend elektrophoretisch aufgetrennt und mittels Autoradiographie detektiert.

### 4.3.3 Einfluss von IL-6 und IFN $\gamma$ auf die $\beta_2$ M-*de novo*-Synthese in Jurkat-Zellen

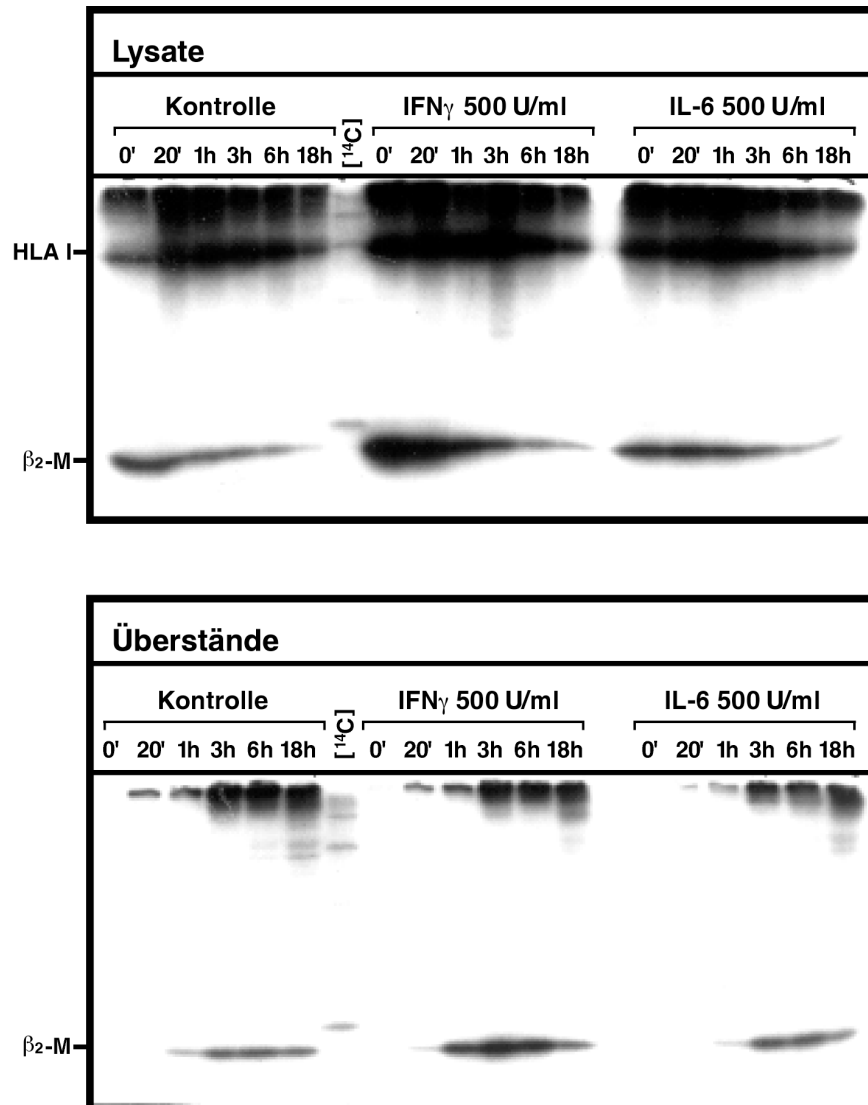


Fig. 4.3.3: Zeitlicher Verlauf der  $\beta_2$ M-*de novo*-Synthese in Jurkat-Zellen nach Stimulation mit IFN $\gamma$  und IL-6

Die Zellen wurden nach Passage in RPMI 1640 + 0,2 % FCS mit einer Zelldichte von  $3 \times 10^6$  Zellen/ml aufgenommen und für 24 h vorkultiviert. Anschließend erfolgte die Zugabe von IFN $\gamma$  [500 U/ml] und IL-6 [500 U/ml]. Nach 18 h wurde das Medium abgenommen und die Zellen hinsichtlich Cystein und Methionin 'gemangelt'. Es folgte zur metabolischen Markierung eine Inkubation der Zellen mit [<sup>35</sup>S]-Cystein- und [<sup>35</sup>S]-Methionin-haltigem Medium. Nach einer Stunde wurde das Medium entfernt und die Zellen für definierte Zeit mit Kulturmedium inkl. 0,2 % BSA inkubiert. Nach den oben angegebenen Zeitpunkten wurden die Überstände asserviert und die Zellen lysiert. Mit Hilfe von anti- $\beta_2$ M wurde  $\beta_2$ M aus den Lysaten und Überständen präzipitiert, elektrophoretisch aufgetrennt und mittels Autoradiographie detektiert.

Jurkat-Zellen wurden stellvertretend für das lymphozytische System auf die Wirkung von IL-6 auf die  $\beta_2$ M-*de novo*-Synthese untersucht.

In den lymphozytären Zellen zeigt sich die gleiche Kinetik des MHC und  $\beta_2$ M wie in den Hepatomzellen. Nach 20 min (Lysate) und 3 h (Medium) kann die maximale Menge an markierten Proteinen präzipitiert werden. Nach Inkubation der Jurkat-Zellen mit IFN $\gamma$  zeigte sich der bekannte stimulatorische Effekt sowohl auf die  $\beta_2$ M- als auch auf die MHC-Synthese.

Ein Effekt von IL-6 auf  $\beta_2$ M oder MHC im Vergleich zu den unstimulierten Kontrollen konnte über den gesamten Zeitraum (von 0 min bis 18 h nach Markierung) nicht nachgewiesen werden (Fig.4.3.3).

#### 4.4 Einfluss von Zytokinen auf die $\beta_2$ M-Protein-Konzentration in Kulturüberständen verschiedener humaner Zelltypen

Durch die Messung der  $\beta_2$ M-Konzentration im Kulturmedium humaner Zellen sollte untersucht werden, ob posttranslationale Einflüsse von Zytokinen auf die Sekretion oder vermehrte Freisetzung bestehen (Ramadori 1988). Durch *Northern Blot* und Immunpräzipitation konnte bewiesen werden, dass kein entscheidender Einfluss von IL-1 $\beta$  und IL-6 oder anderen Monokinen auf die *de novo*-Synthese von  $\beta_2$ M bzw. des gesamten HLA-Komplexes besteht.

Es ist jedoch denkbar, dass  $\beta_2$ M unter Einfluss von Zytokinen als sekretorisches Peptid aus präformierten intrazellulären Vesikeln oder über aktive Freisetzung aus dem HLA-Komplex in die Umgebung der Zellen gelangt. Unter diesen Umständen wäre in den bisher dargestellten Methoden kein Effekt messbar, da mittels dieser Methoden auf die Neusynthese der Proteine messbar ist.

Im *Immuno Blot* kann nach elektrophoretischer Auftrennung der gesamten Proteine des Zellüberstands und anschließender Übertragung auf eine Membran das zu untersuchende Protein mittels eines Antikörpers erkannt werden und durch eine anschließende Peroxidasereaktion qualitativ im Vergleich zu den Kontrollüberständen detektiert werden.

Im *Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay* (ELISA) können Proteine in Kulturüberständen der verschiedenen Zelltypen im Vergleich zu einer Standardkurve quantitativ bestimmt werden. Es wurde ein kommerziell erhältlicher ELISA der Firma IBL, Hamburg, verwendet. Dieser ELISA dient zur klinischen Diagnostik, mit ihm kann  $\beta_2$ M im Serum und Urin von Patienten quantifiziert werden. Da die Konzentration in diesen Proben höher ist als in Kulturüberständen von Zellkulturen, wurden die zu messenden Medien entgegen der Herstellerempfehlung von 1:50 nur auf 1:5 verdünnt.

#### 4.4.1 Einfluss von Zytokinen auf die $\beta_2$ M-Protein-Konzentration in Kulturüberständen von HepG2-Zellen

##### 4.4.1.1 Qualitative Konzentrationsbestimmung von $\beta_2$ M in Medium von HepG2-Zellen – *Immuno Blot*

Nach Stimulation der HepG2-Zellen mit  $\text{IFN}\alpha$  und  $\text{IFN}\gamma$  zeigte sich eine Konzentrationserhöhung des Proteins im Kulturüberstand im Vergleich zu den unstimulierten Kontrollen. Auch im *Immuno Blot* zeigte sich der etwas stärkere Einfluss des  $\text{IFN}\gamma$ . Die Inkubation mit  $\text{IL-1}\beta$  und  $\text{IL-6}$  sowie eine gleichzeitige Inkubation mit beiden Zytokinen ergab sowohl nach verschiedenen Inkubationszeiten, als auch mit steigender Konzentration der Zytokine keine Erhöhung der  $\beta_2$ M-Konzentration in den Kulturmedien (siehe Fig. 4.4.1.a, Seite 95).

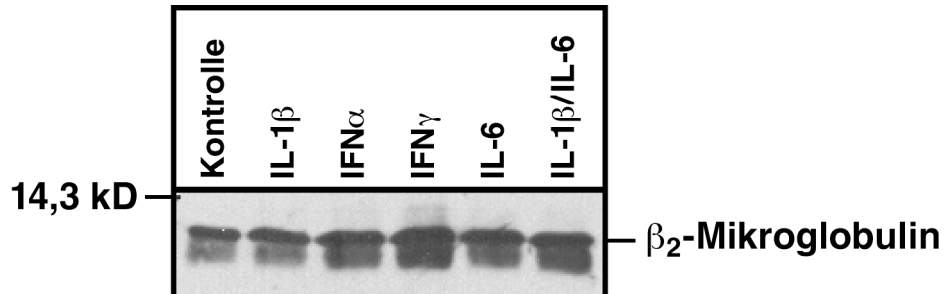


Fig. 4.4.1.a: Einfluss von  $\text{IL-1}\beta$ ,  $\text{IFN}\alpha$ ,  $\text{IFN}\gamma$ , und  $\text{IL-6}$  auf die  $\beta_2$ M-Konzentration im Kulturmedium von HepG2-Zellen im *Immuno Blot*

Nach Passage wurden die Zellen direkt mit einer Zelldichte von  $10^6$  Zellen/ml in DMEM/F-12 + 0,2 % BSA aufgenommen und mit  $\text{IL-1}\beta$  [100 U/ml],  $\text{IFN}\alpha$  [500 U/ml],  $\text{IFN}\gamma$  [500 U/ml],  $\text{IL-6}$  [500 U/ml] und  $\text{IL-1}\beta$  [100 U/ml] +  $\text{IL-6}$  [500 U/ml] für 60 h inkubiert. Der Überstand wurde nach Ende der Stimulation abgenommen, Zellfragmente durch Zentrifugation aus der Suspension entfernt und die Überstände über SDS-PAGE aufgetrennt. Nach Übertragung der Proteine auf eine PVDF-Membran erfolgte die spezifische Detektion von  $\beta_2$ M mit einem Antikörper.

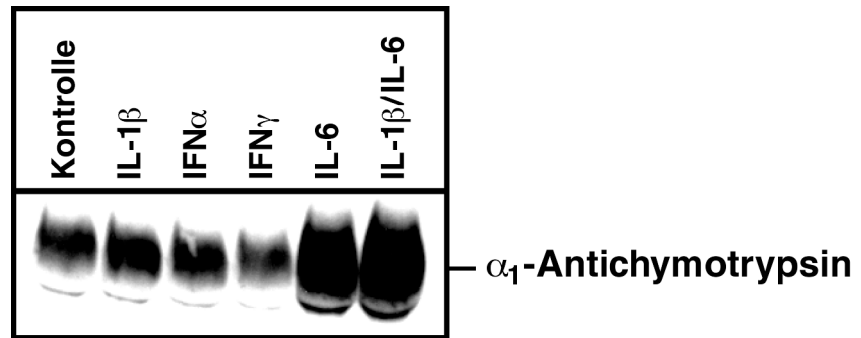


Fig. 4.4.1.b: Einfluss von IL-1 $\beta$ , IFN $\alpha$ , IFN $\gamma$ , und IL-6 auf die  $\alpha_1$ -Antichymotrypsin-Konzentration im Kulturmedium von HepG2-Zellen im *Immuno Blot*

Nach Passage wurden die Zellen mit einer Zelldichte von  $10^6$  Zellen/ml direkt in DMEM/F-12 + 0,2 % BSA aufgenommen und mit IL-1 $\beta$  [100 U/ml], IFN $\alpha$  [500 U/ml], IFN $\gamma$  [500 U/ml], IL-6 [500 U/ml] und IL-1 $\beta$  [100 U/ml] + IL-6 [500 U/ml] für 60 h inkubiert. Der Überstand wurde nach Ende der Stimulation abgenommen, Zellfragmente durch Zentrifugation aus der Suspension entfernt und die Überstände über SDS-PAGE aufgetrennt. Nach Übertragung der Proteine auf eine PVDF-Membran erfolgte die spezifische Detektion von  $\alpha_1$ ACT mit einem Antikörper.

Analog zum *Immuno Blot* mit  $\beta_2$ M wurde eine Detektion von  $\alpha_1$ ACT in HepG2-Kulturüberständen vorgenommen. Hierdurch konnte die adäquate Akute-Phase-Reaktion der Hepatom-Zellen als Reaktion auf die Inkubation mit den Zytokinen demonstriert werden. Nach Zugabe von IL-6 ins Kulturmedium kommt es zu der bekannten, starken Freisetzung von  $\alpha_1$ ACT ins Kulturmedium als Ausdruck der Akute-Phase-Reaktion. Die eingesetzte Konzentration des IL-6 führt also zu einer regelrechten Akute-Phase-Antwort in den Zellen, hat aber keine Auswirkung auf die Freisetzung von  $\beta_2$ M (Fig. 4.4.1.b).

#### 4.4.1.2 Quantitative Konzentrationsbestimmung von $\beta_2$ M im Medium von HepG2-Zellen – ELISA

Die asservierten Kulturüberstände wurden parallel mit Standardproben im  $\beta_2$ M-ELISA gemessen. Die Quantifizierung der  $\beta_2$ M-Konzentration ergab nach 60-stündiger

Inkubation mit  $\text{IFN}\gamma$  einen mehr als zweifachen Anstieg von  $\beta_2\text{M}$  im Kulturmedium im Vergleich zu den Kontrollen. Die Stimulation von HepG2 mit  $\text{IL-1}\beta$  und  $\text{IL-6}$  erzeugte keine vermehrte Akkumulation von  $\beta_2\text{M}$  in HepG2-Überständen. Durch Dosissteigerungen von niedrigen Zytokinkonzentrationen bis hin zu hohen Konzentrationen wurde versucht, eine eventuelle Hemmung der  $\beta_2\text{M}$ -Synthese durch supramaximale Stimulation mit  $\text{IL-1}\beta$  oder  $\text{IL-6}$  auszuschließen. Auch in niedrigen Interleukin-Konzentrationen konnte keine erhöhte Menge an  $\beta_2\text{M}$ -Protein in den Zellkulturüberständen festgestellt werden (Fig. 4.4.1.c).

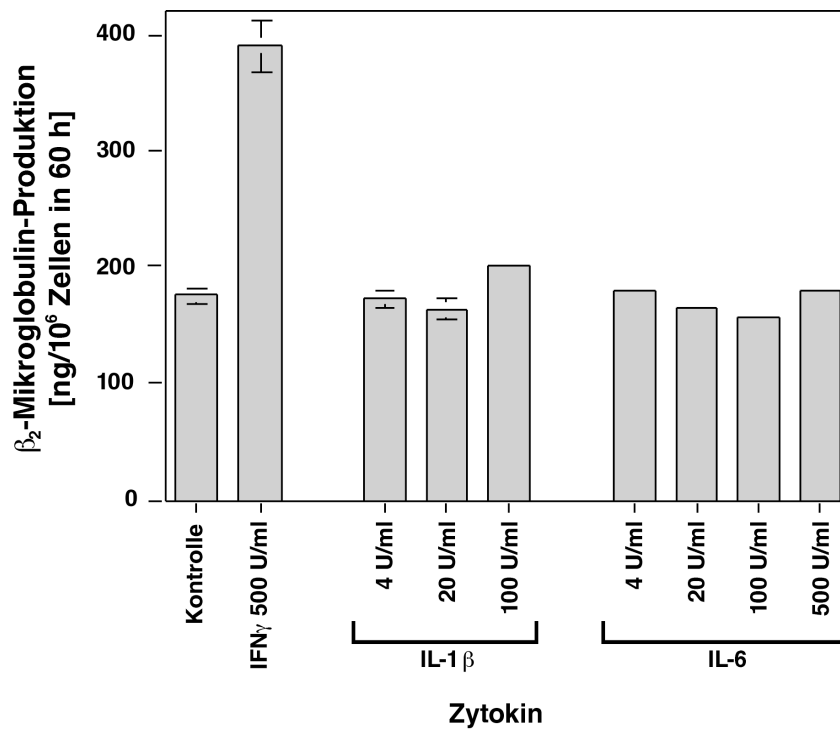


Fig. 4.4.1.c: Einfluss von  $\text{IL-1}\beta$ ,  $\text{IFN}\gamma$  und  $\text{IL-6}$  auf die  $\beta_2\text{M}$ -Konzentration in HepG2-Zellkulturüberständen im ELISA

Die Zellen wurden nach Passage in serumhaltigem Kulturmedium bis zur Subkonfluenz kultiviert und im Anschluss an einen Mediumwechsel (DMEM/F-12 + 0,2 % BSA) direkt mit den Zytokinen  $\text{IL-1}\beta$ ,  $\text{IFN}\gamma$  und  $\text{IL-6}$  in den wie oben angezeigten, aufsteigenden Konzentrationen für 60 h inkubiert. Nach Ende der Inkubation wurden die Kulturüberstände abgenommen und die Zellen nach Trypsinisierung gezählt. Die asservierten Überstände wurden parallel mit Standardproben in Doppelbestimmungen im  $\beta_2\text{M}$ -ELISA gemessen. Der Mittelwert und die Standardabweichung wurden berechnet. Die  $\beta_2\text{M}$ -Konzentration wurde in Bezug zu einer Zellzahl von  $1 \times 10^6$  Zellen gesetzt.

Durch die zeitabhängige Konzentrationsbestimmung von  $\beta_2$ M-Protein im ELISA wurde untersucht, ob mögliche frühe Einflüsse von IL-6 zu einer Konzentrationserhöhung führen, die aufgrund einer raschen Degradierung des Proteins bei späteren Messungen nicht mehr feststellbar ist. Daher wurden Kulturmedien im Abstand von 12 h aus parallelen Ansätzen asserviert. Es zeigte sich eine Akkumulation des  $\beta_2$ M in Abhängigkeit von der Inkubationszeit. Dies entspricht den Beobachtungen der Immunpräzipitation von  $\beta_2$ M, da sich ein Gleichgewicht zwischen HLA-gebundenem und gelöstem  $\beta_2$ M einstellt. Es ergibt sich jedoch kein signifikanter stimulatorischer Effekt von IL-6 auf die Mediumkonzentration von  $\beta_2$ M im Vergleich zu den jeweiligen Kontrollansätzen. Die dargestellten Kurven verlaufen nahezu parallel (Fig. 4.4.1.d).

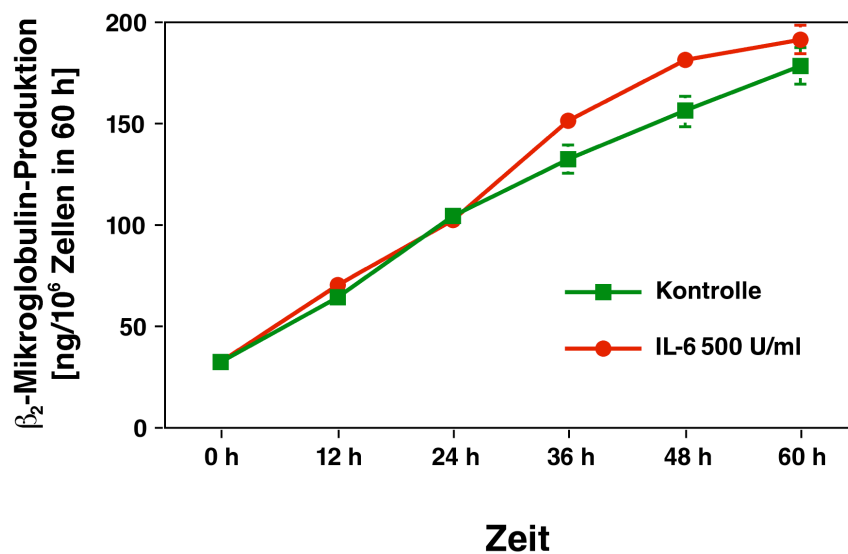


Fig. 4.4.1.d: Zeitlicher Verlauf der  $\beta_2$ M-Konzentration in HepG2-Zellkulturüberständen nach Stimulation mit IL-6 im ELISA

Die Zellen wurden nach Passage in serumhaltigem Kulturmedium bis zur Subkonfluenz kultiviert und nach einem Mediumwechsel (DMEM/F-12 + 0,2 % BSA) direkt mit 500 U/ml IL-6 inkubiert. Zu den oben angegebenen Zeitpunkten wurden die Kulturüberstände abgenommen und die Zellen nach Trypsinisierung gezählt. Die asservierten Überstände wurden parallel mit Standardproben in Doppelbestimmungen im  $\beta_2$ M-ELISA gemessen. Es erfolgte der Bezug der  $\beta_2$ M-Konzentration auf  $1 \times 10^6$  Zellen.

#### 4.4.2 Einfluss von Zytokinen auf die $\beta_2$ M-Protein-Konzentration in Kulturüberständen von HuH7-Zellen

##### 4.4.2.1 Qualitative Konzentrationsbestimmung von $\beta_2$ M im Medium von HuH7-Zellen

– *Immuno Blot*

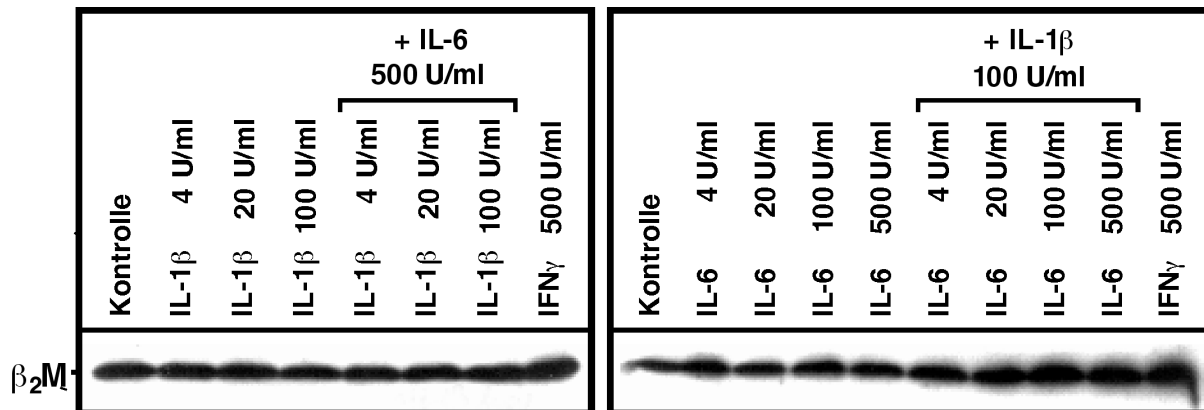


Fig. 4.4.2.a: Einfluss von IFN $\gamma$ , IL-1 $\beta$  und IL-6 auf die  $\beta_2$ M-Konzentration im Kulturmedium von HuH7-Zellen im *Immuno Blot*

Nach Passage wurde die Zellen direkt mit einer Dichte von  $10^6$  Zellen/ml in DMEM/F-12 + 0,2 % BSA aufgenommen und mit IL-1 $\beta$  [100 U/ml], IFN $\gamma$  [500 U/ml], IL-6 [500 U/ml] und IL-1 $\beta$  [100 U/ml] + IL-6 [500 U/ml] für 60 h inkubiert. Nach Ende der Stimulation wurden die Zellen durch Zentrifugation aus der Suspension entfernt und die Überstände über SDS-PAGE aufgetrennt. Nach Übertragung der Proteine auf eine PVDF-Membran erfolgte die spezifische Detektion von  $\beta_2$ M mit einem Antikörper.

Nach 60 h serumfreier Inkubation der HuH7-Zellen zeigten der *Immuno Blot* folgende Ergebnisse:

Die Inkubation mit IFN $\gamma$  ergab den bekannten Anstieg der  $\beta_2$ M-Konzentration im Medium. Nach Stimulation der Zellen mit IL-1 $\beta$  zeigte sich im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle eine leichte, dosisabhängige  $\beta_2$ M-Akkumulation im Medium. Die zusätzliche Zugabe von IL-6 hat keinen weiteren Einfluss auf die  $\beta_2$ M-Freisetzung. In den Ansätzen mit alleinigem Einsatz von IL-6 ergaben sich ebenso keine Konzentrationserhöhungen für  $\beta_2$ M (Fig. 4.4.2.a).

#### 4.4.2.2 Quantitative Konzentrationsbestimmung von $\beta_2$ M im Medium von HuH7-Zellen – ELISA

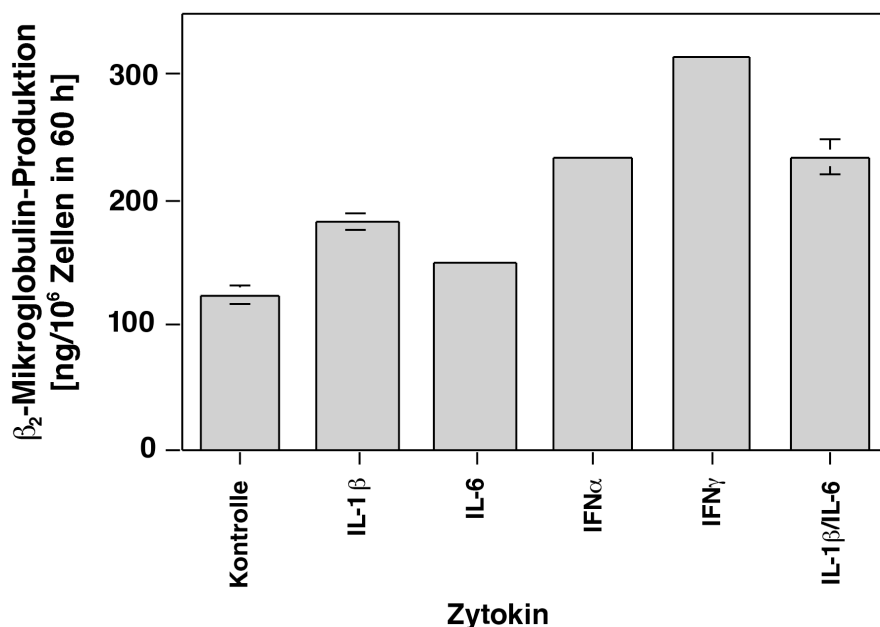


Fig. 4.4.2.b: Einfluss von IL-1 $\beta$ , IFN $\alpha$ , IFN $\gamma$  und IL-6 auf die  $\beta_2$ M-Konzentration in HuH7-Zellkulturüberständen im ELISA

Die Zellen wurden nach Passage in serumhaltigem Kulturmedium bis zur Subkonfluenz kultiviert und im Anschluss an einen Mediumwechsel (DMEM/F-12 + 0,2 % BSA) direkt mit den Zytokinen 100 U/ml IL-1 $\beta$ , 500 U/ml IFN $\alpha$ , 500 U/ml IFN $\gamma$ , 500 U/ml IL-6 und 100 U/ml IL-1 $\beta$  + 500 U/ml IL-6 für 60 h inkubiert. Nach Ende der Inkubation wurden die Kulturüberstände abgenommen und die Zellen nach Trypsinisierung gezählt. Die asservierten Überstände wurden parallel mit Standardproben in Doppelbestimmungen im  $\beta_2$ M-ELISA gemessen. Es erfolgte die Umrechnung der  $\beta_2$ M-Konzentration auf  $1 \times 10^6$  Zellen.

Die Inkubation der Zellen mit IFN $\gamma$  ergab einen 2,5-fachen Anstieg der  $\beta_2$ M-Konzentration in den Überständen. Der Anstieg nach Stimulation mit IFN $\alpha$  ergab dagegen eine etwas geringere Konzentrationszunahme von  $\beta_2$ M (ca. 2-fach). IL-1 $\beta$  ergab nach 60 h, wie in den vorangegangenen Versuchen, eine leicht erhöhte Akkumulation von  $\beta_2$ M in den Kulturmedien im Vergleich zu den unstimulierten Negativkontrollen. Diese liegt jedoch noch deutlich unter der Konzentration von IFN $\alpha$ . Der alleinige Zusatz von IL-6 ins Kulturmedium führte dagegen zu keinem

Anstieg von  $\beta_2$ M. Die Kombination von IL-6 mit IL-1 $\beta$  ergab auch in wiederholten Versuchen keine signifikante Zunahme von  $\beta_2$ M im Vergleich zur alleinigen Stimulation mit IL-1 $\beta$  (siehe Fig. 4.4.2.b, Seite 100; siehe auch Fig. 4.4.2.c).

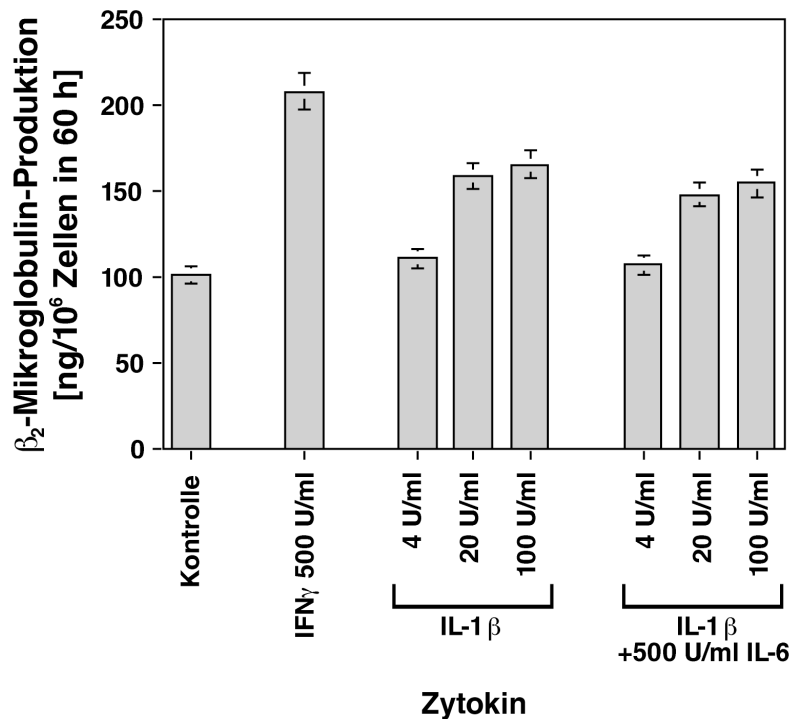


Fig. 4.4.2.c: Einfluss von IL-1 $\beta$ , IFN $\gamma$  und IL-6 auf die  $\beta_2$ M-Konzentration in HuH7-Zellkulturüberständen im ELISA

Die Zellen wurden nach Passage in serumhaltigem Kulturmedium bis zur Subkonfluenz kultiviert und anschließend nach einem Mediumwechsel (DMEM/F-12 + 0,2 % BSA) direkt mit den Zytokinen IL-1 $\beta$ , IFN $\gamma$  und IL-1 $\beta$  + IL-6 in den wie oben gezeigten, aufsteigenden Konzentrationen für 60 h inkubiert. Nach Ende der Inkubation wurden die Kulturüberstände abgenommen und die Zellen nach Trypsinisierung gezählt. Die asservierten Überstände wurden parallel mit Standardproben in Doppelbestimmungen im  $\beta_2$ M-ELISA gemessen. Es erfolgte die Umrechnung der  $\beta_2$ M-Konzentration in Bezug auf 1 x 10<sup>6</sup> Zellen.

Der positive Einfluss von IL-1 $\beta$  auf die  $\beta_2$ M-Konzentration in den Überständen der HuH7-Zellen zeigte eine direkte Dosis-Wirkungsbeziehung (siehe Fig. 4.4.2.c). Dabei war die maximale Stimulation bei steigender Dosis von IL-1 $\beta$  bei 20 U/ml erreicht. Die Kombination von IL-1 $\beta$  in aufsteigenden Konzentrationen mit 500 U/ml IL-6 ergab

keinen additiven Effekt auf die  $\beta_2$ M-Konzentration im Vergleich zum Konzentrationsanstieg bei ausschließlicher Stimulation mit IL-1 $\beta$ .

#### 4.4.3 Einfluss von Zytokinen auf die $\beta_2$ M-Protein-Konzentration in Kulturüberständen von Jurkat-Zellen

##### 4.4.3.1 Qualitative Konzentrationsbestimmung von $\beta_2$ M in Medium von Jurkat-Zellen – *Immuno Blot*

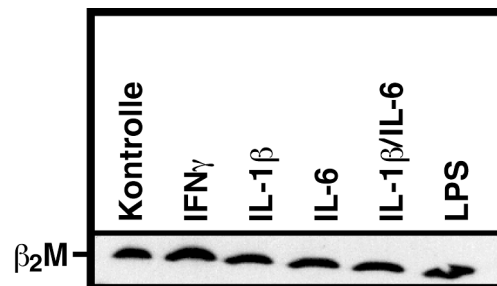


Fig. 4.4.3.a: Einfluss von IFN $\gamma$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 und LPS auf die  $\beta_2$ M-Konzentration im Kulturmedium von Jurkat-Zellen im *Immuno Blot*

Nach Passage wurden die Zellen direkt mit einer Zelldichte von  $10^6$  Zellen/ml in RPMI 1640 + 0,2 % BSA aufgenommen und mit IL-1 $\beta$  [100 U/ml], IFN $\gamma$  [500 U/ml], IL-6 [500 U/ml] und IL-1 $\beta$  [100 U/ml] + IL-6 [500 U/ml] sowie LPS [25 ng/ml] für 60 h inkubiert. Nach Ende der Stimulation wurden die Zellen durch Zentrifugation aus der Suspension entfernt und die Überstände über SDS-PAGE aufgetrennt. Nach Übertragung der Proteine auf eine PVDF-Membran erfolgte die spezifische Detektion von  $\beta_2$ M mit einem Antikörper.

Auch im *Immuno Blot* von Jurkat-Zellkulturüberständen zeigte sich die zuvor beschriebene Erhöhung der  $\beta_2$ M-Konzentration durch Stimulation mit IFN $\gamma$ . Die Zytokine IL-1 $\beta$  und IL-6 haben sowohl bei alleinigem Einsatz als auch bei ihrer Kombination keinen Einfluss auf die  $\beta_2$ M-Konzentration im Überstand von Jurkat-

Zellen. LPS stellt hier ebenso keinen Stimulus für eine  $\beta_2$ M-Freisetzung dar (Fig. 4.4.3.a).

#### 4.4.3.2 Quantitative Konzentrationsbestimmung von $\beta_2$ M im Medium von Jurkat-

Zellen – ELISA

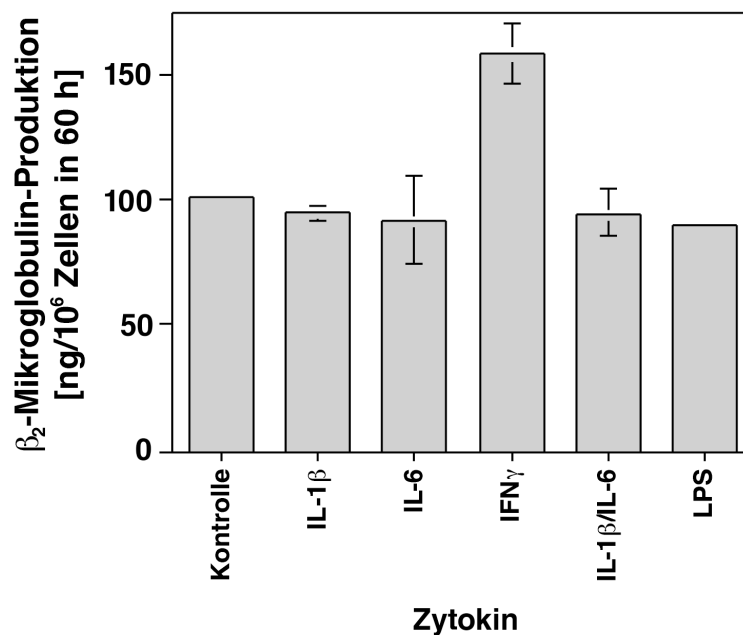


Fig. 4.4.3.b: Einfluss verschiedener Zytokine auf die  $\beta_2$ M-Proteinsynthese in Jurkat-Zellen, gemessen im  $\beta_2$ M-ELISA

Die Zellen wurden nach Passage in serumfreiem Kulturmedium [0,2 % BSA] mit einer Zelldichte von  $3 \times 10^6$  Zellen pro *Well* vorkultiviert. Nach 24 h erfolgte die Inkubation mit den Zytokinen IL-1 $\beta$  [100 U/ml], IFN $\gamma$  [500 U/ml], IL-6 [500 U/ml] und IL-1 $\beta$  [100 U/ml] + IL-6 [500 U/ml] sowie LPS [25 ng/ml]. Nach 60 h wurden die Zellen abzentrifugiert und die Überstände abgenommen. Die asservierten Überstände wurden parallel mit Standardproben im  $\beta_2$ M-ELISA gemessen. Die  $\beta_2$ M-Konzentration wird in Bezug auf  $1 \times 10^6$  Zellen angegeben.

Durch Inkubation der Jurkat-Zellen mit IFN $\gamma$  ergab sich in wiederholten Versuchen ein um 50 % erhöhter  $\beta_2$ M-Spiegel in den Überständen. Die Zytokine IL-1 $\beta$  und IL-6

hatten sowohl alleine als auch in Kombination keinen positiven Einfluss auf die  $\beta_2$ M-Konzentration relativ zu den Negativkontrollen bei Jurkat-Zellen (Fig 4.4.3.b).

#### 4.4.4 Einfluss von Zytokinen auf die $\beta_2$ M-Protein-Konzentration in Kulturüberständen von MonoMac6-Zellen

##### 4.4.4.1 Qualitative Konzentrationsbestimmung von $\beta_2$ M im Medium von MonoMac6-Zellen – *Immuno Blot*

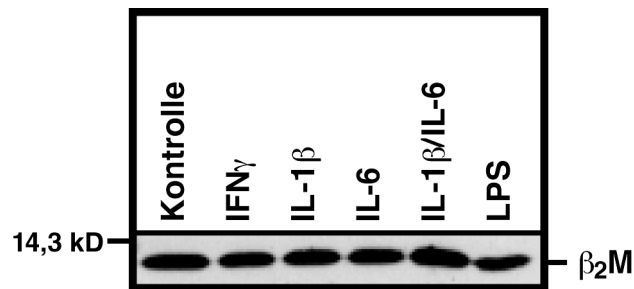


Fig. 4.4.4.a: Einfluss von  $\text{IFN}\gamma$ ,  $\text{IL-1}\beta$ ,  $\text{IL-6}$  und  $\text{LPS}$  auf die  $\beta_2$ M-Konzentration im Kulturmedium von MonoMac6-Zellen

Nach Passage der Zellen wurden diese direkt mit einer Zelldichte von  $10^6$  Zellen/ml in RPMI 1640 + 0,5 % FCS aufgenommen und mit  $\text{IL-1}\beta$  [100 U/ml],  $\text{IFN}\gamma$  [500 U/ml],  $\text{IL-6}$  [500 U/ml] und  $\text{IL-1}\beta$  [100 U/ml] +  $\text{IL-6}$  [500 U/ml] sowie  $\text{LPS}$  [25 ng/ml] für 60 h inkubiert. Nach Ende der Stimulation wurden die Zellen durch Zentrifugation aus der Suspension entfernt und die Überstände über SDS-PAGE aufgetrennt. Nach Übertragung der Proteine auf eine PVDF-Membran erfolgte die spezifische Detektion von  $\beta_2$ M mit einem Antikörper.

In den Kulturüberständen der MonoMac6-Zellen zeigte sich im *Immuno Blot* nach 60-stündiger Inkubation mit den jeweiligen Stimulatoren keine Konzentrationsveränderung von  $\beta_2$ M im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle. Auch ein bei den bisher untersuchten Zelllinien beobachteter positiver Effekt von  $\text{IFN}\gamma$  ist in MonoMac6-Zellen nicht zu beobachten. Kontakt mit  $\text{LPS}$ , der beim Dialyseverfahren

durch Verunreinigungen des Dialysates vorkommen kann, führt in MonoMac6-Zellen zu keiner Konzentrationserhöhung im Medium (siehe Fig. 4.4.4.a).

#### 4.4.4.2 Quantitative Konzentrationsbestimmung von $\beta_2$ M im Medium von MonoMac6-Zellen – ELISA

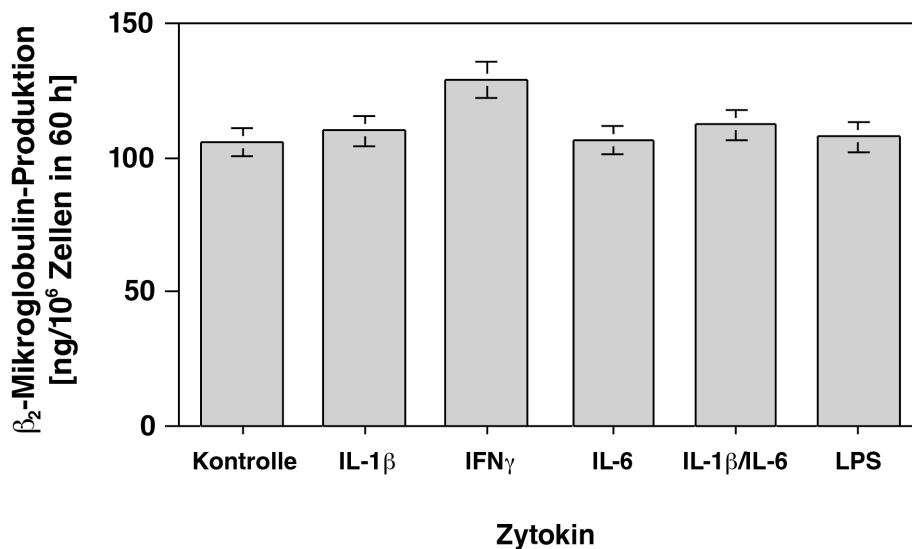


Fig. 4.4.4.b: Einfluss verschiedener Zytokine auf die  $\beta_2$ M-Proteinsynthese in MonoMac6-Zellen im  $\beta_2$ M-ELISA

Die Zellen wurden nach Passage in Kulturmedium inkl. 0,5 % FCS aufgenommen und mit einer Zelldichte von  $10^6$  Zellen/ml 24 h vorkultiviert. Anschließend erfolgte die Inkubation mit den Zytokinen (IL-1 $\beta$  [100 U/ml], IFN $\gamma$  [500 U/ml], IL-6 [500 U/ml] + IL-1 $\beta$  + IL-6 [100/500 U/ml]) sowie LPS [25 ng/ml]. Nach 60 h Inkubation wurden die Zellen durch Zentrifugation pelletiert und die Überstände im  $\beta_2$ M-ELISA gemessen. Die  $\beta_2$ M-Konzentration wird in Bezug auf  $1 \times 10^6$  Zellen angegeben.

Die MonoMac6-Überstände wurden im  $\beta_2$ M-ELISA gemessen. In den quantitativen Bestimmungen ergab sich für keines der eingesetzten Zytokine ein wesentlicher stimulatorischer Effekt auf  $\beta_2$ M im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle. IFN $\gamma$  zeigte in der quantitativen Bestimmung einen minimalen Effekt mit ca. 15 % mehr  $\beta_2$ M im

Überstand. Auch der Zusatz von LPS führte - wie im *Immuno Blot* beobachtet - nicht zu einer Konzentrationsänderung von  $\beta_2$ M (Fig. 4.4.4.b).

#### 4.4.5 Einfluss von Lipopolysacchariden auf die $\beta_2$ M-Protein-Konzentration in Kulturüberständen primärer Monozyten

##### 4.4.5.1 Qualitative Konzentrationsbestimmung von $\beta_2$ M im Medium von primären Monozyten – *Immuno Blot*

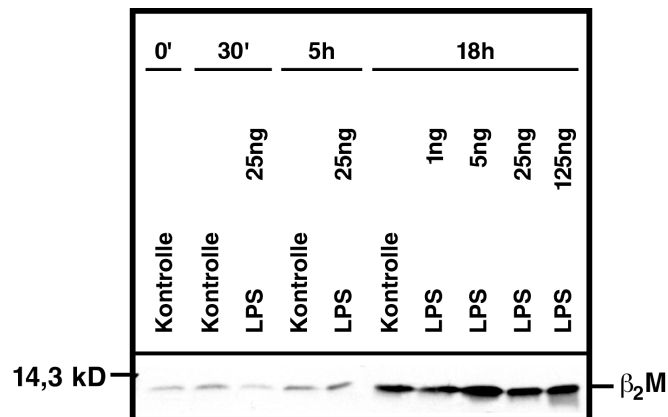


Fig. 4.4.5.a: Einfluss von LPS auf die  $\beta_2$ M-Konzentration in Kulturüberständen primärer Monozyten im *Immuno Blot*

Die Monozyten wurden über wie beschrieben isoliert und mit einer Zelldichte von  $2 \times 10^6$  Zellen/ml in PTFE-beschichteten Foliensäckchen kultiviert. Die Zellen wurden zu je 5 ml mit Lipopolysacchariden (LPS) stimuliert. Die Inkubation begann 5 h nach Isolierung der Zellen, die Dauer der Inkubation wurde zwischen 0 h und 18 h variiert, wobei die Dosis des LPS bei 18-stündiger Stimulation von 1 ng/ml bis zu 125 ng/ml gesteigert wurde. Zeitgleich mit den jeweiligen Messpunkten wurden unstimulierte Negativkontrollen hergestellt. Nach Beendigung der Inkubation wurden die Zellen abzentrifugiert und die Kulturüberstände asserviert. Die Überstände wurden SDS-gelelektrophoretisch aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran übertragen. Anschließend erfolgte die qualitative Detektion von  $\beta_2$ M durch Antikörper mittels Chemiluminiszenz.

Zur abschließenden Klärung, ob Kontakt zu LPS zu einer  $\beta_2$ M-Freisetzung aus Monozyten führen kann, wurden primäre Monozyten aus Spenderblut mit LPS inkubiert. Die Überstände der primären Blutmonozyten wurden elektrophoretisch aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran transferiert. Über die Dauer der Inkubation zeigt sich eine Akkumulation von  $\beta_2$ M im Kulturmedium, erkennbar an der zunehmenden Bandenstärke. Dies spricht für eine unspezifische Freisetzung, wie sie auch in den Immunpräzipitationsexperimenten beobachtet werden konnte.

Die Detektion von  $\beta_2$ M im *Immuno Blot* ergab keinen signifikanten positiven Einfluss von LPS auf die Freisetzung des  $\beta_2$ M ins Medium der primären Monozyten (Fig. 4.4.5.a).

#### 4.4.5.2 Quantitative Konzentrationsbestimmung von $\beta_2$ M in Medium primärer Monozyten – ELISA

Die Messergebnisse aus Überständen der primären Monozyten mittels *Immuno Blots* konnten in den ELISA-Messungen bestätigt werden. Die Inkubation der humanen Blutmonozyten mit LPS bis zu einer Konzentration von max. 125 ng/ml hat zu keinem der Messzeitpunkte einen Einfluss auf die Synthese oder Freisetzung von  $\beta_2$ M ergeben (Fig. 4.4.5.b).

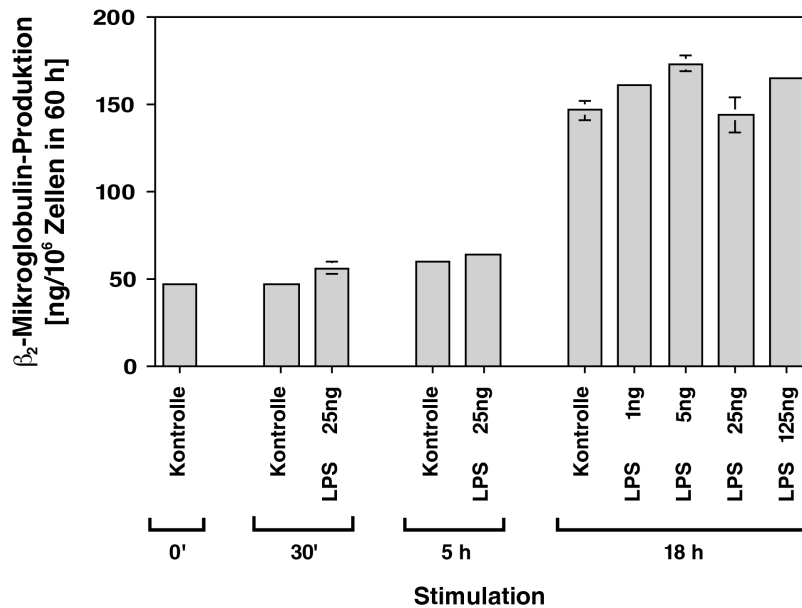


Fig. 4.4.5.b: Einfluss von LPS auf die  $\beta_2$ M-Konzentration in Kulturüberständen primärer Monozyten, gemessen im  $\beta_2$ M-ELISA

Die Monozyten wurden über Ficoll- und Percoll-Gradienten aus dem *Buffy Coat* isoliert und in Teflonbeschichteten Foliensäckchen kultiviert. Die Zellen wurden zu je 5 ml mit einer Zelldichte von  $2 \times 10^6$  Zellen/ml in den Säckchen mit Lipopolysacchariden (LPS) stimuliert. Die Inkubation begann 5 h nach Isolierung der Zellen, die Dauer der Inkubation wurde zwischen 0 h und 18 h variiert, wobei die Dosis des LPS von 1 ng/ml bis zu 125 ng/ml gesteigert wurde. Zeitgleich mit den jeweiligen Messpunkten wurden unstimulierte Negativkontrollen hergestellt. Nach Beendigung der Inkubation wurden die Zellen abzentrifugiert und die Kulturüberstände asserviert. Die  $\beta_2$ M-Spiegel wurden im ELISA parallel mit Standardproben in Doppelbestimmungen gemessen. Die  $\beta_2$ M-Konzentration wird in Bezug auf  $1 \times 10^6$  Zellen angegeben.

## 4.5 Zusammenfassung der Ergebnisse

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass in den untersuchten Zelllinien und primären humanen Zellen kein Effekt der Zytokine IL-1 $\beta$  und IL-6 auf die verschiedenen Zellsysteme zu beobachten ist. Lediglich die Zugabe von IL-1 $\beta$  in das Kulturmedium der HuH7-Zellen führt zu einem leichten, in verschiedenen Versuchsansätzen reproduzierbaren Anstieg der  $\beta_2$ M-Produktion.

Bei den aus dem peripheren Blut stammenden Zelllinien, bei denen direkter Kontakt mit verunreinigendem LPS während einer HD möglich wäre, führte die Inkubation jedoch zu keiner nachweisbaren Konzentrationserhöhung.

In allen durchgeführten Experimenten zeigte sich in den eingesetzten Zelllinien der bereits publizierte stimulatorische Effekt der Interferone auf die *de novo*-Synthese und Freisetzung des  $\beta_2$ M und des MHC.

4.6 Ergebnisse für  $\beta_2$ M-Expression in tabellarischer Form

		Methode				
		Zytokin	Northern Blot	Immunpräzipitation	Immuno Blot	ELISA
Zelltyp	HepG2	IL-1 $\beta$	-	-	-	-
		IFN $\alpha$	+	+	+	+
		IFN $\gamma$	+	+	+	+
		IL-6	-	-	-	-
		IL-1 $\beta$ + IL-6	-	-	-	-
		LPS-kond. M $\Phi$ -Ü.	-	-	-	-
	HuH7	IL-1 $\beta$	(+)	(+)	(+)	(+)
IFN $\alpha$		+	+	+	+	
IFN $\gamma$		+	+	+	+	
IL-6		-	-	-	-	
IL-1 $\beta$ + IL-6		-	-	-	-	
LPS-kond. M $\Phi$ -Ü.		-	-	-	-	
Jurkat	IL-1 $\beta$	-	-	-	-	
	IFN $\alpha$	+	+	+	+	
	IFN $\gamma$	+	+	+	+	
	IL-6	-	-	-	-	
	IL-1 $\beta$ + IL-6	-	-	-	-	
	LPS-kond. M $\Phi$ -Ü.	-	-	-	-	
Monomac6	IL-1 $\beta$	-	-	-	-	
	IFN $\alpha$	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	
	IFN $\gamma$	-	+	+	+	
	IL-6	-	-	-	-	
	IL-1 $\beta$ + IL-6	-	-	-	-	
	LPS	-	-	-	-	
Monozyten (primär)	LPS	-	n.d.	-	-	
Synoviozyten (primär)	IL-1 $\beta$	-	-	-	-	
	OSM	-	n.d.	n.d.	n.d.	
	IL-6+gp80	-	-	-	-	
	IL-1 $\beta$ +IL-6+gp80	-	-	-	-	

Tab. 4.6: Zusammenstellung aller Ergebnisse auf mRNA- und Protein-Ebene für  $\beta_2$ M in tabellarischer Form

[+] = positiver Einfluss auf  $\beta_2$ M (mRNA/Protein); [-] = kein Einfluss; n.d. = nicht durchgeführt; M $\Phi$  = Makrophagen



## 5 Diskussion

In der wissenschaftlichen Literatur werden verschiedene Mechanismen für die Pathogenese der  $\beta_2$ M-Amyloidose bei Patienten mit terminaler Niereninsuffizienz diskutiert:

1. Die erhöhte Synthese und Freisetzung von  $\beta_2$ M aus Zellen des peripheren Bluts aufgrund von Bioinkompatibilität der Oberflächen der verwendeten Dialysemembranen (Jahn 1991; Paczek 1990; Schoels 1993),
2. Die verminderte renale *Clearance* durch eingeschränkte Eliminationsmechanismen der erkrankten Nieren und die unterschiedlichen Kapazitäten der Membranen zur Elimination oder Absorption von  $\beta_2$ M aus dem Blut der dialysierten Patienten,
3. Die verstärkte Bereitschaft zur Polymerisation von  $\beta_2$ M zu Amyloid-Fibrillen nach Freisetzung und Prozessierung durch Proteasen oder reaktivem Sauerstoff aus bei der Dialyse aktivierten Granulozyten. (Hakim 1993),
4. Die Freisetzung von Zytokinen durch Zellen des Immunsystems bei Dialysemembran-Inkompatibilitäten oder Bioinkompatibilität von Lösungen zur

Peritonealdialyse als einen Stimulator der  $\beta_2$ M-Synthese (Bingel 1986; Laude-Sharp 1990; Descamps-Latscha 1995; Libetta 1996; Memoli 1992; Pereira und Dinarello 1994).

5. Darüber hinaus gibt es Hinweise, dass in synovialen Gewebe produzierte Interleukine (IL-1 und IL-6) zusammen mit Dialyse-induziertem Amyloid lokal für die ausgeprägten Beschwerden der  $\beta_2$ M-Amyloidose, wie zum Beispiel beim HD-assoziierten Carpal-Tunnel-Syndrom verantwortlich sind (Iida, 1994; Miyasaka 1992; Miyata 1996a, 1996b).

In der vorliegenden Arbeit sollte zur Klärung der Pathogenese der  $\beta_2$ M-Amyloidose die Rolle von proinflammatorischen Zytokinen bei der erhöhten Produktion oder Freisetzung von  $\beta_2$ M untersucht werden. Hierzu sollten die Untersuchungen auf die Zellen der zellulären Abwehr, wie Monozyten und Lymphozyten, sowie auf Zellen, die nicht direkt mit den Dialysematerialien (Membranen, Dialysat) in Kontakt treten, wie beispielsweise der Leber oder Bindegewebszellen, fokussiert werden.

In vielen klinischen Untersuchungen wurde demonstriert, dass es während der HD zu relevanten Veränderungen der Zytokinkonzentrationen und -zusammensetzung im Serum chronisch-niereninsuffizienter Patienten kommt (Carreno 1997; Herbelin 1990; Luger 1987; Mege 1991; Pertosa 1993).

In Untersuchungen von Agostini *et al.* konnte beobachtet werden, dass es zur Aktivierung der Komplementkaskade an den Oberflächen der Membranen, insbesondere bei Verwendung von Cuprammoniumsulfat-Membranen (Cuprophan®), kommt (Agostini und Gardinali 1989). Die Adhärenz und subsequente Aktivierung der Makrophagen und die damit verbundene Freisetzung der proinflammatorischen Zytokine wurde ebenfalls in verschiedenen Experimenten bewiesen (Luger 1987; Memoli 1992; Pertosa 1993). Dies zeigt eindeutig eine Rekrutierung des Interleukin-Systems bei HD, an deren Ende IL-6 als Effektor-Zytokin wesentliche Akute-Phase-Reaktionen aktiviert.

Andere Autoren postulieren, dass es durch die Urämie *per se* zu erhöhten Zytokin-Serumspiegeln kommen könnte (Pereira und Dinarello 1994; Powell 1991). Durch weitere Stimuli, wie bioinkompatible Dialysemembranen, oder durch den aus Dialyseflüssigkeiten übertretende Endotoxinen kommt es dann zu einer weiteren

Steigerung der Spiegel für IL-6, IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$  und anderer monozytärer Zytokine (Herbelin 1991; Mege 1991, 1996; Memoli 1992; Pereira 1994; Pertosa 1993, 1995; Vaziri 1994). Die erhöhten Zytokinkonzentrationen und die gesteigerte Immunantwort können für die, bei chronisch hämodialysierten Patienten oft beobachtete, Immundefizienz verantwortlich gemacht werden (Descamps-Latscha 1995).

In der Literatur findet man jedoch ebenso die Beobachtungen einer ausbleibenden Induktion von Zytokinen oder sogar erniedrigten Zytokinspiegeln (Bingel 1988; Engelberts 1994; Paczek 1991) in Anschluss von extrakorporalen Eliminationsverfahren. Diese wären durch eine vermehrte Elimination der Proteine während des Hämodialyseverfahrens erklärbar. Andererseits wird hier eine verzögerte und chronische Antwort des Immunsystems auf die Dialysemembranen vermutet, so dass es im Intervall zwischen den HD zu erhöhten Interleukin-Spiegeln kommt, die in den entsprechenden, an die HD zeitlich nahen Messungen nicht erfasst wurden. Des Weiteren werden innerhalb einer laufenden chronischen Nierenersatztherapie Unterschiede im Zytokinprofil beobachtet (Hayakawa 1994; Zaoui 1990).

In den meisten Studien konnte eine signifikante Korrelation zwischen den erhöhten Entzündungsmediatoren und den erhöhten  $\beta_2$ M-Plasmaspiegel gezeigt werden.

IL-6 ist als sehr potenter Induktor der Akuten-Phase-Proteine in der Leber bekannt und könnte ebenso für die Synthese von  $\beta_2$ M als weiteres Akute-Phase-Protein in der Leber, dem zellulären Immunsystem oder anderer Organe verantwortlich sein.

In den durchgeführten Experimenten wurden Zelllinien aus der Leber (HepG2, HuH7) und aus dem mononukleären System (Jurkat, MonoMac6) als Modelle für die entsprechenden Organe sowie aus Spenderblut (*Buffy Coat*) isolierte Monozyten und primäre Synoviozyten-Kulturen untersucht.

Die Zellen wurden unter Kulturbedingungen mit rekombinantem IL-6 und IL-1 $\beta$  inkubiert. Unter diesen Umständen konnte die isolierte Wirkung der verwendeten Zytokine auf die *de novo*-Synthese von  $\beta_2$ M bzw. die Freisetzung aus zellulären Speichern der klonalen Zellen untersucht werden. Störende oder additive Einflüsse, die bei Untersuchungen *in vivo* auftreten können, wurden unter diesen Bedingungen minimiert. Nach Beendigung der Inkubation über variierte Zeitintervalle und

Konzentrationen wurde der Einfluss durch Analyse von  $\beta_2$ M-mRNA und  $\beta_2$ M-Protein mittels verschiedener Methoden untersucht.

Durch den qualitativen Vergleich der entsprechenden mRNA im *Northern Blot* konnte der Einfluss der Monokine auf die Transkription des  $\beta_2$ M-Gens evaluiert werden. Die Untersuchungstechnik der Immunpräzipitation ermöglichte nach radioaktiver Markierung aller neu synthetisierten Zellproteine sowohl die Abschätzung der *de novo*-Synthese als auch der Freisetzung von  $\beta_2$ M. Durch einen *Immuno Blot* konnte freies  $\beta_2$ M in Kulturüberständen detektiert werden, mittels ELISA konnte  $\beta_2$ M quantifiziert werden.

Unsere Ergebnisse sprechen klar gegen einen direkten Einfluss von IL-6 oder IL-1 $\beta$  auf die Regulation des zellulären  $\beta_2$ M-Haushaltes in den verschiedenen untersuchten Zellsystemen. Weder die Inkubation der Zelllinien noch die Inkubation primärer Zellkulturen ergaben einen wesentlichen stimulatorischen Effekt von IL-1 $\beta$  und IL-6 auf die  $\beta_2$ M-Regulation. In allen untersuchten Zelltypen waren die ermittelten  $\beta_2$ M-Antworten auf RNA- oder Proteinebene nicht stärker als die der unstimulierten Kontrollen. Ebenso ergaben die Experimente keinen Hinweis auf einen positiven stimulatorischen Effekt von LPS auf die  $\beta_2$ M-Konzentration in Zellen des peripheren Blutes. Ein direkter Effekt auf die Pathogenese der  $\beta_2$ M-Amyloidose durch Übertritt von verunreinigenden Bakterienfragmenten ins Blut der Patienten ist somit auch unwahrscheinlich.

Durch Einsatz LPS-konditionierter Monozyten-Überstände konnte ein möglichst natürliches Zytokinprofil aus Monozyten nach Kontakt mit körperfremden Materialien simuliert werden. Die konditionierten Medien ergaben in den durchgeführten Proliferationstests für IL-1 und IL-6 eine regelrechte Zytokinsynthese als Zeichen einer effektiven Antwort auf die Zugabe von LPS. Eine Inkubation dieser Medien mit den Zielzellen zeigte jedoch in den von uns durchgeführten Experimenten, dass auch eine *in vivo*-ähnliche Kombination zahlreicher Zytokine aus Makrophagen keinen Einfluss auf den  $\beta_2$ M-Haushalt hat.

Auch die Exposition primärer Synoviozyten-Kulturen gegenüber IL-6 unter Addition des löslichen IL-6-Rezeptors ergab keinen Hinweis auf einen regulatorischen Effekt auf die  $\beta_2$ M-Expression in Abhängigkeit von IL-6.

Unsere Daten sprechen deutlich gegen einen direkten stimulatorischen Einfluss von Monokinen auf die  $\beta_2$ M-Serumkonzentration bei Patienten unter Langzeit-Hämodialyse-Behandlung mit bioinkompatiblen Dialysemembranen.

Durch die erhobenen Daten wird die Hypothese, dass zwischen einer erhöhten Zytokinproduktion in Folge der Hämodialyse und der Pathogenese der  $\beta_2$ M-Amyloidose eine Kausalität besteht, nicht bestätigt.

Die Ergebnisse von Homma *et al.* hinsichtlich einer erhöhten  $\beta_2$ M-Sekretion als Antwort auf einen IL-6-Stimulus in Leberzelllinien konnte in unseren Experimenten mit der gleichfalls verwendeten Zelllinie HuH7 nicht reproduziert werden (Homma 1992). In den Experimenten dieser Arbeit wurden lediglich veränderte  $\beta_2$ M-Proteinkonzentrationen als Antwort auf IL-6 gemessen. Die Ergebnisse unserer Arbeit widersprechen mit Blick auf die ausführlichen Untersuchungen der *de novo*-Synthese und Freisetzung den von Homma *et al.* veröffentlichten Ergebnissen. Lediglich ein schwacher reproduzierbarer Einfluss von IL-1 $\beta$  bei HuH7-Zellen konnte in unseren Messungen detektiert werden. Hierüber gibt es in der internationalen Literatur keine weiteren Veröffentlichungen. Dieser Effekt ist allerdings nur sehr schwach ausgeprägt und kann keinen entscheidenden Einfluss auf die Entstehung einer  $\beta_2$ M-Amyloidose haben.



## 6 Ausblick

Die vorliegenden Ergebnisse lassen darauf schließen, dass ein direkter Einfluss der proinflammatorischen Zytokine auf die  $\beta_2$ M-Produktion nicht existiert. Es kann jedoch mit Blick auf die von uns erhobenen Daten nicht ausgeschlossen werden, dass Zytokine in der Endphase der Amyloidogenese eine Rolle spielen.

$\beta_2$ M und die daraus gebildeten Amyloid-Fibrillen unterliegen weiteren Prozessen. Eine enzymunabhängige Glykosylierung (Maillard-Reaktion) des Amyloids zu so genannten *Advanced Glycation End Products* (AGE) führt zu einer Verfremdung der antigenen Struktur der  $\beta_2$ M-Fibrillen (Miyata 1993, 1994, 1995). Sie könnten durch ihre molekularen Veränderungen zu einer weiteren erhöhten Produktion von proinflammatorischen Zytokinen aus gewebeständigen Makrophagen verursachen. Hier käme es zu einer lokalisierten Immunantwort kommen. Eine parakrine Sekretion von Zytokinen könnte zur weiteren Unterhaltung des lokalen chronisch-entzündlichen Prozesses im Bereich der osteoartikulären Strukturen führen. Hierbei könnte IL-6 als effektiver Stimulator der Osteoklasten eine entscheidende Rolle bei der Zerstörung der Knochenmatrix spielen (Iida 1994; Miyata 1996a, 1996b).

In unseren Experimenten konnten wir Interferone als potente Induktoren sowohl des  $\beta_2$ M als auch des HLA-Komplexes als positive Kontrolle für eine erfolgreiche  $\beta_2$ M-Induktion einsetzen. In den durchgeführten Versuchen zeigte sich nach Inkubation mit  $\text{IFN}\alpha$  oder  $\text{IFN}\gamma$  sowohl bei den Hepatozyten-Zelllinien und als auch bei der lymphozytären Zelllinie Jurkat ein deutlicher Anstieg der  $\beta_2$ M-*de novo*-Synthese und eine erhöhte Sekretion in das Kulturmedium. Dieser Effekt des Interferons im Rahmen der zellulären Immunabwehr ist seit 1978 bekannt und in zahlreichen Publikationen untersucht und beschrieben (Fellous 1979, 1982; Heron 1978; Hokland 1981; Lonergan 1993; Nachbaur 1988a, 1988b; Ramadori 1988; Wallach 1982).

Eine erhöhte Interferon-Aktivität durch Bioinkompatibilität könnte auch für die erhöhten  $\beta_2$ M-Spiegel mit konsekutiver Entwicklung einer Amyloidose bei chronisch hämodialysierten Patienten postuliert werden. Bisher sind jedoch zu dieser Hypothese keine Untersuchungen durchgeführt worden. Eine erhöhte Produktion von  $\text{IFN}\gamma$  ist Ausdruck einer erhöhten TH1-CD4-positiven T-Lymphozyten-Aktivität, wie sie z. B. auch im Rahmen von hyperergen und allergischen Reaktionen zu beobachten ist. Sollte eine erhöhte Aktivierung des Interferon-Systems für die  $\beta_2$ M-Spiegel verantwortlich sein, müsste ebenso bei diesen Patienten eine Differenzierung der CD4-positiven T-Lymphozyten zum TH1-Phänotyp zu beobachten sein. Insbesondere müsste dies der Fall sein, wenn Dialyse-Membranen benutzt werden, die bioinkompatibel sind (Paul und Seder 1994; Rincón 1997; Rincón und Flavell 1997).

Zur Beantwortung dieser Fragestellung wären weitere Studien notwendig. Zellkulturexperimente, in denen monozytäre und lymphozytäre Zelllinien oder primäre Zellen zu Dialysemembranen in Kontakt gebracht werden, könnten Aufschluss darüber geben, ob es nach Exposition *in vitro* zu einer vermehrten Produktion der Interferone kommt. *Ex vivo*-Messungen von Zellen hämodialysierter Patienten könnten zeigen, ob es während einer chronischen Hämodialysebehandlung zu Veränderungen im Interferonmuster des peripheren Blutes im Vergleich zu einer Referenzpopulation gibt. Eine Immunphänotypisierung der Lymphozytenpopulationen oder Messung intrazellulärer Interferon-Expression mittels FACS-Analyse ergäben hier Hinweise auf einen Einfluss des Dialyseverfahrens auf die immunkompetenten Zellen und deren Produktion von Interferonen. In Untersuchungen von Grooteman *et*

a/. konnte ein Einfluss verschiedener Membranmaterialien auf die Lymphozytenuntergruppen dokumentiert werden (Grooteman 1996).

Durch die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit konnte die Hypothese, dass im Wesentlichen monozytäre Zytokine für die Pathogenese der  $\beta_2$ M-Amyloidose verantwortlich sind widerlegt werden. Zur Klärung der pathogenetischen Faktoren der  $\beta_2$ M-Amyloidose sind weitere Studien erforderlich. Eine genauere Begutachtung des lymphozytären Systems könnte hier entscheidende Hinweise geben (Jahn 1991).

In den bisher erfolgten klinischen Studien und Untersuchungen war es immer schwer, zwischen der Bedeutung der Induktion der  $\beta_2$ M-Produktion durch Bioinkompatibilität der Dialysemembranen und einer verringerten renalen Elimination von  $\beta_2$ M über die verschiedenen artifiziellen Membranen zu differenzieren. Hier konnten durch die Etablierung von *in vitro*-Dialyseverfahren unbekannte *in vivo* Einflüsse eliminiert werden und die entscheidenden Eigenschaften der Membranmaterialien untersucht werden. In den letzten Jahren sind dadurch wesentliche Fortschritte in der Entwicklung neuer Membranmaterialien erzielt worden. Einerseits war es möglich, Membranen mit erhöhtem Durchsatz für renal eliminierte Substanzen zu finden (*High Flux Membranes*), andererseits konnten durch die Einführung von Testverfahren zur Biokompatibilität die Materialien für den Kontakt mit Blutkompartimenten optimiert werden. Durch den Einsatz moderner Dialyseverfahren und -materialien kann die Latenz bis zur Manifestation der HD-assoziierten Amyloidose verlängert werden (Floege 1992). Für die betroffenen Patienten bedeutet dies eine verbesserte Lebensqualität bis zum Transplantation eines geeigneten Spenderorgans.



## 7 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde in verschiedenen Zellsystemen die Produktion des  $\beta_2$ M in Abhängigkeit von monozytären Zytokinen untersucht. Die für das Projekt formulierte Hypothese, dass IL-1 $\beta$  und IL-6 als wesentliche Vertreter dieser Gruppe von Zytokinen im Rahmen einer Bioinkompatibilität für eine Induktion der  $\beta_2$ M-Produktion in humanen Zellen verantwortlich sein könnten, wurde nicht bestätigt. In keinem der durchgeführten Experimente zeigte sich ein wesentlicher Einfluss der Interleukine IL-1 und IL-6.

Die Experimente demonstrierten jedoch die Interferone als bekannt potente Induktoren der  $\beta_2$ M-Produktion in den untersuchten Zellsystemen. Studien zur Rolle der Interferone und des lymphozytären Zellsystems könnten weitere Erkenntnisse über die Pathogenese der  $\beta_2$ M-Amyloidose geben.



## 8 Literaturverzeichnis

Aarden, L. A., De, G. E., Schaap, O. L. und Lansdorp, P. M. (1987). *Production of Hybridoma Growth Factor by Human Monocytes*. European Journal Immunology 17(10): 1411-1416.

Aden, D. P., Fogel, A., Plotkin, S., Damjanov, I. und Knowles, B. B. (1979). *Controlled Synthesis of HBsAg in a Differentiated Human Liver Carcinoma-Derived Cell Line*. Nature 282(5739): 615-616.

Agostoni, A. und Gardinali, M. (1989). *Complement Activation During Hemodialysis*. Journal of Biomaterials Applications 4(2): 102-122.

Algranati, I. D., Milstein, C. und Ziegler, A. (1980). *Studies on Biosynthesis, Assembly and Expression of Human Major Transplantation Antigens*. European Journal of Biochemistry 103(1): 197-207.

- Anderson, J., Briefel, G., Jones, J. M., Ryu, J. H., McGuire, M. und Yun, Y. P. (1991). *Effects of Acetate Dialysate on Transforming Growth Factor Beta-1, Interleukin, and Beta-2-Microglobulin Plasma Levels*. *Kidney International* 40(6): 1110-1117.
- Andus, T., Heinrich, P. C., Castell, J. C. und Gerok, W. (1989). *Interleukin-6: A Key Hormone of the Acute Phase Reaction*. *Deutsche Medizinische Wochenschrift* 114(44): 1710-1716.
- Arce-Gomez, B., Jones, E. A., Barnstable, C. J., Solomon, E. und Bodmer, W. F. (1978). *The Genetic Control of HLA-A and B Antigens in Somatic Cell Hybrids: Requirement for Beta-2-Microglobulin*. *Tissue Antigens* 11(2): 96-112.
- Arcone, R., Pucci, P., et al. (1991). *Single-Step Purification and Structural Characterization of Human Interleukin-6 Produced in Escherichia Coli from a T7 RNA Polymerase Expression Vector*. *European Journal of Biochemistry* 198(3): 541-547.
- Arnaout, M. A., Hakim, R. M., Todd, R. F. D., Dana, N. und Colten, H. R. (1985). *Increased Expression of an Adhesion-Promoting Surface Glycoprotein in the Granulocytopenia of Hemodialysis*. *New England Journal of Medicine* 312(8): 457-462.
- Baker, S. J. und Reddy, E. P. (1996). *Transducers of Life and Death: TNF Receptor Superfamily and Associated Proteins*. *Oncogene* 12(1): 1-9.
- Bardin, T., Zingraff, J., Kuntz, D. und Druke, T. (1986). *Dialysis-Related Amyloidosis*. *Nephrology, Dialysis, Transplantation* 1(3): 151-154.
- Basile, C. und Druke, T. (1989). *Dialysis Membrane Biocompatibility*. *Nephron* 52(2): 113-118.

- Bataille, R., Grenier, J. und Sany, J. (1984). *Beta-2-Microglobulin in Myeloma: Optimal Use for Staging, Prognosis, and Treatment - a Prospective Study of 160 Patients*. Blood 63(2): 468-476.
- Baz, M., Durand, C., et al. (1991). *Using Ultrapure Water in Hemodialysis Delays Carpal Tunnel Syndrome*. International Journal of Artificial Organs 14(11): 681-685.
- Becker, J. W. und Reeke, G. N., Jr. (1985). *Three-Dimensional Structure of Beta-2-Microglobulin*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 82(12): 4225-4229.
- Berggård, I. und Bearn, A. G. (1968). *Isolation and Properties of a Low Molecular Weight Beta-2-Globulin Occurring in Human Biological Fluids*. Journal Biological Chemistry 243(15): 4095-4103.
- Berner, R., Niemeyer, C. M., et al. (1998). *Plasma Levels and Gene Expression of Granulocyte Colony-Stimulating Factor, Tumor Necrosis Factor-Alpha, Interleukin (IL)-1 Beta, IL-6, IL-8, and Soluble Intercellular Adhesion Molecule-1 in Neonatal Early Onset Sepsis*. Pediatric Research 44(4): 469-477.
- Bernier, G. M. und Fanger, M. W. (1972). *Synthesis of 2-Microglobulin by Stimulated Lymphocytes*. Journal of Immunology 109(2): 407-409.
- Bingel, M., Lonnemann, G., Shaldon, S., Koch, K. M. und Dinarello, C. A. (1986). *Human Interleukin-1 Production During Hemodialysis*. Nephron 43(3): 161-163.
- Bingel, M., Lonnemann, G., Koch, K. M., Dinarello, C. A. und Shaldon, S. (1988). *Plasma Interleukin-1 Activity During Hemodialysis: The Influence of Dialysis Membranes*. Nephron 50(4): 273-276.
- Boehm, U., Klamp, T., Groot, M. und Howard, J. C. (1997). *Cellular Responses to Interferon-Gamma*. Annals Reviews in Immunology 15: 749-795.

- Bonner, W. M. und Laskey, R. A. (1974). *A Film Detection Method for Tritium-Labelled Proteins and Nucleic Acids in Polyacrylamide Gels*. European Journal of Biochemistry 46(1): 83-88.
- Bøyum, A. (1964). *Separation of White Blood Cells*. Nature 204: 793-794.
- Bøyum, A. (1968). *Separation of Leukocytes from Blood and Bone Marrow. Introduction*. Scandinavian Journal of Clinical & Laboratory Investigation - Supplement 97: 7.
- Brakenhoff, J. P., De Groot, E., Evers, R. F., Pannekoek, H. und Aarden, L. A. (1987). *Molecular Cloning and Expression of Hybridoma Growth Factor in Escherichia Coli*. Journal of Immunology 139(12): 4116-4121.
- Brancaccio, D., Ghiggeri, G. M., et al. (1995). *Deposition of Kappa and Lambda Light Chains in Amyloid Filaments of Dialysis-Related Amyloidosis*. Journal of the American Society of Nephrology 6(4): 1262-1270.
- Buck, C., Bundschu, J., Gallati, H., Bartmann, P. und Pohlandt, F. (1994). *Interleukin-6: A Sensitive Parameter for the Early Diagnosis of Neonatal Bacterial Infection*. Pediatrics 93(1): 54-58.
- Campos, L., Vu Van, H., et al. (1984). *Serum Beta-2-Microglobulin in Adult Myeloid Acute Leukemias*. Blut 48(4): 221-226.
- Carreno, M. P., Rousseau, Y., et al. (1997). *Dissociation between Beta-2-Microglobulin and IL-1 Production in Hemodialyzed Patients*. Nephrology, Dialysis, Transplantation 12(11): 2365-2374.
- Castell, J. V., Andus, T., Kunz, D. und Heinrich, P. C. (1989). *Interleukin-6. The Major Regulator of Acute-Phase Protein Synthesis in Man and Rat*. Annals of the New York Academy of Sciences 557: 87-99.

- Castell, J. V., Gomez-Lechon, M. J., David, M., Fabra, R., Trullenque, R. und Heinrich, P. C. (1990). *Acute-Phase Response of Human Hepatocytes: Regulation of Acute-Phase Protein Synthesis by Interleukin-6*. *Hepatology* 12(5): 1179-1186.
- Castiglione, A., Pagliaro, P., et al. (1991). *Flow Cytometric Analysis of Leukocytes Eluted from Haemodialysers*. *Nephrology, Dialysis, Transplantation* 6(Suppl 2): 31-35.
- Chamberlain, J. P. (1979). *Fluorographic Detection of Radioactivity in Polyacrylamide Gels with the Water-Soluble Fluor, Sodium Salicylate*. *Annals of Biochemistry* 98(1): 132-135.
- Cheung, A. K. (1990). *Biocompatibility of Hemodialysis Membranes*. *Journal of the American Society of Nephrology* 1(2): 150-161.
- Chollet-Martin, S., Stamatakis, G., Bailly, S., Mery, J. P. und Gougerot-Pocidallo, M. A. (1991). *Induction of Tumour Necrosis Factor-Alpha During Haemodialysis. Influence of the Membrane Type*. *Clinical & Experimental Immunology* 83(2): 329-332.
- Chomczynski, P. und Sacchi, N. (1987). *Single-Step Method of RNA Isolation by Acid Guanidinium Thiocyanate-Phenol-Chloroform Extraction*. *Annals of Biochemistry* 162(1): 156-159.
- Cresswell, P., Springer, T., Strominger, J. L., Turner, M. J., Grey, H. M. und Kubo, R. T. (1974). *Immunological Identity of the Small Subunit of HL-A Antigens and Beta-2-Microglobulin and Its Turnover on the Cell Membrane*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 71(5): 2123-2127.
- De Sousa, M., Reimao, R., Lacerda, R., Hugo, P., Kaufmann, S. H. und Porto, G. (1994). *Iron Overload in Beta-2-Microglobulin-Deficient Mice*. *Immunological Letters* 39(2): 105-111.

- Descamps-Latscha, B., Herbelin, A., *et al.* (1995). *Balance between IL-1 Beta, TNF-Alpha and their Specific Inhibitors in Chronic Renal Failure and Maintenance Dialysis. Relationships with Activation Markers of T-Cells, B-Cells and Monocytes.* Journal of Immunology 154(2): 882-892.
- Dinarello, C. A. (1984). *Interleukin-1 and the Pathogenesis of the Acute-Phase Response.* New England Journal of Medicine 311(22): 1413-1418.
- Dinarello, C. A. (1988). *Biology of Interleukin-1.* FASEB Journal 2(2): 108-115.
- Dinarello, C. A. und Savage, N. (1989). *Interleukin-1 and Its Receptor.* Critical Reviews in Immunology 9(1): 1-20.
- Dinarello, C. A. (1990). *Cytokines and Biocompatibility.* Blood Purification 8(4): 208-213.
- Drueke, T. B. (2000). *Beta-2-Microglobulin and Amyloidosis.* Nephrology, Dialysis Transplantation 15 Suppl 1: 17-24.
- Dunne, J., Feighery, C. und Whelan, A. (1996). *Beta-2-Microglobulin, Neopterin and Monocyte Fc-Gamma Receptors in Opportunistic Infections of HIV-Positive Patients.* British Journal of Biomedical Science 53(4): 263-269.
- Engelberts, I., Francot, G. J., *et al.* (1994). *Effect of Hemodialysis on Peripheral Blood Monocyte Tumor Necrosis Factor-Alpha, Interleukin-6 and Interleukin-8 Secretion In Vitro.* Nephron 66(4): 396-403.
- Feinberg, A. P. und Vogelstein, B. (1983). *A Technique for Radiolabeling DNA Restriction Endonuclease Fragments to High Specific Activity.* Analytical Biochemistry 132(1): 6-13.

- Fellous, M., Kamoun, M., Gresser, I. und Bono, R. (1979). *Enhanced Expression of HLA-Antigens and Beta-2-Microglobulin on Interferon-Treated Human Lymphoid Cells*. *European Journal of Immunology* 9(6): 446-449.
- Fellous, M., Nir, U., Wallach, D., Merlin, G., Rubinstein, M. und Revel, M. (1982). *Interferon-Dependent Induction of mRNA for the Major Histocompatibility Antigens in Human Fibroblasts and Lymphoblastoid Cells*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 79(10): 3082-3086.
- Ferreira, A., Urena, P., *et al.* (1995). *Relationship between Serum Beta-2-Microglobulin, Bone Histology and Dialysis Membranes in Uraemic Patients*. *Nephrology, Dialysis, Transplantation* 10(9): 1701-1707.
- Floege, J., Schaffer, J., Koch, K. M. und Shaldon, S. (1992). *Dialysis Related Amyloidosis: A Disease of Chronic Retention and Inflammation?* *Kidney International* 38: S78-85.
- Floege, J. und Ehlerding, G. (1996). *Beta-2-Microglobulin-Associated Amyloidosis*. *Nephron* 72(1): 9-26.
- Flynn, J. L., Goldstein, M. M., Triebold, K. J., Koller, B. und Bloom, B. R. (1992). *Major Histocompatibility Complex Class I-Restricted T-Cells Are Required for Resistance to Mycobacterium Tuberculosis Infection*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89(24): 12013-12017.
- Gagnon, R. F., Lough, J. O. und Bourgoquin, P. A. (1988). *Carpal Tunnel Syndrome and Amyloidosis Associated with Continuous Ambulatory Peritoneal Dialysis*. *CMAJ* 139(8): 753-755.
- Garcia-Garcia, M., Argiles, Gouin-Charnet, A., Durfort, M., Garcia-Valero, J. und Mourad, G. (1999). *Impaired Lysosomal Processing of Beta-2-Microglobulin by Infiltrating Macrophages in Dialysis Amyloidosis*. *Kidney International* 55(3): 899-906.

- Gatsios, P., Haubeck, H. D., *et al.* (1996). *Oncostatin-M Differentially Regulates Tissue Inhibitors of Metalloproteinases TIMP-1 and TIMP-3 Gene Expression in Human Synovial Lining Cells*. *European Journal of Biochemistry* 241(1): 56-63.
- Gejyo, F., Yamada, T., *et al.* (1985). *A New Form of Amyloid Protein Associated with Chronic Hemodialysis Was Identified as Beta-2-Microglobulin*. *Biochemical & Biophysical Research Communications* 129(3): 701-706.
- Gejyo, F., Odani, S., *et al.* (1986). *Beta-2-Microglobulin: A New Form of Amyloid Protein Associated with Chronic Hemodialysis*. *Kidney International* 30(3): 385-390.
- Gill, T. J. D. (1980). *Structure and Function of Major Histocompatibility Complex*. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine* 104(11): 559-562.
- Goodfellow, P. N., Jones, E. A., *et al.* (1975). *The Beta-2-Microglobulin Gene Is on Chromosome 15 and Not in the HL-A Region*. *Nature* 254(5497): 267-269.
- Gorevic, P. D., Casey, T. T., Stone, W. J., Diraimondo, C. R., Prelli, F. C. und Frangione, B. (1985). *Beta-2-Microglobulin Is an Amyloidogenic Protein in Man*. *Journal of Clinical Investigation* 76(6): 2425-2429.
- Gorevic, P. D., Munoz, P. C., *et al.* (1986). *Polymerization of Intact Beta-2-Microglobulin in Tissue Causes Amyloidosis in Patients on Chronic Hemodialysis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 83(20): 7908-7912.
- Grooteman, M. P., Nube, M. J., Van Limbeek, J., Schoorl, M. und Van Houte, A. J. (1996). *Lymphocyte Subsets in Dialyser Eluates: A New Parameter of Bioincompatibility?* *Nephrology, Dialysis, Transplantation* 11(6): 1073-1078.

- Gutierrez, C., Bernabe, R. R., Vega, J. und Kreisler, M. (1979). *Purification of Human T- and B-Cells by a Discontinuous Density Gradient of Percoll*. Journal of Immunological Methods 29(1): 57-63.
- Haeffner-Cavaillon, N. und Cavaillon, J. M. (1987). *Involvement of the LPS Receptor in the Induction of Interleukin-1 in Human Monocytes Stimulated with Endotoxins*. Annales de Institut Pasteur - Immunology 138(3): 473-477.
- Haeffner-Cavaillon, N., Cavaillon, J. M., Ciancioni, C., Bacle, F., Delons, S. und Kazatchkine, M. D. (1989). *In Vivo Induction of Interleukin-1 During Hemodialysis*. Kidney International 35(5): 1212-1218.
- Hakim, R. M. und Schafer, A. I. (1985). *Hemodialysis-Associated Platelet Activation and Thrombocytopenia*. American Journal of Medicine 78(4): 575-580.
- Hakim, R. M. (1993). *Clinical Implications of Hemodialysis Membrane Biocompatibility*. Kidney International 44(3): 484-494.
- Haubeck, H. D., Kock, R., Fischer, D. C., Van De Leur, E., Hoffmeister, K. und Greiling, H. (1995). *Transforming Growth Factor-Beta 1, a Major Stimulator of Hyaluronan Synthesis in Human Synovial Lining Cells*. Arthritis & Rheumatology 38(5): 669-677.
- Hayakawa, M., Hatano, T., Sunabe, T., Higa, I. und Osawa, A. (1994). *Cytokine Production and Cytotoxicity of Lymphocytes in Patients on Maintenance Short- or Long-Term Haemodialysis*. Nephrology, Dialysis, Transplantation 9(6): 655-661.
- Heinrich, P. C., Castell, J. V. und Andus, T. (1990). *Interleukin-6 and the Acute Phase Response*. Biochemical Journal 265(3): 621-636.
- Herbelin, A., Nguyen, A. T., Zingraff, J., Urena, P. und Descamps-Latscha, B. (1990). *Influence of Uremia and Hemodialysis on Circulating Interleukin-1 and Tumor Necrosis Factor-Alpha*. Kidney International 37(1): 116-125.

- Herbelin, A., Urena, P., Nguyen, A. T., Zingraff, J. und Descamps-Latscha, B. (1991). *Elevated Circulating Levels of Interleukin-6 in Patients with Chronic Renal Failure*. *Kidney International* 39(5): 954-960.
- Heron, I., Hokland, M. und Berg, K. (1978). *Enhanced Expression of Beta-2-Microglobulin and HLA Antigens on Human Lymphoid Cells by Interferon*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 75(12): 6215-6219.
- Himmelfarb, J., Lazarus, J. M. und Hakim, R. (1991). *Reactive Oxygen Species Production by Monocytes and Polymorphonuclear Leukocytes During Dialysis*. *American Journal of Kidney Diseases* 17(3): 271-276.
- Hokland, M., Heron, I. und Berg, K. (1981). *Increased Expression of Beta-2-Microglobulin and Histocompatibility Antigens on Human Lymphoid Cells Induced by Interferon*. *Journal of Interferon Research* 1(4): 483-494.
- Homma, T., Tsujinaka, T., Kido, Y., Yasuda, T., Murata, A. und Mori, T. (1992). *Secretion of Beta-2-Microglobulin from Human Hepatoblastoma and Hepatoma Cells on Stimulation with Interleukin-6*. *European Surgical Research* 24(4): 204-210.
- Hughes, E. A., Hammond, C. und Cresswell, P. (1997). *Misfolded Major Histocompatibility Complex Class I Heavy Chains Are Translocated into the Cytoplasm and Degraded by the Proteasome*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94(5): 1896-1901.
- Hyafil, F. und Strominger, J. L. (1979). *Dissociation and Exchange of the Beta-2-Microglobulin Subunit of HLA-A and HLA-B Antigens*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 76(11): 5834-5838.

- Iida, Y., Miyata, T., Inagi, R., Sugiyama, S. und Maeda, K. (1994). *Beta-2-Microglobulin Modified with Advanced Glycation End Products Induces Interleukin-6 from Human Macrophages: Role in the Pathogenesis of Hemodialysis-Associated Amyloidosis*. *Biochemical & Biophysical Research Communications* 201(3): 1235-1241.
- Jahn, B., Betz, M., Deppisch, R., Janssen, O., Hansch, G. M. und Ritz, E. (1991). *Stimulation of Beta-2-Microglobulin Synthesis in Lymphocytes after Exposure to Cuprophan Dialyzer Membranes*. *Kidney International* 40(2): 285-290.
- Kaplow, L. S. und Goffinet, J. A. (1968). *Profound Neutropenia During the Early Phase of Hemodialysis*. *JAMA* 203(13): 1135-1137.
- Kessler, S. W. (1975). *Rapid Isolation of Antigens from Cells with a Staphylococcal Protein A-Antibody Adsorbent: Parameters of the Interaction of Antibody-Antigen Complexes with Protein A*. *Journal of Immunology* 115(6): 1617-1624.
- Knowles, B. B., Howe, C. C. und Aden, D. P. (1980). *Human Hepatocellular Carcinoma Cell Lines Secrete the Major Plasma Proteins and Hepatitis B Surface Antigen*. *Science* 209(4455): 497-499.
- Krammer, P. H. (2000). *Apoptosis*. *Deutsches Ärzteblatt* 97(25): A-1752.
- Krimpenfort, P., Rudenko, G., Hochstenbach, F., Guessow, D., Berns, A. und Ploegh, H. (1987). *Crosses of Two Independently Derived Transgenic Mice Demonstrate Functional Complementation of the Genes Encoding Heavy (HLA-B27) and Light (Beta-2-Microglobulin) Chains of HLA Class I Antigens*. *EMBO Journal* 6(6): 1673-1676.
- Kucherlapati, R. S., Faber, H. E., Poulik, M. D., Ruddle, F. H. und Smithies, O. (1976). *Assignment of the Gene for Beta-2-Microglobulin to Human Chromosome 15*. *Cytogenetics & Cell Genetics* 16(1-5): 178-180.

- Kurnick, J. T., Ostberg, L., Stegagno, M., Kimura, A. K., Orn, A. und Sjoberg, O. (1979). *A Rapid Method for the Separation of Functional Lymphoid Cell Populations of Human and Animal Origin on PVP-Silica (Percoll) Density Gradients*. Scandinavian Journal of Immunology 10(6): 563-573.
- Kuropatwinski, K. K., Deimus, C., Gearing, D., Baumann, H. und Mosley, B. (1997). *Influence of Subunit Combinations on Signaling by Receptors for Oncostatin M, Leukemia Inhibitory Factor, and Interleukin-6*. Journal of Biological Chemistry 272(24): 15135-15144.
- Laemmli, U. K. (1970a). *Cleavage of Structural Proteins During the Assembly of the Head of Bacteriophage T4*. Nature 227(259): 680-685.
- Laemmli, U. K., Beguin, F. und Gujer, K. G. (1970b). *A Factor Preventing the Major Head Protein of Bacteriophage T4 from Random Aggregation*. Journal of Molecular Biology 47(1): 69-85.
- Lansdorp, P. M., Aarden, L. A., Calafat, J. und Zeiljemaker, W. P. (1986). *A Growth-Factor Dependent B-Cell Hybridoma*. Current Topics in Microbiology & Immunology 132: 105-113.
- Laude-Sharp, M., Caroff, M., Simard, L., Pusineri, C., Kazatchkine, M. D. und Haeffner-Cavaillon, N. (1990). *Induction of IL-1 During Hemodialysis: Transmembrane Passage of Intact Endotoxins (LPS)*. Kidney International 38(6): 1089-1094.
- Libetta, C., De Nicola, L., Rampino, T., De-Simone, W. und Memoli, B. (1996). *Inflammatory Effects of Peritoneal Dialysis: Evidence of Systemic Monocyte Activation*. Kidney International 49(2): 506-511.
- Lifson, A. R., Hessol, N. A., et al. (1992). *Serum Beta-2-Microglobulin and Prediction of Progression to AIDS in HIV Infection*. Lancet 339(8807): 1436-1440.

- Lindemann, A., Oster, W., Herrmann, F. und Mertelsmann, R. (1988). *Cytokines in Tumor Therapy*. *Arzneimittel-Forschung* 38(3A): 466-469.
- Lonergan, M., Dey, A., Becker, K. G., Drew, P. D. und Ozato, K. (1993). *A Regulatory Element in the Beta-2-Microglobulin Promoter Identified by In Vivo Footprinting*. *Molecular & Cellular Biology* 13(11): 6629-6639.
- Luger, A., Kovarik, J., Stummvoll, H. K., Urbanska, A. und Luger, T. A. (1987). *Blood-Membrane Interaction in Hemodialysis Leads to Increased Cytokine Production*. *Kidney International* 32(1): 84-88.
- Lütticken, C., Wegenka, U. M., et al. (1994). *Association of Transcription Factor APRF and Protein Kinase Jak1 with the Interleukin-6 Signal Transducer gp130*. *Science* 263(5143): 89-92.
- Mailloux, L. U., Bellucci, A. G., et al. (1991). *Mortality in Dialysis Patients: Analysis of the Causes of Death*. *American Journal of Kidney Diseases* 18(3): 326-335.
- Mans, R. J. und Novelli, G. D. (1960). *A Convenient, Rapid and Sensitive Method for Measuring the Incorporation of Radioactive Amino Acids into Protein*. *Biochemical & Biophysical Research Communication* 3: 540-543.
- Mege, J. L., Olmer, M., et al. (1991). *Haemodialysis Membranes Modulate Chronically the Production of TNF-Alpha, IL-1 Beta and IL-6*. *Nephrology, Dialysis, Transplantation* 6(11): 868-875.
- Mege, J. L., Capo, C., Purgus, R. und Olmer, M. (1996). *Monocyte Production of Transforming Growth Factor-Beta in Long-Term Hemodialysis: Modulation by Hemodialysis Membranes*. *American Journal of Kidney Diseases* 28(3): 395-399.
- Memoli, B., Libetta, C., et al. (1991). *Interleukin-6 Production of Uraemic Haemodialysed Patients: Effects of Different Membranes*. *Nephrology, Dialysis, Transplantation* 6(Suppl 2): 96-98.

- Memoli, B., Libetta, C., *et al.* (1992). *Hemodialysis Related Induction of Interleukin-6 Production by Peripheral Blood Mononuclear Cells*. *Kidney International* 42(2): 320-326.
- Miyasaka, N., Sato, K., Kitano, Y., Higaki, M., Nishioka, K. und Ohta, K. (1992). *Aberrant Cytokine Production from Tenosynovium in Dialysis Associated Amyloidosis*. *Annals of Rheumatic Diseases* 51(6): 797-802.
- Miyata, T., Oda, O., *et al.* (1993). *Beta-2-Microglobulin Modified with Advanced Glycation End Products Is a Major Component of Hemodialysis-Associated Amyloidosis*. *Journal of Clinical Investigation* 92(3): 1243-1252.
- Miyata, T., Inagi, R., *et al.* (1994). *Involvement of Beta-2-Microglobulin Modified with Advanced Glycation End Products in the Pathogenesis of Hemodialysis-Associated Amyloidosis - Induction of Human Monocyte Chemotaxis and Macrophage Secretion of Tumor Necrosis Factor-Alpha and Interleukin-1*. *Journal of Clinical Investigation* 93(2): 521-528.
- Miyata, T., Wada, Y. und Maeda, K. (1995). *Beta-2-Microglobulin Modified with the Age Products of the Maillard Reaction in Dialysis-Related Amyloidosis*. *Contributions to Nephrology* 112: 52-64.
- Miyata, T., Iida, Y., *et al.* (1996a). *Monocyte/Macrophage Response to Beta-2-Microglobulin Modified with Advanced Glycation End Products*. *Kidney International* 49(2): 538-550.
- Miyata, T., Kawai, R., Taketomi, S. und Sprague, S. M. (1996b). *Possible Involvement of Advanced Glycation End-Products in Bone Resorption*. *Nephrology, Dialysis, Transplantation* 5(54): 54-57.

- Morfeldt-Manson, J., Julander, I., Von Stedingk, L. V., Wasserman, J. und Nilsson, B. (1988). *Elevated Serum Beta-2-Microglobulin - a Prognostic Marker for Development of AIDS among Patients with Persistent Generalized Lymphadenopathy*. *Infection* 16(2): 109-110.
- Mori, M., Terui, Y., Tanaka, M., Tomizuka, H. et al. (2001). *Antitumor Effect of Beta-2-Microglobulin in Leukemic Cell-bearing Mice via Apoptosis-inducing Activity: Activation of Caspase-3 and Nuclear Factor-kappa B*. *Cancer Research* 61(11): 4414-4417
- Moriniere, P., Marie, A., et al. (1991). *Destructive Spondyloarthropathy with Beta-2-Microglobulin Amyloid Deposits in a Uremic Patient before Chronic Hemodialysis*. *Nephron* 59(4): 654-657.
- Müllberg, J., Schooltink, H., et al. (1993). *The Soluble Interleukin-6 Receptor Is Generated by Shedding*. *European Journal of Immunology* 23(2): 473-480.
- Nachbaur, K., Troppmair, J., Bieling, P., Kotlan, B., König, P. und Huber, C. (1988a). *Cytokines in the Control of Beta-2-Microglobulin Release. I. In Vitro Studies on Various Haemopoietic Cells*. *Immunobiology* 177(1): 55-65.
- Nachbaur, K., Troppmair, J., et al. (1988b). *Cytokines in the Control of Beta-2-Microglobulin Release. II. In Vivo Studies with Recombinant Interferons and Antigens*. *Immunobiology* 177(1): 66-75.
- Nakabayashi, H., Taketa, K., Miyano, K., Yamane, T. und Sato, J. (1982). *Growth of Human Hepatoma Cells Lines with Differentiated Functions in Chemically Defined Medium*. *Cancer Research* 42(9): 3858-3863.
- Nakabayashi, H., Taketa, K., Yamane, T., Miyazaki, M., Miyano, K. und Sato, J. (1984). *Phenotypical Stability of a Human Hepatoma Cell Line, HuH-7, in Long-Term Culture with Chemically Defined Medium*. *GANN* 75(2): 151-158.

- Nakao, Y., Matsumoto, H., *et al.* (1981). *Genetic and Clinical Studies of Serum Beta-2-Microglobulin Levels in Haematological Malignancies*. *Clinical Experimental Immunology* 46(1): 134-141.
- Ostberg, L., Rask, L., Nilsson, K. und Peterson, P. A. (1976). *Independent Expression of the Two HL-A Antigen Polypeptide Chains*. *European Journal of Immunology* 5(7): 462-468.
- Owen, M. J., Kissonerghis, A. M. und Lodish, H. F. (1980). *Biosynthesis of HLA-A and HLA-B Antigens In Vivo*. *Journal of Biological Chemistry* 255(20): 9678-9684.
- Paczek, L., Schaefer, R. M. und Heidland, A. (1990). *Dialysis Membranes Inhibit In Vitro Release of Beta-2-Microglobulin from Human Lymphocytes*. *Nephron* 56(3): 267-270.
- Paczek, L., Schaefer, R. M. und Heidland, A. (1991). *Dialysis Membranes Decrease Immunoglobulin and Interleukin-6 Production by Peripheral Blood Mononuclear Cells In Vitro*. *Nephrology, Dialysis, Transplantation* 6(Suppl 3): 41-44.
- Parham, P., Lutz, P. M. und Cresswell, P. (1987). *Localization of an Epitope of Beta-2-Microglobulin That Is Shared with Other Members of the Immunoglobulin Superfamily*. *Immunogenetics* 26(4-5): 323-326.
- Paul, W. E. und Seder, R. A. (1994). *Lymphocyte Responses and Cytokines*. *Cell* 76(2): 241-251.
- Pereira, B. J. und Dinarello, C. A. (1994). *Production of Cytokines and Cytokine Inhibitory Proteins in Patients on Dialysis*. *Nephrology, Dialysis, Transplantation* 2(60): 60-71.
- Pereira, B. J. (1995). *Cytokine Production in Patients on Dialysis*. *Blood Purification* 13(3-4): 135-146.

- Pereira, B. J. G., Shapiro, L., King, A. J., Falagas, M. E., Strom, J. A. und Dinarello, C. A. (1994). *Plasma Levels of IL-1-Beta, TNF-Alpha and Their Specific Inhibitors in Undialyzed Chronic Renal Failure, CAPD and Hemodialysis Patients*. *Kidney International* 45(3): 890-896.
- Pertoft, H., Laurent, T. C., Laas, T. und Kagedal, L. (1978). *Density Gradients Prepared from Colloidal Silica Particles Coated by Polyvinylpyrrolidone (Percoll)*. *Annals of Biochemistry* 88(1): 271-282.
- Pertosa, G., Gesualdo, L., Tarantino, E. A., Ranieri, E., Bottalico, D. und Schena, F. P. (1993). *Influence of Hemodialysis on Interleukin-6 Production and Gene Expression by Peripheral Blood Mononuclear Cells*. *Kidney International*
- Pertosa, G., Gesualdo, L., Bottalico, D. und Schena, F. P. (1995). *Endotoxins Modulate Chronically Tumour Necrosis Factor-Alpha and Interleukin-6 Release by Uraemic Monocytes*. *Nephrology, Dialysis, Transplantation* 10(3): 328-333.
- Peterson, P. A., Cunningham, B. A., Berggård, I. und Edelman, G. M. (1972). *2-Microglobulin - a Free Immunoglobulin Domain*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 69(7): 1697-1701.
- Planella, T., Cortes, M., Martinez-Bru, C., Barrio, J., Sambeat, M. A. und Gonzalez-Sastre, F. (1998). *The Predictive Value of Several Markers in the Progression to Acquired Immunodeficiency Syndrome*. *Clinical Chemical Laboratory Medicine* 36(3): 169-173.
- Ploegh, H. L., Cannon, L. E. und Strominger, J. L. (1979). *Cell-Free Translation of the mRNAs for the Heavy and Light Chains of HLA-A and HLA-B Antigens*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 76(5): 2273-2277.

- Powell, A. C., Bland, L. A., *et al.* (1991). *Enhanced Release of TNF-Alpha, but Not IL-1 Beta, from Uremic Blood after Endotoxin Stimulation*. *Lymphokine & Cytokine Research* 10(5): 343-346.
- Rabson, R., Mans, R. J. und Novelli, G. D. (1961). *Changes in Cell-Free Amino Acid Incorporating Activity During Maturation of Maize Kernels*. *Archives Biochemistry & Biophysics* 93: 555-562.
- Ramadori, G., Mitsch, A., Rieder, H. und Meyer Zum Buschenfelde, K. H. (1988). *Alpha- and Gamma-Interferon (IFN-Alpha, IFN-Gamma) but Not Interleukin-1 (IL-1) Modulate Synthesis and Secretion of Beta-2-Microglobulin by Hepatocytes*. *European Journal of Clinical Investigation* 18(4): 343-351.
- Reisfeld, R. A., Allison, J. P., *et al.* (1976). *HL-A Antigens in Serum and Urine: Isolation, Characterization, and Immunogenic Properties - Association of HL-A Antigens and Beta-2-Microglobulin: Concepts and Questions*. *Transplantation Proceedings* 8(2): 173-178.
- Revillard, J. P., Vincent, C., Clot, J. und Sany, J. (1982). *Beta-2-Microglobulin and Beta-2-Microglobulin-Binding Proteins in Inflammatory Diseases*. *European Journal of Rheumatology & Inflammation* 5(4): 398-405.
- Rincón, M., Anguita, J., Nakamura, T., Fikrig, E. und Flavell, R. A. (1997). *Interleukin (IL)-6 Directs the Differentiation of IL-4-Producing CD4<sup>+</sup> T-Cells*. *Journal of Experimental Medicine* 185(3): 461-469.
- Rincón, M. und Flavell, R. A. (1997). *T-Cell Subsets: Transcriptional Control in the TH1/TH2 Decision*. *Current Biology* 7(11): R729-732.
- Ripoll, E., Revilla, M., Hernandez, E. R., Arribas, I., Villa, L. F. und Rico, H. (1996). *New Evidence that Serum Beta-2-Microglobulin Behaves as a Biological Marker of Bone Remodelling in Women*. *European Journal of Clinical Investigation* 26(8): 681-685.

- Rosa, F., Fellous, M., Dron, M., Tovey, M. und Revel, M. (1983). *Presence of an Abnormal Beta-2-Microglobulin mRNA in Daudi Cells: Induction by Interferon*. Immunogenetics 17(2): 125-131.
- Rose-John, S., Schooltink, H., et al. (1990). *Studies on the Structure and Regulation of the Human Hepatic Interleukin-6 Receptor*. European Journal of Biochemistry 190(1): 79-83.
- Rose-John, S. und Heinrich, P. C. (1994). *Soluble Receptors for Cytokines and Growth Factors: Generation and Biological Function*. Biochemical Journal 300(2): 281-290.
- Sadamori, N., Mine, M., et al. (1995). *Clinical Significance of Beta-2-Microglobulin in Serum of Adult T-Cell Leukemia*. Leukemia 9(4): 594-597.
- Saito, A. (1994). *Beta-2-Microglobulin Amyloidosis*. Nephrology, Dialysis, Transplantation 9(Suppl 2): 116-119.
- Santos, M., Schilham, M. W., Rademakers, L. H., Marx, J. J., De Sousa, M. und Clevers, H. (1996). *Defective Iron Homeostasis in Beta-2-Microglobulin Knockout Mice Recapitulates Hereditary Hemochromatosis in Man*. Journal of Experimental Medicine 184(5): 1975-1985.
- Sauerwein, R. W., Van Der Meer, W. und Aarden, L. A. (1987). *Analysis of T-Cell-Replacing Factor-Like Activity: Potent Induction of T-Helper Activity for Human B-Cells by Residual Concanavalin A and Interleukin-2*. European Journal of Immunology 17(8): 1145-1150.
- Schindler, R., Linnenweber, S., et al. (1993). *Gene Expression of Interleukin-1 Beta During Hemodialysis*. Kidney International 43(3): 712-721.

- Schneider, U., Schwenk, H. U. und Bornkamm, G. (1977). *Characterization of EBV-Genome Negative 'Null' and 'T' Cell Lines Derived from Children with Acute Lymphoblastic Leukemia and Leukemic Transformed Non-Hodgkin Lymphoma*. International Journal of Cancer 19(5): 621-626.
- Schoels, M., Jahn, B., Hug, F., Deppisch, R., Ritz, E. und Hansch, G. M. (1993). *Stimulation of Mononuclear Cells by Contact with Cuprophane Membranes: Further Increase of Beta-2-Microglobulin Synthesis by Activated Late Complement Components*. American Journal of Kidney Diseases 21(4): 394-399.
- Schroder, K., Hertzog, P. J., Ravasi, T. und Hume, D. A. (2004). *Interferon-Gamma: An Overview of Signals, Mechanisms and Functions*. Journal of Leukocyte Biology 75(2): 163-189.
- Seong, R. H., Clayberger, C. A., Krensky, A. M. und Parnes, J. R. (1988). *Rescue of Daudi Cell HLA Expression by Transfection of the Mouse Beta-2-Microglobulin Gene*. Journal of Experimental Medicine 167(2): 288-299.
- Strasser, T. und Schiffil, H. (1991). *Generation of Leukotriene B4 by Hemodialyzer Membranes: A Novel Index of Biocompatibility*. Klinische Wochenschrift 69(17): 808-812.
- Strominger, J. L., Cresswell, P., et al. (1974). *The Immunoglobulin-Like Structure of Human Histocompatibility Antigens*. Transplantation Reviews 21(0): 126-143.
- Tarleton, R. L., Koller, B. H., Latour, A. und Postan, M. (1992). *Susceptibility of Beta-2-Microglobulin-Deficient Mice to Trypanosoma Cruzii Infection*. Nature 356(6367): 338-340.
- Ullum, H., Lepri, A. C., et al. (2000). *"Prognostic Value of Single Measurements of Beta-2-Microglobulin, Immunoglobulin a in HIV Disease after Controlling for CD4 Lymphocyte Counts and Plasma HIV RNA Levels."* Scandinavian Journal of Infectious Diseases 32(4): 371-376.

- Vaziri, N. D., Wang, J., Cesario, T., Yousefi, S., Valenzuela, R. und Carandang, G. (1994). *Induction, Transcription, Synthesis, and Adsorption of Interleukin-1 by Dialyzer Membranes*. *Journal of the American Society of Nephrology* 4(11): 1884-1889.
- Wallach, D., Fellous, M. und Revel, M. (1982). *Preferential Effect of Gamma Interferon on the Synthesis of HLA Antigens and their mRNAs in Human Cells*. *Nature* 299(5886): 833-836.
- Walters, M. T., Stevenson, F. K., Goswami, R., Smith, J. L. und Cawley, M. I. (1989). *Comparison of Serum and Synovial Fluid Concentrations of Beta-2-Microglobulin and C-Reactive Protein in Relation to Clinical Disease Activity and Synovial Inflammation in Rheumatoid Arthritis*. *Annals of Rheumatology Diseases* 48(11): 905-911.
- Wegenka, U. M., Buschmann, J., Lütticken, C., Heinrich, P. C. und Horn, F. (1993). *Acute-Phase Response Factor, a Nuclear Factor Binding to Acute Phase Response Elements, Is Rapidly Activated by Interleukin-6 at the Posttranslational Level*. *Molecular & Cellular Biology* 13(1): 276-288.
- Wegenka, U. M., Lütticken, C., et al. (1994). *The Interleukin-6-Activated Acute Phase Response Factor Is Antigenically and Functionally Related to Members of the Signal Transducer and Activator of Transcription (STAT) Family*. *Molecular & Cellular Biology* 14(5): 3186-3196.
- Xie, J., Wang, Y., Freeman, M. E., 3rd, Barlogie, B. und Yi, Q. (2003). *Beta-2-Microglobulin as a Negative Regulator of the Immune System: High Concentrations of the Protein Inhibit In Vitro Generation of Functional Dendritic Cells*. *Blood* 101(10): 4005-4012.

- Yuan, J., Wegenka, U. M., *et al.* (1994). *The Signalling Pathways of Interleukin-6 and Gamma Interferon Converge by the Activation of Different Transcription Factors Which Bind to Common Responsive DNA Elements*. *Molecular & Cellular Biology* 14(3): 1657-1668.
- Zaoui, P. M., Stone, W. J. und Hakim, R. M. (1990). *Effects of Dialysis Membranes on Beta-2-Microglobulin Production and Cellular Expression*. *Kidney International* 38(5): 962-968.
- Ziegler-Heitbrock, H. W., Passlick, B. und Flieger, D. (1988a). *The Monoclonal Antimonocyte Antibody My4 Stains B-Lymphocytes and Two Distinct Monocyte Subsets in Human Peripheral Blood*. *Hybridoma* 7(6): 521-527.
- Ziegler-Heitbrock, H. W., Thiel, E., Futterer, A., Herzog, V., Wirtz, A. und Riethmuller, G. (1988b). *Establishment of a Human Cell Line (MonoMac6) with Characteristics of Mature Monocytes*. *International Journal of Cancer* 41(3): 456-461.
- Zijlstra, M., Bix, M., Simister, N. E., Loring, J. M., Raulet, D. H. und Jaenisch, R. (1990). *Beta-2-Microglobulin Deficient Mice Lack CD4<sup>+</sup>8<sup>+</sup> Cytolytic T-Cells*. *Nature* 344(6268): 742-746.
- Zingraff, J. J., Noel, L. H., *et al.* (1990). *Beta-2-Microglobulin Amyloidosis in Chronic Renal Failure*. *New England Journal of Medicine* 323(15): 1070-1071.

## 9 Abkürzungen

APRF	<i>Acute Phase Response Factor (STAT3)</i>
APS	Ammoniumperoxodisulfat
$\beta_2$ M	$\beta_2$ -Mikroglobulin
BSA	Bovines Serum Albumin
d	Tag(e)
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMSO	Dimethylsulfoxid
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Natriummethyldiamintetraacetat
ELISA	<i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i>
FCS	Fetales Kälberserum ( <i>Fetal Calf Serum</i> )
<i>gp</i>	Glykoprotein
GTC	Guanidiumthiocyanat
h	Stunde(n)
HD	Hämodialyse
IFN	Interferon
IL	Interleukin
kD	Kilodalton
LPS	Lipopolysaccharid
min	Minute(n)
mM	Millimolar
MOPS	Morpholinopropansulfonsäure
mRNA	<i>messenger-RNA</i>
OD	Optische Dichte
OSM	Oncostatin M
PAGE	Polyacrylamidgel-Elektrophorese
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
PTFE	Polyfluortetraethylen (Teflon®)
PVDF	Polyvinylidendifluorid

---

<i>Rpm</i>	Umdrehungen pro Minute ( <i>Rounds Per Minute</i> )
rh-	Rekombinantes humanes
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumlaurylsulfat ( <i>Sodium Dodecylsulfate</i> )
Sec	Sekunde(n)
SSC	<i>Saline Sodium Citrate</i>
STAT	<i>Signal Transducer And Activator of Transcription</i>
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethyldiamin
TNF	Tumor-Nekrose-Faktor
U	<i>Units</i> (Einheiten)

## 10 Danksagung

Ein herzlicher Dank gilt meinem Betreuer Herrn Prof. Dr. rer. nat. L. Graeve, der mich in die wissenschaftliche Arbeitsweise eingeführt und durch seine freundliche Unterstützung mich durch die Arbeit begleitet hat. Ich danke Herrn Prof. Dr. rer. nat. P. C. Heinrich für die Überlassung des Themas und die guten Arbeitsbedingungen an seinem Institut.

Weiterhin möchte ich mich bei Dr. rer. nat. P. Gatsios Bedanken für die geduldige Einführung in die Methodik und Überlassung der *Synoviozyten-Northern Blots*. Außerdem gilt Dank Frau M. van Mackelenbergh und Frau W. Frisch für die zuvorkommende Unterstützung bei der Laborarbeit.

Für die konstruktive Auseinandersetzung mit dem Thema und seinem wissenschaftlichen Rat möchte ich mich bei Herrn Dr. rer. nat. J. Prell (School of Biological Sciences, University of Reading) bedanken.

Ein ganz besonderer Dank geht an meine Frau Susanne für die liebevolle Unterstützung während der gesamten Zeit.



# 11 Lebenslauf

<b>Persönliche Daten</b>	geboren am 16. Februar 1970 in Geilenkirchen, verheiratet mit Susanne Vraetz (Diplom-Biologin, Rechtsanwältin)
<b>Berufserfahrung</b> seit 2/2001	Arzt am Zentrum für Kinderheilkunde und Jugendmedizin, Universitätsklinikum Freiburg
<b>Praktisches Jahr</b> 10/1999-10/2000	Chirurgie, Kantonsspital Winterthur (Schweiz) Pädiatrie, Universitätsklinikum Freiburg Innere Medizin, Universitätsklinikum Freiburg
<b>Promotionszeit</b> 07/1995-02/1997	Institut für Biochemie RWTH Aachen, Prof. Dr. P. C. Heinrich
<b>Studium</b> 10/1991 8/1993 3/1995 3/1999 4/1999 11/2000	Beginn des Studiums der Humanmedizin an der RWTH Aachen Physikum Erstes Staatsexamen Zweites Staatsexamen Wechsel an die Albert-Ludwigs-Universität, Freiburg Drittes Staatsexamen
<b>Zivildienst</b> 9/1989 - 9/1991	Pflegedienst im Universitäts-Klinikum der RWTH Aachen
<b>Schule</b> 6/1989	Abitur am Cusanus Gymnasium, Erkelenz



