

Aus der Orthopädischen Universitätsklinik Tübingen
Abteilung Allgemeine Orthopädie mit Poliklinik
Ärztlicher Direktor: Professor Dr. N. Wülker

**Quantitative Analyse
der
Interleukin 16-Transkription
in
aktivierten Fibroblasten**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der Medizinischen Fakultät
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
Heike Schützle
aus
Esslingen a. N.
2003

Dekan: Professor Dr. C. D. Claussen

1. Berichterstatter: Privatdozent Dr. W. Aicher

2. Berichterstatter: Privatdozent Dr. G. Klein

INHALTSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG	1
1.1	RHEUMATOIDE ARTHRITIS (RA)	1
1.1.1	<i>Allgemeines</i>	1
1.1.2	<i>Pathogenese der rheumatoiden Arthritis</i>	2
1.2	ZYTOKINE	5
1.2.1	<i>Interleukin 16</i>	6
1.2.2	<i>Interleukin 16 bei rheumatoider Arthritis</i>	8
1.2.3	<i>Interleukin 18</i>	10
1.2.4	<i>Interleukin 18 bei rheumatoider Arthritis</i>	11
1.3	APOPTOSE	13
1.4	NEKROSE	14
1.5	ZELLKULTUR-MODELL	14
1.6	FRAGESTELLUNG UND ZIELSETZUNG	15
2	MATERIAL UND METHODEN	17
2.1	MATERIAL	17
2.1.1	<i>Geräte und Verbrauchsmaterialien</i>	17
2.1.2	<i>Chemikalien, Reagenzien und Medien</i>	18
2.1.3	<i>Gekaufte Zelllinien</i>	20
2.1.4	<i>Humanes Gewebe</i>	20
2.1.5	<i>Transfizierte Zellen</i>	22
2.2	METHODEN	22
2.2.1	<i>Zellkulturmethoden</i>	22
2.2.1.1	<i>Allgemeines</i>	22
2.2.1.2	<i>Anlage von Primärkulturen humaner Zellen</i>	23
2.2.1.3	<i>Anlage humaner Hautfibroblastenkulturen</i>	23
2.2.1.4	<i>Anlage humaner Fibroblastenkulturen aus synovialem Gewebe</i>	23
2.2.1.5	<i>Anlage von Kulturen aus gekauften nativen Hautfibroblasten</i>	24
2.2.2	<i>Nährmedium und Zellpflege</i>	24

2.2.2.1	<i>Herstellung des Vollmediums</i>	24
2.2.2.2	<i>Mediumwechsel</i>	25
2.2.2.3	<i>Immunhistochemische Bestimmung des Zelltyps</i>	26
2.2.2.4	<i>Subkultivierung der Zellen</i>	27
2.2.2.5	<i>Kryokonservierung</i>	27
2.2.2.6	<i>Auftauen der Zellen</i>	28
2.2.2.7	<i>Zellzahlbestimmung</i>	28
2.2.3	<i>Inkubation der Fibroblasten mit Pharmaka</i>	29
2.2.3.1	<i>Wirkmechanismen und eingesetzte Konzentrationen</i>	30
2.2.3.2	<i>Durchführung der Induktion</i>	32
2.2.4	<i>RNA-Extraktion</i>	33
2.2.5	<i>cDNA-Synthese</i>	34
2.2.6	<i>LightCycler RT-PCR</i>	35
2.2.7	<i>Darstellung der amplifizierten Produkte</i>	38
2.2.8	<i>Cell Death Detection ELISA (Roche)</i>	39
2.2.9	<i>ApopDetect Plus Peroxidase Assay</i>	41
2.2.10	<i>Human-Interleukin-16 ELISA (Roche)</i>	42
2.2.11	<i>Quantifizierung im LightCycler und Auswertung</i>	43
3	ERGEBNISSE	46
3.1	ZELLKULTUR UND ZELLWACHSTUM	46
3.2	IMMUNHISTOCHEMISCHE ZELLTYPCHARAKTERISIERUNG	46
3.3	TITRATION MIT MAS-7	48
3.4	TITRATION MIT STAUROSPORIN	50
3.4.1	<i>Einfluß von Staurosporin auf die IL-16-Transkription</i>	50
3.4.2	<i>Einfluß von Staurosporin auf die IL-18-Transkription</i>	52
3.5	ERGEBNISSE DER IL-16-REGULATION DURCH PHARMAKONINDUKTION	53
3.5.1	<i>Untersuchung dermalen Fibroblasten von Patienten</i>	53
3.5.1.1	<i>Unbehandelte Zellen</i>	53
3.5.1.2	<i>Inkubation mit MAS-7, 10 µM</i>	53
3.5.1.3	<i>Inkubation mit Wespengift, 10 µM</i>	54
3.5.1.4	<i>Inkubation mit Ocadaic Acid, 10 nM</i>	55
3.5.1.5	<i>Inkubation mit Ionomycin, 200 ng/ml</i>	57

3.5.1.6	<i>Inkubation mit cAMP, 10 μM</i>	58
3.5.1.7	<i>Inkubation mit Forskolin, 5 μM</i>	58
3.5.1.8	<i>Inkubation mit Staurosporin, 10 nM</i>	59
3.5.1.9	<i>Inkubation mit PMA (Phorbol-Myristat-Acetat), 1 ng/ml</i>	61
3.5.1.10	<i>Inkubation mit H7 (Dihydrochlorid), 100 μM</i>	62
3.5.2	<i>Untersuchung einer neonatalen Hautfibroblasten-Zelllinie</i>	65
3.5.3	<i>Untersuchung synovialer Fibroblasten von Patienten</i>	66
3.5.3.1	<i>Unbehandelte Zellen</i>	66
3.5.3.2	<i>Pharmakoninduktion synovialer Fibroblasten zweier Patienten</i>	66
3.5.4	<i>Behandlung mit Staurosporin über 48 h</i>	69
3.5.4.1	<i>Dermale Fibroblasten der Patienten KNH und OTA</i>	69
3.5.4.2	<i>Neonatale Hautfibroblasten</i>	72
3.5.5	<i>Behandlung mit MAS-7 über 48 h</i>	74
3.5.5.1	<i>Dermale Fibroblasten von drei Patienten</i>	74
3.5.5.3	<i>Synoviale Fibroblasten des Patienten HTF</i>	78
3.6	ERGEBNISSE DER IL-18-REGULATION DURCH PHARMAKONINDUKTION	79
3.6.1	<i>Untersuchung dermalen Fibroblasten von Patienten</i>	79
3.6.1.1	<i>Unbehandelte Zellen</i>	79
3.6.1.2	<i>Pharmakoninduktion bei Hautfibroblasten zweier Patienten</i>	80
3.6.2	<i>Untersuchung einer neonatalen Hautfibroblasten-Zelllinie</i>	83
3.6.3	<i>Untersuchung synovialer Fibroblasten von Patienten</i>	84
3.6.3.1	<i>Unbehandelte Zellen</i>	84
3.6.3.2	<i>Pharmakoninduktion synovialer Fibroblasten von Patienten</i>	84
3.6.4	<i>Behandlung mit Staurosporin über 48 Stunden</i>	86
3.6.5	<i>Behandlung mit MAS-7 über 48 Stunden</i>	89
3.7	CELL DEATH DETECTION ELISA	90
3.8	APOPDTECT PLUS PEROXIDASE ASSAY	93
3.9	HUMAN-INTERLEUKIN-16 ELISA	96
4	DISKUSSION	99
4.1	BEURTEILUNG DER METHODEN	99
4.1.1	<i>Übertragbarkeit des in vitro Modells auf in vivo Vorgänge</i>	99

4.1.2	Zellkultur	100
4.1.3	Immunhistochemische Zelltypcharakterisierung	101
4.1.4	RNA-Extraktion und cDNA-Synthese	102
4.1.5	LightCycler RT-PCR	103
4.1.6	Gel-Elektrophorese	105
4.1.7	Cell Death Detection ELISA	106
4.1.8	ApopDetect Plus Peroxidase Assay	106
4.1.9	Human-Interleukin 16 ELISA	107
4.2	DISKUSSION DER ERGEBNISSE	107
4.2.1	Inkubation der Zellen mit Pharmaka	107
4.2.1.1	Lösungsmittel	107
4.2.1.2	Kurzdarstellung der Ergebnisse	108
4.2.1.3	Inkubation mit cAMP	111
4.2.1.4	Inkubation mit Forskolin	113
4.2.1.5	Inkubation mit Staurosporin	114
4.2.1.6	Inkubation mit H7 (Dihydrochlorid)	117
4.2.1.7	Inkubation mit PMA (Phorbol-12-Myristat-13-Acetat)	118
4.2.1.8	Inkubation mit Ocadaic Acid	119
4.2.1.9	Inkubation mit Ionomycin	120
4.2.1.10	Inkubation mit MAS-7	122
4.2.1.11	Inkubation mit Wespengift	124
4.2.2	Cell Death Detection ELISA	125
4.2.3	ApopDetect Plus Peroxidase Assay	127
4.2.4	Human-Interleukin 16 ELISA	127
4.3	SCHLUßFOLGERUNGEN	129
5	ZUSAMMENFASSUNG	133
6	LITERATURVERZEICHNIS	136
7	ANHANG	145
7.1	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	145
7.2	ABBILDUNGSVERZEICHNIS	148
7.3	TABELLENVERZEICHNIS	150

7.4	ERGEBNISTABELLEN DER STATISTISCHEN AUSWERTUNG	152
7.5	PUBLIKATIONSLISTE	159
7.6	DANKSAGUNG	160
7.7	LEBENS LAUF	161

1 Einleitung

1.1 Rheumatoide Arthritis (RA)

1.1.1 Allgemeines

Die rheumatoide Arthritis (auch chronische Polyarthritis, cP) ist eine chronisch-entzündliche Systemerkrankung. Es kommt in jedem Fall zu einer Manifestation an mehreren Gelenken, die zur progredienten Gelenkdestruktion führt, eine extraartikuläre Organmanifestation ist fakultativ. Man geht im Moment von einer multifaktoriellen Ätiologie aus. Die Pathogenese ist noch nicht vollständig aufgeklärt (siehe unten).

Die RA ist eine weltweit verbreitete Gelenkerkrankung, an der in Deutschland etwa 2 % der Bevölkerung leiden. Es erkranken drei- bis viermal so viele Frauen wie Männer, der Häufigkeitsgipfel der Ersterkrankung liegt bei Frauen im 4. Lebensjahrzehnt. Es besteht eine familiäre Häufung. In finnischen und britischen Studien konnte gezeigt werden, daß bei eineiigen Zwillingen eine Konkordanz von 12 - 15 Prozent für die RA vorliegt, bei zweieiigen Zwillingen liegt diese bei ca. 4 Prozent [2, 94]. 1989 konnte nachgewiesen werden, daß die rheumatoide Arthritis mit HLA Klasse II Genen assoziiert ist, insbesondere das HLA-Antigen DR4 wird von rund 70 % der RA-Patienten exprimiert (Häufigkeit bei Gesunden 25 %) [77, 90, 96, 109].

Diagnostische Kriterien des American College of Rheumatology (ACR) von 1987 [7]:

1. Morgensteifigkeit der Gelenke über mindestens eine Stunde Dauer
2. Arthritis von 3 oder mehr Gelenkbereichen
3. Arthritis eines der Gelenke an Hand- und Fingergelenken
4. Symmetrischer Befall desselben Gelenkbereiches
5. Rheumaknoten: subkutane Knoten an druckbelasteten Sehnen, z.B. über Knochenvorsprüngen, häufig an Extensorflächen oder juxtaartikulär
6. Nachweis von Rheumafaktoren im Serum (siehe unten)

7. Typische radiologische Veränderungen der betroffenen Gelenke:
gelenknahe Osteoporose und/ oder Erosionen

Wenn mindestens vier der sieben Kriterien erfüllt sind, und die Kriterien 1 - 4 über mindestens 6 Wochen bestehen, so liegt bei dem Patienten eine RA vor. Labordiagnostisch bestehen darüberhinaus meist unspezifische Entzündungszeichen, wie eine Erhöhung der BSG (Blutkörperchensenkungsgeschwindigkeit) oder des C-reaktiven Proteins.

Die oben erwähnten Rheumafaktoren (RF) sind Autoantikörper verschiedener Ig-Klassen (v.a. IgG), die gegen das Fc-Fragment des natürlich vorkommenden IgG-Antikörpers gerichtet sind. 70 - 80 % der RA-Patienten sind bzw. werden im Verlauf der Erkrankung seropositiv für diese Rheumafaktoren. Juvenile rheumatoide Arthritiden sind dagegen oft seronegativ. Es hat sich gezeigt, daß dauerhaft hohe RF-Konzentrationen im Serum eine eher ungünstige Prognose mitsichbringen [112].

1.1.2 Pathogenese der rheumatoiden Arthritis

Im Mittelpunkt der Veränderungen bei der rheumatoiden Arthritis steht folgende Trias:

- synoviale Hyperplasie
- chronische Entzündung
- pathologische Immunantwort

Die Zerstörung der Gelenkknorpel und der angrenzenden knöchernen Anteile stellt jedoch das wichtigste Charakteristikum dar.

Bereits in frühen Krankheitsstadien ist die Gelenkschleimhaut (Synovialis) entzündlich verändert. Es kommt zur Verdickung der oberflächlichsten Zellschichten der Synovialis, der sogenannten Pannusbildung [54, 66]. Die an dieser Hyperplasie beteiligten Zellen sind zum einen die makrophagenähnlichen Typ A-Synoviozyten und andererseits die synovialen Fibroblasten (Typ B-Synoviozyten). Fassbender et al. konnten zeigen, daß einige dieser Typ B-Synoviozyten morphologisch verändert sind, sie haben eine rundlichere Form

sowie helle große Zellkerne mit prominenten Nukleoli [39]. Es sind v.a. diese „transformierten“ Zellen, die für die tumorähnliche Invasion in den angrenzenden Knorpel verantwortlich sind [75].

Diese zelluläre Aktivierung hängt u.a. von einer veränderten Expression apoptoseregulierender Moleküle und Protoonkogene ab. Immunhistochemisch konnte gezeigt werden, daß die synovialen Fibroblasten der Invasionsfront den proapoptotischen CD95 (Fas/Apo-1)-Rezeptor nur zum Teil exprimieren, sondern im Gegenteil das apoptosehemmende bcl-2 exprimieren [36, 67, 98].

Übereinstimmend mit diesen Ergebnissen konnten in den obersten synovialen Schichten elektronenmikroskopisch kaum Zellen mit apoptosetypischen Merkmalen gefunden werden [67]. Eine Erklärung für die geringe Expression des CD95-Rezeptors auf synovialen Zellen könnte die dosisabhängige Hemmung der Fas-Expression durch IL-1 β sein [102]. Der IL-1 β -Spiegel ist bei RA-Patienten deutlich erhöht. Ein weiteres antiapoptotisches Molekül, das bei der RA vermehrt in den oberen Zellschichten von synovialen Fibroblasten exprimiert wird ist das Sentrin [43, 44]. Sentrin führt zur Hemmung der Fas/Apo-1-vermittelten Apoptose [80]. Bei Versuchen in unserem Labor zeigten sich synoviale Fibroblasten von RA-Patienten sogar resistent gegenüber Fas-vermittelter Apoptose [3].

Desweiteren konnte in Synovialbiopsien von RA-Patienten die Expression der Onkoproteine *ras* und *myc* nachgewiesen werden, die an der Regulation von Proliferations- und Differenzierungsprozessen beteiligt sind [100, 101]. Bei verstärkter Expression dieser Onkoproteine, z.B. im Rahmen von Neoplasien kann es daher zum Wachstum pathologischer Zellarten, z.B. Tumorzellen kommen. Im rheumatoiden Synovium könnte dieser Mechanismus für die Entstehung der oben erwähnten transformiert erscheinenden Zellen sowie für die verstärkte Angiogenese verantwortlich sein [39].

Diese veränderten Regulationsmechanismen sowie die Erkenntnis, daß die Proliferation der synovialen Fibroblasten relativ gering ist, legen den Schluß nahe, daß die synoviale Hyperplasie durch eine verminderte Apoptoserate und damit eine verlängerte Überlebenszeit der Fibroblasten bedingt ist [72, 78, 84].

Dadurch kommt es zu einer längeren Einwirkung von proinflammatorischen Zytokinen und gelenkdestruktiven matrixabbauenden Enzymen (s.u.).

Das Zytokinmuster bei der rheumatoiden Arthritis unterscheidet sich von demjenigen bei anderen Autoimmunkrankheiten. In der Synovialflüssigkeit und im synovialen Gewebe finden sich v.a. die proinflammatorischen Interleukine IL-1 α und IL-1 β , IL-6, IL-16 und IFN- α . Sie werden zum Großteil von aktivierten synovialen Fibroblasten und Makrophagen produziert. Die lymphozytären Zytokine IL-2, IL-4, TNF- β und IFN- γ sind nur in geringer Menge vorhanden [40]. Das IL-1 konnte als ein sehr wichtiges Zytokin bei der RA identifiziert werden. Es stimuliert in den Fibroblasten die Synthese von Substanzen, die zum Abbau des Knorpels führen. Hier sind v.a. die Matrixmetalloproteinasen (MMP) zu nennen, insbesondere MMP-1 und MMP-3 [40]. Desweiteren induziert IL-1 die Synthese und Sekretion von IL-16, einem weiteren wichtigen Interleukin bei der Pathogenese der RA.

In den letzten Jahren wurde zunehmend ein Augenmerk auf die Funktion eines weiteren Interleukins, IL-18 gerichtet. Auch IL-18 wurde in synovialen Gewebe von Rheumapatienten nachgewiesen [47, 69]. Auf diese beiden Interleukine wird in Kapitel 1.2 näher eingegangen.

Die pathologische Immunantwort bei der RA äußert sich einerseits in der starken Akkumulation von Lymphozyten im synovialen Gewebe, andererseits in der o.a. Produktion großer Mengen an Rheumafaktoren [112]. Außerdem geht man von einer Assoziation der Erkrankung mit dem HLA DR4-Molekül aus (siehe oben).

Die folgende Graphik zeigt zusammengefaßt die Pathophysiologie der Fibroblasten bei rheumatoider Arthritis.

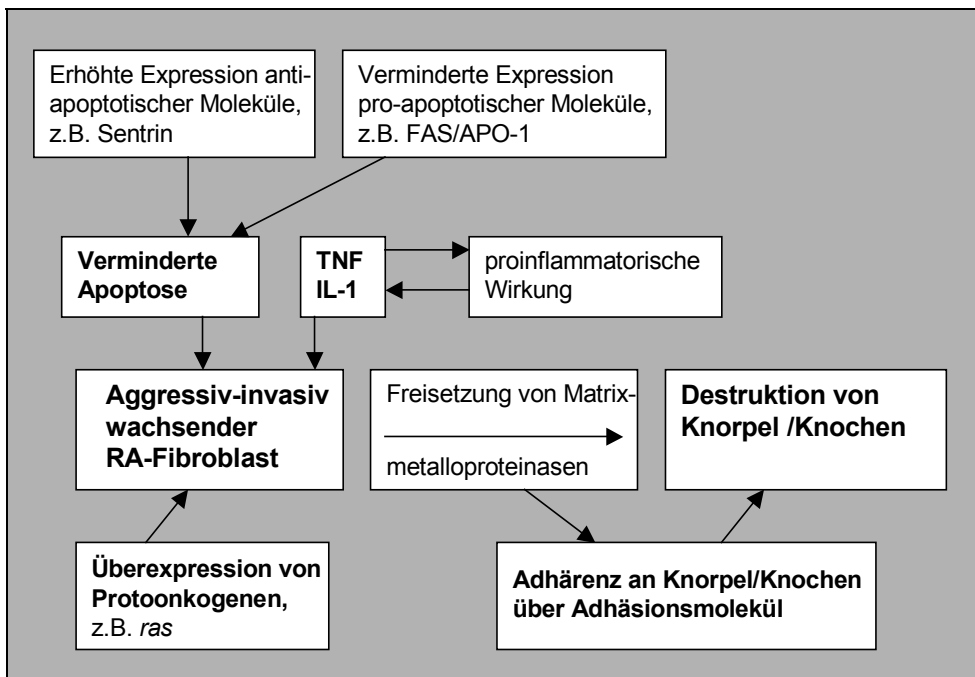


Abb. 1: Pathophysiologie der Fibroblasten bei rheumatoider Arthritis [36]

1.2 Zytokine

Zytokine sind lösliche Proteine, die hauptsächlich von Leukozyten produziert werden. Sie fungieren als Mediatoren, die die interzelluläre Verständigung im Organismus regeln.

Eine der Hauptaufgaben von Zytokinen ist die Induktion bzw. Regulation einer Immunreaktion, sowohl der zellulären als auch der unspezifischen humoralen.

Sie können eine proinflammatorische Wirkung haben, indem sie z.B. entzündliche Gebiete lokalisieren und durch Chemotaxis wichtige Entzündungszellen anlocken. Desweiteren sind sie in der Lage, bei Gewebeschäden Reparaturmechanismen in Gang zu setzen.

Zu den Zytokinen gehören eine Vielzahl von Stoffen, u.a. Interleukine, Lymphokine, Monokine, Wachstumsfaktoren und Interferone. Lymphokine werden von Lymphozyten, Monokine von Monozyten bzw. Makrophagen produziert.

Das Hauptaugenmerk in dieser Doktorarbeit soll auf den Interleukinen (IL) liegen.

Die Interleukine werden von den verschiedensten Leukozytenarten gebildet. Die Sekretion der Zytokine erfolgt nur während eines kurzen Zeitraumes und kann bei Bedarf innerhalb weniger Stunden stark ansteigen. Der Reiz zur Erhöhung der Transkriptionsrate kann dabei sowohl von der Zelle selbst (autokrin) als auch von benachbarten Zellen (parakrin) bzw. endokrin über den Blutweg kommen. Interleukine vermitteln ihre Wirkung wie alle Zytokine über spezifische Rezeptoren. Die Expression dieser Rezeptoren wird wiederum von den Zytokinen mitreguliert.

Interleukine wirken auf verschiedene Zelltypen ein und können dort die unterschiedlichsten Effekte auslösen. So sind z.B. die Interleukine 1, 4, 6 und 14 wichtige Faktoren der humoralen Abwehr. Bei Fieberreaktionen vermitteln v.a. IL-1 und IL-6. Die Interleukine 2, 4 und 15 sind die wichtigsten Wachstums- und Differenzierungsfaktoren für T- und B-Lymphozyten. IL-10 hemmt bestimmte T-Helfer-Zellen, die Interleukine 3 und 7 regen die Proliferation unreifer Leukozyten an und IL-9 und IL-11 fungieren als Wachstumsfaktoren für Blutstammzellen.

1.2.1 Interleukin 16

1982 entdeckten Center und Cruikshank erstmals ein Zytokin, das spezifisch auf T-Lymphozyten chemotaktisch wirkte. Sie beschrieben das Protein darum zunächst als „lymphocyte chemoattractant factor“ (LCF) und erst später als Interleukin 16 [20, 27].

IL-16 wird als Vorläuferprotein von ruhenden und stimulierten CD8⁺ T-Zellen [9] und in geringem Ausmaß auch von aktivierten CD4⁺ T-Zellen [21] translatiert und post-translationell modifiziert. Proteolyse bei Asp510 durch Caspase 3 erzeugt aus dem circa 67 kDa schweren, 631 Aminosäuren umfassenden Vorläuferprotein C-terminal ein 121 Aminosäuren großes reifes Protein [113]. Gelelektrophorese unter denaturierenden Bedingungen und Immunoblot weisen ein Protein mit einem Molekulargewicht von rund 17 kDa aus, wobei die

biologische Aktivität nach Gelsiebchromatographie bei ungefähr 55 kDa liegt. Man geht daher davon aus, daß IL-16 als Monomer sezerniert wird und dann zu einem Homotetramer multimerisiert [21, 27, 30]. Das IL-16-Protein zeigt keinerlei Ähnlichkeiten mit anderen Interleukinen bzw. Zytokinen. Lediglich das processing durch Caspasen ist ähnlich wie bei IL-1 oder IL-8 [22]. Interleukin 16 wurde bisher vor allem in lymphatischem Gewebe [9], aber auch in eosinophilen Zellen, Epithelien der Luftwege [11], Pankreas, Magen, Kleinhirn und im Knochenmark nachgewiesen [31].

Interleukin 16 wird, wie erwähnt von ruhenden $CD8^+$ T-Zellen und nach deren Stimulation mit Antigenen, Mitogenen bzw. Serotonin oder Histamin freigesetzt [21, 60, 61]. Bei Stimulation von Mastzellen durch Serotonin und Histamin ist keine de novo Proteinsynthese notwendig, da IL-16 in diesen Zellen in ausreichendem Maße in biologisch aktiver Form gelagert wird. Bei den $CD4^+$ T-Zellen dagegen führt nur die Stimulation mit Antigenen bzw. Mitogenen zur Synthese des reifen Proteins, Histamin und Serotonin zeigen keine Wirkung. Desweiteren erfolgt keine Speicherung von aktivem Protein in $CD4^+$ T-Zellen.

IL-16 ist ein natürlicher löslicher Ligand des CD4-Moleküls, welches sich z.B. auf der Oberfläche von T-Helfer-Zellen befindet. Es wirkt chemotaktisch und chemokinetisch auf ruhende wie auf aktivierte $CD4^+$ T-Helferzellen [19]. Die chemotaktische Aktivität ist dabei proportional zur Menge an CD4-Molekülen auf der Zelloberfläche [21]. Auf Makrophagen, Monozyten und Eosinophile wirkt es hauptsächlich chemotaktisch [19, 28, 86]. IL-16 führt zu einer Proliferation der T-Helferzellen, indem es erstens deren Übergang von der G0-Ruhephase in die G1-Aktivphase des Zellzyklus induziert und zweitens die Expression von Interleukin-2-Rezeptoren auf der Zellmembran anregt [6]. IL-2 ist der wichtigste Wachstumsfaktor für T-Zellen [21]. Bei Makrophagen wird die Expression von MHC Klasse II Molekülen induziert.

Wichtig ist desweiteren, daß $CD4^+$ T-Zellen, die mit IL-16 zur Proliferation, Zytokinsekretion und Chemotaxis angeregt wurden anschließend nicht mehr auf andere Stimulation, z.B. durch Antigene reagieren. Das bedeutet, daß die $CD4^+$ Zelle entweder eine proinflammatorische IL-16-vermittelte Rolle spielt, in der die Differenzierung der T-Zellen zu immunkompetenten Effektorzellen gehemmt

wird oder aber nach Antigenkontakt eine Rolle in der Immunreaktion übernimmt. IL-16 bewirkt also eine T-Zell-Anergie [31].

Walker et al. haben 1986 einen von CD8⁺ T-Zellen produzierten Faktor entdeckt, der die Replikation des Humanen Immunschwäche Virus (HIV)-1 unterdrückt [105]. 1995 konnten Baier et al. zeigen, daß es sich bei diesem Faktor um Interleukin 16 handelt [8]. IL-16 inhibiert die Transkription von HIV-1 über CD4-Interaktion, was zur Induktion eines viralen Repressors führt [22]. Außerdem bedingen hohe IL-16-Titer eine antigenunabhängige Proliferation der CD4⁺ T-Zellen, so daß deren Zahl in anfänglichen Krankheitsstadien weitgehend aufrechterhalten werden kann [22]. Bei Untersuchungen ließen sich 1999 im Serum von Patienten in der asymptomatischen Phase erhöhte IL-16-Titer nachweisen, die im Verlauf der Krankheit deutlich abgesunken sind [6]. Der IL-16-Titer korreliert daher bei der HIV-Infektion mit der Progression der Erkrankung [22].

Auch bei Asthma bronchiale spielen erhöhte IL-16-Titer eine Rolle [11, 62].

Es läßt sich jedoch nicht bei allen entzündlichen Prozessen IL-16 vermehrt nachweisen. So zeigten Lahrtz et al. 1997, daß bei Patienten mit viraler Meningitis keine erhöhten IL-16-Titer zu finden waren [63].

1.2.2 Interleukin 16 bei rheumatoider Arthritis

In der Synovialmembran von Patienten mit rheumatoider Arthritis kommt es zu einer massiven Infiltration verschiedener Zellen. Neben aktivierten ortsansässigen synovialen Fibroblasten finden sich auch Makrophagen und B-Zellen, den größten Teil machen allerdings CD4⁺ T-Zellen aus [45, 107]. Die erhebliche Einwanderung von CD4⁺ T-Zellen legte den Schluß nahe, daß IL-16 aufgrund seiner stark chemotaktischen Wirkung auf diese Zellen bei der Entstehung von Rheuma eine Rolle spielt.

1998 fanden Franz et al. heraus, daß in der synovialen Flüssigkeit von Rheumapatienten erhöhte IL-16-Titer im Vergleich zu Osteoarthrosepatienten bzw. Patienten mit Arthritis anderer Genese und zur Kontrollgruppe vorzufinden waren [42]. Blaschke et al. bestätigten 2000 dieses Ergebnis [13]. Mittels In-

Situ-Hybridisierung zeigten Franz et al. damals, daß synoviale Fibroblasten die Hauptproduzenten von IL-16 in der verdickten Synovialmembran sind. Die Fibroblasten werden demnach vor Ort aktiviert, produzieren und sezernieren daraufhin IL-16, was in der Folge zu einem Einwandern von vielen CD4⁺ T-Zellen führt. Desweiteren zeigten sie, daß bei Patienten, die erst seit kurzem (höchstens ein Jahr) an rheumatoider Arthritis litten, höhere IL-16-Spiegel in der synovialen Flüssigkeit vorlagen als bei dem Rest der untersuchten RA-Patienten. Bei diesen Patienten korrelierten hohe IL-16-Titer mit der Dauer der Morgensteifigkeit, nicht aber mit den Entzündungsparametern bzw. den klinischen Zeichen (z.B. geschwollene Gelenke). Sie stellten die Hypothese auf, daß v.a. in frühen Krankheitsstadien eine erhöhte IL-16-Produktion stattfindet, die für ein Anlocken der Entzündungszellen in das Gelenk sorgt und somit erst den massiven Entzündungsprozeß in Gang bringt.

Cruikshank et al. demonstrierten, daß sich Interleukin 16 durch IL-1 β induzieren läßt [29, 30]. Da bei Patienten mit rheumatoider Arthritis in der synovialen Flüssigkeit erhöhte IL-1 β -Titer nachzuweisen waren und synoviale Makrophagen IL-1 β produzieren [16], könnte auch dies ein Grund für die erhöhten IL-16-Titer im rheumatischen Gelenk sein.

Klimiuk et al. beschrieben IL-16 1999 als ein antiinflammatorisches Zytokin [59]. Sie verwendeten immundefiziente SCID-Mäuse, denen sie CD8⁺ T-Zellen aus Gewebe von Rheumapatienten transplantiert hatten. Dieser Transfer von CD8⁺ Zellen führte zu einer Supprimierung der T-Zell-Funktion und zu einer stark verminderten Produktion von proinflammatorischen Zytokinen wie IL-1 β , IFN- γ und TNF- α . Da CD8⁺ T-Zellen der Hauptproduzent von IL-16 sind, stellten sie die Hypothese auf, daß die o.a. Wirkungen auf das IL-16 zurückzuführen sind. Deshalb behandelten sie die SCID-Mäuse mit IL-16 und konnten tatsächlich eine deutliche Inhibierung der Transkription der oben erwähnten proinflammatorischen Zytokine nachweisen. Sie gehen also davon aus, daß bei RA-Patienten infiltrierende CD8⁺ T-Zellen eine anti-inflammatorische Wirkung zeigen, die über IL-16 vermittelt wird.

1.2.3 Interleukin 18

Interleukin 18 ist ein erst seit kurzem beschriebenes Mitglied aus der IL-1-Zytokin-Familie. Ursprünglich hat es den Namen interferon- γ (IFN- γ) inducing factor (IGIF) gehabt, da es zunächst als starker Induktor dieses Chemokins aufgefallen war [103]. Man hat bisher herausgefunden, daß Interleukin-18 an der Regulation des angeborenen wie des erworbenen Immunsystems mitwirkt [4, 69]. Erst kürzlich konnte nachgewiesen werden, daß eine Überexpression dieses Zytokins nicht nur eine gesteigerte Synthese Th1-abgeleiteter Zytokine bedingt, sondern daß auch Th2-abgeleitete Zytokine vermehrt produziert werden [55]. Darüberhinaus scheint IL-18 bei chronischen Entzündungen, z.B. im Rahmen von Autoimmunerkrankungen wie der rheumatoiden Arthritis (siehe unten) oder dem Morbus Crohn eine proinflammatorische Rolle zu spielen [32, 47, 69, 73, 85].

Das Vorläufermolekül Pro-IL-18 (ca. 24 kDa) wird von vielen Zellarten exprimiert, vor allem aber von Makrophagen bzw. Monozyten. Daneben enthalten auch Kupffer-Zellen, Keratinozyten, artikuläre Chondrozyten, Osteoblasten sowie synoviale Fibroblasten Pro-IL-18 [35]. Die Caspase 1, ein IL-1 β -Konversionsenzym, überführt das 192-193 Aminosäuren große Vorläufermolekül in das reife IL-18-Glykoprotein (18 kDa) [38]. IL-18 bindet an einen heterodimeren Rezeptor (IL-18R), der auf Zellen des angeborenen und des erworbenen Immunsystems exprimiert wird [4]. Desweiteren gibt es das IL-18-bindende Protein (IL18BP), das in höheren Konzentrationen im extrazellulären Milieu vorzufinden ist und dort die Wirkung des IL-18 neutralisieren kann [58]. Durch die Caspase 3 können sowohl das reife Protein als auch das Vorläufermolekül in die inaktive Form überführt werden [5]. IL-18 beeinflusst die Aktivität von T- und B-Zellen, natürlichen Killerzellen (NK), Makrophagen und Chondrozyten. Die Beeinflussung der T-Zellen, v.a. der T-Helfer-Zellen und der NKs erfolgt hauptsächlich in Verbindung mit IL-12. Bei Untersuchungen mit IL-18-knockout-Mäusen hat sich gezeigt, daß diese nach Infektion mit einem intrazellulären Erreger, z.B. *Staphylococcus aureus* eine schlechtere T-Zell-Antwort generieren als Kontrolltiere. Eine weitere Verschlechterung der Abwehrsituation konnte an IL-12/IL-18-knockout-Mäusen

nachgewiesen werden [14, 56, 99, 106]. Man geht davon aus, daß die synergistische Wirkung durch eine gegenseitige Hochregulierung der jeweiligen Rezeptoren bedingt ist [18, 23].

Interleukin 18 induziert die Produktion von proinflammatorischen Chemokinen, wie IFN- γ , TNF- α und GM-CSF (granulocyte-macrophage colony-stimulating factor) in verschiedenen Zellen. Durch gemeinsame Wirkung von IL-18 und IL-12 wird diese Wirkung verstärkt, durch IL-10 und TGF- β (transforming growth factor β) abgeschwächt [48]. Der Produktion von IFN- γ kommt dabei eine entscheidende Rolle zu, da dieser Faktor bei der Abwehr von Erregern jeglicher Art wichtig ist. Er führt zur Aktivierung von Makrophagen und zur Differenzierung von B- und T-Zellen in immunkompetente Zellen [93]. So entwickelten IFN- γ -Gen-defiziente Mäuse und IL-18-knockout-Mäuse eine schwere Form der Miliartuberkulose mit großen Granulomen nach Infektion mit *M. tuberculosis* verglichen mit Kontrolltieren [97, 25, 41]. Nach subkutaner Applikation von IL-18 zeigte sich eine deutliche Reduktion der granulomatösen Veränderungen, was durch eine Induktion der IFN- γ -Produktion erklärt werden kann. Der Einfluß von IL-18 auf die IFN- γ -Produktion erfolgt unabhängig von Interleukin 12 [37].

Osaki et al. entdeckten eine antitumoröse Wirkung von IL-18 [71, 82, 83]. Sie zeigten an tumortragenden Mäusen, daß die peritumorale Injektion von rekombinantem IL-18 nach rund 21 Tagen zu einer totalen Elimination der Tumormasse führt.

Eine andere Arbeitsgruppe vermutet eine Inhibierung der Tumorangiogenese durch synergistische Wirkung von IL-18 und IL-12 als Ursache der antitumorösen Eigenschaften dieser beiden Zytokine [26].

1.2.4 Interleukin 18 bei rheumatoider Arthritis

In Synovialgewebe von Patienten mit rheumatoider Arthritis konnte IL-18-mRNA und IL-18-Protein nachgewiesen werden [47]. Die ebenfalls untersuchten Gewebeproben von Patienten mit Osteoarthrose zeigten eine deutlich geringere IL-18-Expression. Immunhistochemisch ließen sich CD68⁺ Makrophagen und

synoviale Fibroblasten als die exprimierenden Zellen identifizieren. Desweiteren gelang der Nachweis von IL-18-Rezeptoren auf synovialen Makrophagen und Lymphozyten mittels RT-PCR [47, 69].

IL-18 führt wie bereits erwähnt zu einer Expression von TNF- α (v.a. in CD14⁺ Makrophagen) [47]. Dieses Zytokin ist entscheidend an der Pathogenese der rheumatoiden Arthritis beteiligt. Die kombinierte Gabe von IL-18 und IL-12 führte in vitro zu einer verstärkten TNF- α -Synthese [47]. In Experimenten konnte beobachtet werden, daß IL-18-defiziente Mäuse einen späteren Beginn und milderen Verlauf der Collagen Typ II (CII)-induzierten Arthritis zeigten [64]. Ursächlich hierfür sind vermutlich die deutlich reduzierten TNF- α -Konzentrationen im Serum und in der Milz dieser Tiere.

Eine weitere Wirkung von IL-18 ist eine Steigerung der NO-Freisetzung über die Induktion der nitric oxide synthase (iNOS). Da NO die Caspase 1 inhibiert, ist dadurch eine mögliche Regulierung der IL-18-Prozessierung gegeben [69]. Auch hier zeigte sich eine synergistische Wirkung von IL-18 und IL-12 [47].

Über eine verminderte Proliferation der artikulären Chondrozyten führt IL-18 zur Knorpeldestruktion [81].

Eine protektive Wirkung von IL-18 bei der rheumatoiden Arthritis wird zum einen durch die direkte Supprimierung der Angiogenese im entzündeten Gelenk bedingt [17, 26]. Andererseits verhindert GM-CSF die Reifung von Osteoklasten, was zu einer Verzögerung der Knochenerosion beiträgt [69].

Für die Induktion einer signifikanten IL-18-mRNA- und -Protein-Expression in synovialen Fibroblasten von Rheumapatienten sind hauptsächlich IL-1 β und TNF- α verantwortlich [47, 69].

Bemerkenswert ist, daß trotz vorhandener IL-18-Expression im Synovium die IFN- γ -Expression relativ gering ist [69]. Möglicherweise sind die im RA-Gelenk ebenfalls vorhandenen Zytokine IL-10 und TGF- β , die ja die Synthese von IFN- γ vermindern daran beteiligt. Man muß also davon ausgehen, daß IL-18 bei der RA direkte Effekte auf einzelne Zellen ausübt (Makrophagen, Lymphozyten und Chondrozyten), ohne daß IFN- γ hier entscheidend beteiligt ist [68].

1.3 Apoptose

Unter Apoptose (auch Apoptosis) versteht man den programmierten Selbstmord einer Zelle, der entweder durch interne oder externe Stimulation ausgelöst wird. Sie dient der Anpassung des Gewebes an wechselnde Belastungen, der Eliminierung überflüssig gewordener Zellen, wie beispielsweise bei der Embryonalentwicklung sowie der Entfernung schädlicher Zellen, z.B. Tumorzellen, virusbefallener Zellen oder immunkompetenter Zellen, die sich gegen körpereigene Antigene richten. Außerdem soll sie in Geweben, die einer ständigen Erneuerung unterliegen (z.B. Haut, Darm, Blut) ein Gleichgewicht aufrechterhalten.

Um die Apoptose in Gang zu bringen, ist die Aktivierung einer Enzymkaskade erforderlich. Dies kann einerseits durch die Bindung eines Liganden an den sogenannten „Todesrezeptor“ der Zelle (z.B. CD95-Rezeptor) stattfinden oder bei starkem Zellstreß, mit folgender Schädigung der Mitochondrien, durch die Freisetzung von Cytochrom c erfolgen. Eine zentrale Rolle spielen hierbei die sogenannten Caspasen (cysteine aspartate protein cleaving enzyme), die eine Spaltung zellulärer und nukleärer Proteine bewirken. So werden u.a. Proteine des Zytoskeletts und Adhäsionsmoleküle gespalten, was zum Loslösen aus dem Verband und anschließender Abrundung der Zelle führt. Durch die Aktivierung einer Endonuklease kommt es zur Fragmentierung der DNA. Die Zelle schrumpft allmählich, wird von Makrophagen erkannt und phagozytiert. Da es nicht zur Freisetzung von intrazellulären Makromolekülen kommt, wird keine Entzündungsreaktion ausgelöst.

Im Normalfall unterliegt die Apoptose einem fein abgestimmten Regulationsmechanismus. Auslöser der Apoptose sind u.a. der Tumornekrosefaktor ($\text{TNF}\alpha$), eine Aktivierung des CD95 (FAS/APO-1)-Rezeptors oder der Entzug von Wachstumsfaktoren. Wichtig ist auch die Regulation über das Suppressor-gen p53. Bei DNA-Schäden versucht p53 zunächst den Schaden zu beheben, erst wenn dies nicht gelingt, wird die Apoptose eingeleitet. Auch Ischämien, Toxine oder Strahlen können dann zur Apoptose führen, wenn die Zellen nicht so stark geschädigt sind, daß sie sofort nekrotisch werden.

Eine antiapoptotische Wirkung zeigen z.B. die intrazellulären bcl-Proteine bzw. Sentrin, ein kürzlich entdecktes Molekül, das die CD95-vermittelte Apoptose inhibiert [80].

Ist das Apoptose-Gleichgewicht entscheidend gestört, kann dies zu einer Vielzahl von Erkrankungen führen, u.a. zu Tumoren oder Autoimmunerkrankungen. Nach dem neuesten Stand der Forschung spielt die Apoptose auch bei der Pathogenese der rheumatoiden Arthritis eine Rolle.

1.4 Nekrose

Unter Nekrose versteht man die morphologischen Veränderungen einer Zelle, die nach deren Tod in Folge einer schweren örtlichen Stoffwechselstörung auftreten. Beispiele hierfür sind u.a. Ischämie, Hypoxie, Hypoglykämie oder Vergiftungen (z.B. mit Oxidantien).

Die verschiedenen Auslöser bewirken in der Regel einen Energiemangel der Zelle, welcher dann zu Störungen der intrazellulären Na^+ -Homöostase und konsekutiv zum Anschwellen und letztlich Platzen der Zelle führt. Außerdem ist in diesem Fall die Zelle anfälliger für oxidative Schäden, z.B. durch O_2 -Radikale. Diese können zur Zerstörung der Zellmembran führen. Es kommt also bei der Nekrose, anders als bei der Apoptose zum Verlust der Zellintegrität und damit zur Freisetzung intrazellulärer Makromoleküle in den Extrazellulärraum. Dadurch kommt es zur Aktivierung des Immunsystems und einer anschließenden Entzündungsreaktion.

1.5 Zellkultur-Modell

In der medizinischen Forschung werden eine Vielzahl klinischer Studien und Tierversuche durchgeführt, um natürliche wie auch experimentell beeinflusste Vorgänge im menschlichen Organismus zu untersuchen.

Beide Methoden bringen jedoch ethische Probleme mit sich, außerdem sind sie für die Grundlagenforschung weniger gut geeignet, u.a. auch weil sie einer Reihe schwer bzw. nicht beeinflussbarer Parameter unterliegen.

Deshalb werden für viele Fragestellungen heutzutage Zellkulturen herangezogen. Dabei wird einem humanen Spender Gewebe entnommen, welches allerdings aus rein medizinischer Indikation entfernt werden muß und in vitro dann unter ähnlichen Bedingungen wie im menschlichen Organismus wachsen soll. Das Nährmedium, in dem das Gewebe kultiviert wird, enthält all die Komponenten, die für das Wachstum nötig sind und die im menschlichen Körper aus dem Blut bezogen werden. Trotz einiger Unterschiede zwischen der in vivo Situation und der Zellkultur hat sich die Aussagekraft der Ergebnisse bisher als sehr hoch erwiesen.

Bei dem in dieser Doktorarbeit zugrundeliegenden in vitro-Modell wurden Plastik-Kulturflaschen eingesetzt, auf deren Boden die Zellen adhärent wachsen (zweidimensional). Wählt man für die Versuche nun standardisierte Bedingungen, so läßt sich eine einzelne Größe verändern und deren Auswirkung auf die Kultur beobachten. Es wurde sowohl mit Primärkulturen als auch mit etablierten Zelllinien gearbeitet.

1.6 Fragestellung und Zielsetzung

In Vorarbeiten hat sich gezeigt, daß synoviale Fibroblasten in vitro spontan IL-16-mRNA exprimieren und daß die IL-16-Transkription und -Sekretion durch verschiedene Pharmaka beeinflusst werden kann. Ein spezielles Augenmerk war dabei auf mögliche Unterschiede im Verhalten von synovialen Rheuma-Fibroblasten verglichen mit Fibroblasten von Arthrosepatienten gerichtet. Haut- und Vorhautfibroblasten sowie immortalisierte Fibroblasten dienten als Vergleichskontrollen. Durch die Behandlung der Zellen mit den einzelnen Pharmaka wurde in verschiedene klassische Signaltransduktionswege eingegriffen, um so Rückschlüsse auf Steuerungsmöglichkeiten der IL-16-Transkription ziehen zu können, welche für neue Therapieoptionen bei der Behandlung der rheumatoiden Arthritis von Bedeutung sein könnten. Die Genprodukte wurden mit der herkömmlichen RT-PCR-Methode amplifiziert und mittels Gelelektrophorese (Ethidiumbromid) dargestellt. Der Nachteil dieser Methode ist aber, daß sie höchstens als semiquantitativ gewertet werden darf. Deshalb

sollte im Rahmen dieser Doktorarbeit anhand neuer Fibroblasten-Kulturen, die mit den gleichen Pharmaka behandelt wurden, die Menge des transkribierten Interleukin 16s mit dem LightCycler exakt quantifiziert werden.

Bei der Untersuchung von dermalen Fibroblasten eines Rheumapatienten hat sich in den Vorarbeiten herausgestellt, daß das Mastoparan-Analogon MAS-7 nach 24 h zu einer deutlichen Steigerung des spontan schwachen IL-16-Signals führt. MAS-7 ist homolog zu den Peptiden im Wespengift (= Mastoparan) und aktiviert die Pertussis-Toxin-sensitiven G-Proteine. Eine weitere Fragestellung dieser Doktorarbeit war nun, anhand mehrerer Hautfibroblasten-Kulturen zu überprüfen (mittels LightCycler), ob die Aktivierung von G-Proteinen zuverlässig eine erhöhte IL-16-Genexpression bewirkt. Außerdem sollten die Hautfibroblasten mit Wespengift behandelt werden, um zu beobachten, ob auch hier eine Steigerung der IL-16 mRNA-Expression erfolgt, was eine Beteiligung von Interleukin 16 an der allergischen Reaktion nach Wespen- oder Bienenstichen vermuten lassen würde. Da, wie bereits erwähnt auch bei anderen allergischen Prozessen, z.B. bei Asthma bronchiale ein Mitwirken von IL-16 an der Pathogenese diskutiert wird, erscheint diese Möglichkeit durchaus plausibel.

Da in letzter Zeit auch die Rolle von Interleukin 18 bei der rheumatoiden Arthritis zunehmend erforscht wird und es sich gezeigt hat, daß synoviale Fibroblasten an der Produktion und Sekretion dieses Zytokins beteiligt sind (siehe Kapitel 1.2.4), sollte an einigen Kulturen, wie für das IL-16 auch die Beeinflussung der Transkription und Sekretion durch Modulation verschiedener Signalkaskaden untersucht werden. Die klinische Relevanz lag auch hier in der Abklärung möglicher zukünftiger Behandlungsstrategien der rheumatoiden Arthritis.

Außerdem war von Interesse, ob sich Parallelen zwischen IL-16 und IL-18 bezüglich der Regulationsmechanismen beobachten ließen.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte und Verbrauchsmaterialien

6-Well-Makroplatten (Fa. Greiner, Nürtingen, BRD)
24-Well-Platten (Fa. Greiner)
96-Well-Mikroplatten (Fa. Greiner)
Absaugpumpe (Suc-O-Mat; Fa. Bachofer, Reutlingen, BRD)
Bechergläser (verschiedene Größen; Fa. Schott, BRD)
Brutschrank (CO₂ Auto-Zero; Fa. Heraeus, Hanau, BRD)
Einmalskalpelle (Cutfix; Fa. Braun Medical AG, Melsungen, Schweiz)
Eppendorf-Cups (0,5 ml, 1,8 ml; Fa. Eppendorf, Hamburg, BRD)
Erlenmeyerkolben (verschiedene Größen; Fa. Schott, BRD)
Farbdiafilm (Kodak Ektachrome 100 HC; Kodak, Stuttgart; BRD)
Feinwaage (Sartorius handy H51; Fa. Sartorius, Göttingen, BRD)
Gefrierschränke (Fa. Bosch, Stuttgart, BRD)
Gelkammer (Fa. Appligene, Heidelberg, BRD)
Glasflaschen (verschiedene Größen; Fa. Schott, BRD)
Hämatozytometer (Bright Line; Fa. Assistant, Großbritannien)
Insulinspritzen (1 ml; Fa. Braun Medical AG)
Kanülen (Sterican 0,45 x 25 mm, 26 G, Fa. Braun Medical AG)
Kühlschränke (Fa. Bosch)
Kulturflaschen (50ml, 250 ml; Fa. Costar, Cambridge, Großbritannien)
Latexhandschuhe (Fa. Beiersdorf, Hamburg, BRD)
Lichtmikroskop (Fluovort FS Mikroskop, Fa. Leitz, BRD)
LightCycler (Fa. Roche, Heidelberg, BRD)
LightCycler Capillaries (Fa. Böhlinger Mannheim, Mannheim, BRD)
Mikrowellenofen (Fa. Bosch)
PCR-Block (Typ UNO II; Fa. Biometra, Göttingen, BRD)
Perfusorspritzen (25 ml, 50 ml; Fa. Braun Medical AG)

Petrischalen (Cellstar, 94/16 mm, steril; Fa. Greiner)
Photometer (Spectrophotometer V-530; Fa. Jasco, Groß Umstadt, BRD)
Pinzetten (Fa. Aesculap, Tuttlingen, BRD)
Pipetten (Firmen Eppendorf, Falcon, Greiner)
Pipettierhilfen (accu-jet; Fa. Brand)
Pipettenspitzen (Fa. Biozym)
PP-Röhrchen steril (50 ml, 15 ml; Fa. Greiner)
Schüttler (Ika MTS4; Fa. Bachofer)
Software (AnalySIS; Fa. Soft-Imaging Software, Münster, BRD)
Sterilbank (Gelaire Laminar Air Flow; Fa. BDK, Sonnenbühl, BRD)
Sterilfilter (Millex GV 0,22 µm; Fa. Millipore, Molsheim, Frankreich)
Sterilfilter (Millisart 0,45 µm; Fa. Sartorius)
Stickstofftank (Taylor Wharton Cryogenics; Fa. Bachofer)
Urinbecher steril mit Deckel (Fa. Sarstedt, Nümbrecht, BRD)
Vario-Orthomat zur Fotografie (Fa. Leitz)
Wärmeplatte mit Magnetrührer (Ikamag RCT; Janke & K.; Staufen, BRD)
Wasserbad (DT Hetotherm; Fa. Bachofer)
Zentrifugen (Firmen Beckmann, Eppendorf)

Außerdem wurde die allgemeine Laborausrüstung mit Personalcomputern und Druckern eingesetzt.

2.1.2 Chemikalien, Reagenzien und Medien

Adenosine 3',5'-cyclic Monophosphate, N⁶,O^{2'}-Dibutyryl-, Sodium Salt
(Fa. Calbiochem)
Agarose (Fa. Merck, Darmstadt, BRD)
Albumin, Bovine (100 g, Fa. Sigma)
Antimykotikum Fungizone (Amphotericin B; Fa. Gibco, Karlsruhe, BRD)
ApopDetect Plus Peroxidase Kit (Fa. Oncor Appligene)
AS02 (anti-Fibroblasten-AK, Maus IgG1, Fa. Dianova, Hamburg, BRD)
Basenpaarmarker (100 bp DNA Ladder; Fa. Gibco)
Beta-Mercaptoethanol (Fa. BioRad, München, BRD)

Borsäure 1 M (Fa. Merck)
Bromophenolblau (10 %ig in Aqua dest.)
Cell Death Detection ELISA (Fa. Roche)
cDNA-Synthese-Kit (Adv. RT-for-PCR Kit; Fa. Clontech, Palo Alto, USA)
Collagenase XI (Fa. Sigma, Taufkirchen, BRD)
DAB-Puffertabletten (Diaminobenzidin; Fa. Merck)
DAKO-Kit (LSAB2 System Alkaline Phosphatase, Fa. DAKO)
Desinfektionslösung Antiinfect Liquid (Fa. Schülke & M., Norderstedt, BRD)
Desinfektionslösung Barrycidal 36 (Fa. Schröder, Stuttgart, BRD)
Dimethylsulfoxid (Fa. Merck)
Dispase II (2,4 units/ml; Fa. Roche)
EDTA-Natrium (Titriplex III) (Fa. Merck)
Ethidiumbromid (10 mg/ml; Fa. Amersham, Braunschweig, BRD)
Fötales Serum (Myoclon Super Plus Fötales Rinderserum; Fa. Gibco)
Forskolin (Fa. Calbiochem)
Gentamicin Sulfat (10 mg/ml, Fa. Sigma)
Glycerin
H7, Dihydrochloride (Fa. Calbiochem)
Human-Interleukin-16 ELISA (Fa. Roche)
Human-Interleukin-1 β (2 μ g/ml, Fa. Roche)
Insulin-Transferrin-Selen-G Supplement 100X (Fa. Gibco)
Ki-M6, monoklonaler Antikörper gegen CD-68 (10 μ g/ml, Fa. BMA)
LightCycler Fast Start DNA Master SybrGreen I Kit (Fa. Roche)
LightCycler Primer Set (Human IL-16; Fa. Search LC, Heidelberg, BRD)
LightCycler Primer Set (Human IL-18; Fa. Search LC, Heidelberg, BRD)
LightCycler Primer Set (Human GAPDH; Fa. Search LC, Heidelberg, BRD)
Mas-7, Mastoparan-Analogon (Fa. Calbiochem)
Mercaptoethanol (Fa. Bio-Rad)
Nährmedium (DMEM /F12 (1:1) Medium flüssig, Fa. Gibco)
Natriumacetat (Fa. Merck)
Okadaic Acid (Fa. Calbiochem)
Penicillin/Streptomycin-Lösung (10000 E/10000 μ g/ml; Fa. Gibco)

Phenylhydrazin (5 ml, Fa. Merck)
Phosphatgepufferte Kochsalzlösung ohne Ca^{2+} und Mg^{2+} (Fa. Gibco)
Phorbol-12-Myristate-13-Acetate (Fa. Calbiochem)
Reless Wespengift (Fa. Alk-Scherax)
Rnase Free DNase Set (Fa. Quiagen)
RNeasy Mini Kit (Fa. Qiagen)
Staurosporin (Fa. Calbiochem)
TRIZMA Base (Fa. Sigma)
Trypanblau-Lösung (0,4 %; Fa. Sigma)
Trypsin-EDTA-Lösung (Fa. Gibco)
Tylosin Tartrat (8 mg/ml, Fa. Sigma)
Vitaminlösung (MEM Vitamine 100x, flüssig; Fa. Gibco)
Xylene cyanol (10 %ig in Aqua dest.)

Die anderen üblichen Laborchemikalien (wie Ethanol, destilliertes Wasser usw.) wurden von den Firmen BioRad, Fluka, Merck, Roth, Sigma und von der Universitätsapothek Tübingen bezogen.

2.1.3 Gekaufte Zelllinien

1. Normal Human Dermal Fibroblasts (Neonatal Skin; Fa. Bio Whittaker):

- NHDF Charge 6455, 1. Passage
- NHDF Charge 6381, 1. Passage
- NHDF Charge 6499, 1. Passage

2. Normal Human Dermal Fibroblasts (Adult Skin; Fa. Bio Whittaker)

- NHDF Charge 6448, 1. Passage

2.1.4 Humanes Gewebe

Das Gewebe wurde den Patienten nach schriftlicher Einverständniserklärung in der orthopädischen Uniklinik Tübingen entnommen. Die Genehmigung durch

die Ethikkommission lag zu diesem Zeitpunkt vor. Es wurde entweder Haut oder Synovia, in manchen Fällen auch beides gewonnen.

Für diese Studie wurden Biopsate von insgesamt sechs Patienten eingesetzt. Drei Patienten (alle männlich) wurden in der Klinik wegen einer Coxarthrose operativ behandelt. Bei einer Patientin wurde wegen eines Knorpelschadens am Knie eine Arthroskopie durchgeführt. Ein Patient erhielt eine Metallentfernung am Oberschenkel sowie eine Exostosenabtragung des Unterschenkels. Eine Patientin wurde wegen schlechter Wundheilung bei Z.n. Hüftendoprothesen-Operation nachoperiert.

Die Patienten werden aus Gründen des Datenschutzes im weiteren nur mit Kürzeln bezeichnet. Im folgenden eine kurze Beschreibung der einzelnen Patienten:

- SLF: - Haut und Synovia
- Diagnose: Dysplasiecoxarthrose
- Alter: 49 Jahre
- Geschlecht: männlich
- SRF: - Haut und Synovia
- Diagnose: Coxarthrose
- Alter: 46 Jahre
- Geschlecht: männlich
- HTF: - Haut und Synovia
- Diagnose: Knorpelschaden, Knie
- Alter: 21 Jahre
- Geschlecht: weiblich
- OTA: - Haut
- Diagnose: Coxarthrose
- Alter: 44 Jahre
- Geschlecht: männlich

KNH: - Haut

- Diagnose: oberflächliche Hautläsion bei Z.n. Hybrid-HTP
- Alter: 77 Jahre
- Geschlecht: weiblich

FRA: - Haut

- Diagnose: Exostosenabtragung laterale Tibia, ME Femur
- Alter: 24 Jahre
- Geschlecht: männlich

2.1.5 Transfizierte Zellen

Bei einigen Experimenten wurden Vorversuche mit transfizierten Zellen durchgeführt (S1 Gentechnik). Der Grund hierfür war, daß diese immortalisierten Zellen in ausreichender Anzahl vorhanden waren. Die Transfektion der synovialen Fibroblasten mit dem Simian-Virus 40T-Zell-Antigen (DNA-Virus) erfolgte im Vorfeld und war nicht Inhalt dieser Doktorarbeit.

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkulturmethoden

2.2.1.1 Allgemeines

Die Zellkulturen wurden bei für die Zellen optimalen 37 °C und 5% CO₂-Gehalt im Brutschrank gezüchtet. Alle im folgenden beschriebenen Tätigkeiten im Umgang mit den Zellen wurden unter sterilen Bedingungen durchgeführt, um eine Kontamination der Zellen mit Mikroorganismen zu verhindern. Gearbeitet wurde unter einer Sterilbank mit laminarer Luftströmung, und es wurden ausschließlich sterile bzw. sterilisierte Materialien verwendet. Es wurde stets mit desinfizierten Latexhandschuhen gearbeitet, um das Laborpersonal vor einer Infektion durch kontaminiertes Zellmaterial zu schützen bzw. um den Kontakt mit gefährlichen Chemikalien zu vermeiden.

2.2.1.2 Anlage von Primärkulturen humaner Zellen

Die intraoperativ entnommenen Gewebestücke wurden bis zur weiteren Verarbeitung in einem sterilen Gefäß mit physiologischer Kochsalzlösung aufbewahrt und kühl gelagert.

2.2.1.3 Anlage humaner Hautfibroblastenkulturen

Nach Überführen des Gewebes in eine Petrischale wurde es zunächst so sauber wie möglich von anderen Gewebearten wie z.B. Fett oder Blutgefäßen getrennt. Anschließend wurde es mit Hilfe von Scheren und Skalpell in kleine Stücke zerschnitten. Durch Zugabe von PBS⁻ wurde ein Austrocknen des Gewebes verhindert. Das zerkleinerte Material wurde dann in 50 ml-Röhrchen aufgenommen und mehrmals mit PBS⁻ gewaschen und zentrifugiert bis der Überstand frei von Fett- oder Blutzellen war. Nach Abnahme des nunmehr klaren Überstandes wurde das Pellet zunächst mit einem Gemisch aus Collagenase XI (1500 U/ml Endkonzentration) und Dispase (2,4 U/ml) überschichtet und für 30 Minuten bei 37 °C im Wasserbad inkubiert. Auf einen erneuten Waschschrift folgte der weitere Verdau mit Kollagenase (1500 U/ml) für ca. 2 Stunden. Diese Schritte dienten dem Herauslösen der Zellen aus dem Gewebeverband. Im Anschluß an den Verdau folgten zwei weitere Waschschrift mit PBS⁻ und schließlich die Aufnahme des Materials in Vollmedium, Überführung in Kulturflaschen und die Kultur im Brutschrank. Das Gewebe wurde in der Regel für acht bis zehn Tage in Kultur belassen.

2.2.1.4 Anlage humaner Fibroblastenkulturen aus synovialen Gewebe

Die Aufarbeitung des synovialen Gewebes erfolgte wie diejenige des dermalen Gewebes.

2.2.1.5 Anlage von Kulturen aus gekauften nativen Hautfibroblasten

Die Zellen (native neonatale und adulte Hautfibroblasten) wurden von der Fa. BioWhittaker in der 1. Subkultur bezogen. Nach dem raschen Auftauen der Zellen im Wasserbad bei 37 °C wurde die Zellsuspension in Vollmedium aufgenommen und nach Zugabe von etwas PBS⁻ abzentrifugiert, um das beim Einfrieren zugegebene zelltoxische DMSO (Dimethylsulfoxid) herauszuwaschen. Daraufhin wurde das Pellet erneut in Medium resuspendiert, in Kulturflaschen überführt und im Brutschrank kultiviert.

2.2.2 Nährmedium und Zellpflege

2.2.2.1 Herstellung des Vollmediums

Das verwendete Grundmedium (Dulbecco's MEM/F 12, 500 ml) enthält anorganische Salze, Aminosäuren, Vitamine, Glukose, Puffer und den Indikator Phenolrot. Damit die Zellen in vitro optimal gedeihen, müssen dem Grundmedium einige Substanzen zugefügt werden. Im Einzelnen sind dies:

- 50 ml Myoclone Super Fötales Kälberserum (FCS), entspricht 10% FCS Endkonzentration
- 12 ml Penicillin/Streptomycin-Lösung
- 10 ml MEM Vitaminlösung
- 6 ml Fungizone
- 0,5 ml Insulin-Transferrin-Selen-Supplement (ITS)
- 0,5 ml Tylosin-Lösung oder 2,5 ml Gantamycin-Lösung im Wechsel

Das FCS, das Wachstumsfaktoren, Hormone und Proteine wie Albumin enthält, wurde bei 37 °C im Wasserbad aufgetaut und bei 56 °C für 30 Minuten hitzeinaktiviert. Dadurch werden im Serum enthaltene Komplementfaktoren und kreuzreagierende Immunglobuline zerstört. Eine Komplementaktivierung könnte die kultivierten Zellen lysieren und abtöten.

Die Antibiotika und Antimykotika sollen das Risiko einer Kontamination minimieren. ITS wirkt zellstabilisierend.

Das FCS wie auch die anderen Lösungen wurden portioniert und bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ eingefroren oder im Kühlschrank gelagert, um eine gleichbleibende Mediumqualität zu gewährleisten. Angesetztes Medium wurde im Kühlschrank für maximal zwei Wochen gelagert.

2.2.2.2 Mediumwechsel

Die Häufigkeit des Mediumwechsels hängt sehr von der Zellart, der Zelldichte und der Zellaktivität ab.

Der dem Grundmedium zugegebene Farbindikator Phenolrot zeigt bereits geringe Verschiebungen des pH-Wertes durch einen Farbumschlag an. Bei Zunahme des pH-Wertes tritt ein Umschlag ins rot-violette auf, bei Überwiegen saurer Valenzen ins gelbe (z.B. bei hohem CO_2 -Gehalt des Mediums durch hohe Stoffwechselaktivität der Zellen). Letzteres zeigt die Notwendigkeit eines Mediumwechsels an.

Um jedoch weitgehend gleiche Bedingungen für die einzelnen Kulturen zu schaffen, wurde das Medium alle 3-4 Tage ausgewechselt, da manche der im Medium enthaltenen Zusätze, so z.B. die Antibiotika bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ lediglich 3 Tage stabil sind. Wenn das Medium noch relativ frisch aussah, was bei nicht-konfluenten Kulturen nach 3 Tagen meist der Fall war, wurde nur die Hälfte des Mediums entnommen und durch frisches ersetzt. Bei Primärkulturen wurde, solange das Gewebematerial noch in der Flasche war, vorsichtig ein Teil des alten Mediums abpipettiert, um möglichst wenig Gewebe zu verlieren.

Vor dem Mediumwechsel wurde das Vollmedium bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ im Wasserbad erwärmt. Das alte Medium wurde mit sterilen Pasteurpipetten über eine elektrische Pumpe abgesaugt oder zur Hälfte abpipettiert. Anschließend wurde das frische Medium so zugegeben, daß der Zellrasen nicht mit der Pipette berührt wurde, da dies zur Ablösung einiger Zellen bzw. zu einer mechanischen Schädigung führen kann. In große Flaschen (250 ml) wurden 13 ml und in kleine (50 ml) 6 ml pipettiert.

2.2.2.3 Immunhistochemische Bestimmung des Zelltyps

Um sicherzugehen, daß die Fibroblastenkultur nicht mit anderen Zellen, z.B. Makrophagen oder Endothelzellen verunreinigt war, wurde eine immunhistochemische Färbung zum Nachweis des Zelltyps durchgeführt.

Hierzu wuchsen die Zellen in 24-Well-Platten über Nacht, so daß für die Färbung eine subkonfluente Kultur zur Verfügung stand. Nach einer Spülung mit PBS⁻ wurden die Zellen für 10 Minuten in 4%igem eiskaltem Formaldehyd fixiert. Nach erneuter Spülung mit PBS⁻ wurden die Zellen 30 Minuten mit 0,1%igem Phenylhydrazin inkubiert. Phenylhydrazin hemmt endogene Peroxidasen. Anschließend erfolgte eine einstündige Inkubation mit 1%igem BSA, um unspezifische Antigenbindungsstellen zu blockieren. Auf den Negativkontrollen wurde das BSA belassen, auf die Positivkontrollen wurden jetzt die ersten, für die Zellart spezifischen Antikörper gegeben und im Kühlschrank über Nacht inkubiert. Es wurde zum einen der fibroblastenspezifische Antikörper AS02 (Maus IgG1) in einer Konzentration von 2 µg/ml, zum anderen ein monoklonaler Antikörper gegen CD68 (für Makrophagen bzw. Monozyten) in einer Konzentration von 10 µg/ml eingesetzt.

Am nächsten Tag wurde die Färbung mit dem DAKO-Kit fortgesetzt. Der nichtgebundene Antikörper wurde zunächst durch zweimaliges Spülen mit PBS⁻ herausgewaschen. Danach wurde der sogenannte „Link-Antibody“ (biotinylierte anti-mouse und anti-rabbit Immunglobuline) auf alle Proben (auch Negativkontrollen) gegeben, sodaß diese gerade bedeckt waren und zehn Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Es folgten erneut zwei Spülschritte mit PBS⁻. Im Anschluß wurde für 10 Minuten mit Streptavidin, das an alkalische Phosphatase gekoppelt ist, inkubiert und wie oben gespült. Abschließend wurden die Proben mit der „Substrate-Chromogen Solution“ inkubiert bis ein deutlicher Farbumschlag sichtbar war. Diese Lösung besteht aus gleichen Anteilen Fuchsin Chromogen und Activating Agent (z.B. je 120 µl) und wird mit gepuffertem Substrat auf z.B. 2 ml aufgefüllt und gut vermischt.

Die angefärbten Zellen wurden photographisch dokumentiert.

2.2.2.4 Subkultivierung der Zellen

Die Zellen wachsen logarithmisch, wobei jede Zellart bei gleichen Kulturbedingungen ihre eigene charakteristische Verdopplungszeit hat (bei Hautfibroblasten ca. 20 h). Bei Züchtung der Fibroblasten in Kulturflaschen kommt es zur Ausbildung eines einlagigen Zellrasens. Spätestens bei Erreichen des Konfluenzstadiums, d.h. der dichtestmöglichen Anordnung der Zellen als Monolayer, sollte die Kultur geteilt werden, um die Teilungsaktivität der Zellen zu erhalten und so ein optimales Wachstum der Kultur zu ermöglichen. Wird der Zellrasen zu dicht, tritt Kontaktinhibition auf und die Zellen hören auf zu proliferieren und gehen in die Erhaltungsphase des Zellzyklus. Dies kann unter Umständen zum Absterben der Kultur führen.

Anders ist dies bei transfizierten Zellen. Ihnen fehlt, ähnlich den Tumorzellen die Kontaktinhibition, so daß die Zellen über die Konfluenz hinaus proliferieren. Da hierdurch der Mediumverbrauch sehr hoch ist, werden auch diese Zellen im konfluenten Stadium passagiert.

Zur Subkultivierung wurde das Medium abgesaugt und die Flasche mit 37 °C warmem PBS⁻ gewaschen. Durch das Fehlen von Ca²⁺- und Mg²⁺-Ionen in der Spüllösung wurden diese dem Zellrasen entzogen, wodurch die Adhärenz der Zellen am Flaschenboden sowie der Zusammenhalt der Zellen untereinander geschwächt wurde. Nach Entfernen der Spüllösung wurde Trypsin/EDTA zugegeben, bei großen Flaschen 3 ml und bei kleinen 1,5 ml. Das Trypsin/EDTA-Gemisch bewirkte die vollständige Lösung der Zellen voneinander und vom Boden. Nach lichtmikroskopischer Kontrolle erfolgte die Aufnahme der Zellsuspension in Vollmedium. Das darin enthaltene Serum (FCS) inaktivierte das Trypsin. Es folgte eine Zentrifugation und nach Absaugen des Überstandes wurde das Pellet in frischem Medium resuspendiert und je nach Zellzahl bzw. Bedarf auf mehrere Kulturflaschen verteilt.

2.2.2.5 Kryokonservierung

Zellen, die gerade nicht für Versuche herangezogen wurden bzw. als Reserve aufbewahrt werden sollten, wurden, um sie vor Kontaminationen und

Veränderungen ihres Phänotyps durch häufiges Subkultivieren zu schützen, in flüssigem Stickstoff (-196 °C) eingefroren.

Als Gefrierschutzmittel wurde DMSO (Dimethylsulfoxid) eingesetzt. Diese Substanz verhindert die Dehydratation des Zytoplasmas und unterbindet die Ausbildung von Eiskristallen, was die Zellmembranen zerstören und zur Lyse der Zellen führen würde. Da DMSO jedoch zelltoxisch ist, sollte das Einfrieren wie auch das spätere Auftauen rasch erfolgen.

Vor dem Einfrieren wurde das Einfriermedium, bestehend aus 10% DMSO, 20 % FCS und 70 % serumfreiem Medium hergestellt und anschließend kaltgestellt. Die Zellen wurden mit Trypsin abgelöst, zentrifugiert und der Überstand abgesaugt. Danach wurden die Zellen zum Herauswaschen des Trypsins noch einmal mit PBS⁻ gewaschen und abzentrifugiert. Jetzt wurde das Pellet rasch in ca. 2 ml Einfriermedium resuspendiert und je nach Zellzahl auf 1 oder 2 Kryoröhrchen (1,8 ml Inhalt) verteilt.

Im Anschluß erfolgte die schrittweise Einfrierung. Zunächst wurde die Zellsuspension für zwei Stunden bei -20 °C abgekühlt und dann über Nacht in -70 °C belassen. Am nächsten Tag wurde das Kryoröhrchen in den flüssigen Stickstoff eingetaucht.

2.2.2.6 Auftauen der Zellen

Sollten die Zellen erneut in Kultur genommen werden, wurden sie nach Entnahme aus dem Stickstofftank sofort im 37 °C warmen Wasserbad aufgetaut. Nach Aufnahme der Zellsuspension in frisches vorgewärmtes Vollmedium erfolgte ein Zentrifugations-schritt, um das zelltoxische DMSO möglichst gut herauszuwaschen. Anschließend wurde das Pellet in frischem Medium resuspendiert und in Kulturflaschen überführt.

2.2.2.7 Zellzahlbestimmung

Um eine optimale und konstante Zellzahl für die Versuche zu erhalten, müssen die Zellen vor der Aussaat gezählt werden. Hierzu wird üblicherweise ein

Hämozytometer nach Neubauer eingesetzt. Das Raster der Zählkammer ist in neun Quadrate unterteilt, wobei sich an den vier Ecken und im Zentrum Flächen zum Auszählen befinden. Die vier Eckquadrate haben jeweils eine Fläche von $0,1 \text{ mm}^2$ und sind wiederum in 16 kleinere Quadrate unterteilt.

Die zum Zählen vorgesehenen Zellen wurden wie bei der Subkultivierung bzw. beim Einfrieren vom Flaschenboden gelöst, abzentrifugiert und nochmals mit PBS^- gewaschen. Die in frisches Medium aufgenommene Zellsuspension wurde durch mehrmaliges Aufziehen mit der Pipette homogenisiert. Anschließend wurden $20 \mu\text{l}$ der Zellsuspension mit $20 \mu\text{l}$ Trypanblau-Lösung gut vermischt und 1 Tropfen auf die Zählkammer aufgebracht. Durch das Trypanblau werden tote Zellen blau angefärbt, da ihre Zellmembran für den Farbstoff durchlässig ist. Diese gefärbten Zellen werden nicht mitgezählt. Dann wurden unter dem Lichtmikroskop die vier Eckquadrate ausgezählt. Das Volumen dieser vier Felder beträgt $4 \times 10^{-4} \text{ ml}$.

Die Zellzahl in einem Milliliter der Zellsuspension errechnet sich dann bei n gezählten Zellen wie folgt:

$$(n \times 2 \times 10^4) / 4 = n \times 5000 \text{ Zellen/ml.}$$

2.2.3 Inkubation der Fibroblasten mit Pharmaka

Ziel der Experimente war, den Einfluß einiger Pharmaka auf die Regulation von Interleukin-16 herauszufinden.

Die eingesetzten Substanzen greifen in verschiedene klassische Signaltransduktionswege ein und verändern somit die „Umweltbedingungen“ für die Zellen bzw. sie mimen dadurch physiologische Rezeptorreize, wie sie z.B. durch Wachstumsfaktoren erfolgen nach. Die Chemikalien sind zellmembranpermeabel, so daß eine Inkubationsdauer gewählt werden mußte, die für eine transmembranale Einschleusung der Substanzen und die Aktivierung des IL-16-Genes ausreichte.

Für das Mastoparan-Analogon MAS-7 sowie für Staurosporin wurden einerseits Kinetiken über 48 h durchgeführt, um herauszufinden, ob es einen optimalen Zeitpunkt mit maximaler IL-16 Transkription gibt. Nach Zugabe der

Wirkstoffe zum Vollmedium wurden die Fibroblasten zwischen 6 und 48 Stunden bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert.

Andererseits sollte die Auswirkung auf die IL-16-Regulation für weitere 7 Substanzen getestet werden. Einige der eingesetzten Chemikalien sind bereits in einem anderen Projekt mit der herkömmlichen PCR-Methode untersucht worden und sollten jetzt mittels LightCycler quantitativ bestimmt werden. Hierzu wurden die Zellen jeweils über 24 Stunden mit den Pharmaka inkubiert. Hinzu kamen zwei Substanzen, die bisher noch nicht untersucht worden sind: Forskolin, das intrazelluläre cAMP-Signale induziert und das Wespengift der Firma Alk-Scherax.

2.2.3.1 Wirkmechanismen und eingesetzte Konzentrationen

Zur Ermittlung der optimalen Konzentration der Pharmaka wurden Vorversuche durchgeführt (für Staurosporin und MAS-7, s. Ergebnisse). Zusätzlich wurde auf Ergebnisse aus Vorarbeiten zurückgegriffen. Außerdem dienten Referenzangaben aus der Literatur bzw. Herstellerangaben als Orientierung.

Dibutyryl-cAMP (cyclisches Adenosin-3`-5`-Monophosphat):

- ein sekundärer Botenstoff, der vorzugsweise cAMP-abhängige Proteinkinasen (v.a. PKA) aktiviert
- gelöst in destilliertem Wasser (100 mg/ml), Lagerung bei -20 °C
- eingesetzte Endkonzentration: 10 µM

Forskolin:

- reversibler Aktivator der Adenylatzyklase in Membranen und intakten Zellen
- indirekte Erhöhung der Calcium-Freisetzung durch cAMP-abhängige Steigerung der Natrium-Permeabilität (positiv inotrop)
- gelöst in DMSO (5 mg/ml), Lagerung im Kühlschrank
- eingesetzte Endkonzentration: 5 µM

H7, Dihydrochlorid (1-5-Isoquinolinesulfonyl-2-methylpiperazin):

- starker Inhibitor der Proteinkinasen A, C und G sowie der Myosinleichtkettenkinase
- gelöst in destilliertem Wasser (20 mg/ml), Lagerung im Kühlschrank
- eingesetzte Endkonzentration: 100 μ M

Ionomycin (Calcium-Ionophor):

- steigert durch Öffnen der Calciumkanäle die Ca^{2+} -Permeabilität der Zellmembran und führt dadurch zur Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Menge
- gelöst in DMSO (1 mg/ml), Lagerung im Kühlschrank
- eingesetzte Endkonzentration: 200 ng/ml Vollmedium

MAS-7 (fünffach verstärktes Mastoparan-Analogon):

- aktiviert direkt guanylnukleotidbindende Proteine (G-Proteine)
- gelöst in destilliertem Wasser, Lagerung bei -20°C
- eingesetzte Endkonzentration: 10 μ M

Ocadaic Acid (Ionophor-ähnliches Polyetherderivat einer C_{38} Fettsäure):

- starker Inhibitor der Proteinphosphatasen 1 (PPase 1) und 2A (PPase 2A), geringe Hemmung der Proteinphosphatase 2 B (PPase 2B)
- gelöst in DMSO (10 μ g/ml), Lagerung bei -20°C
- eingesetzte Endkonzentration: 10 nM

PMA (Phorbol-12-Myristat-13-Acetat):

- Aktivator der Proteinkinase C
- gelöst in DMSO (10 mg/ml), Lagerung bei -20°C
- eingesetzte Endkonzentration: 1 ng/ml Vollmedium

Reless-Wespen Gift (Fa. Alk-Scherax):

- wird üblicherweise zur Diagnose und Therapie IgE-vermittelter Allergien gegen Wespen Gift eingesetzt
- hat strukturelle Ähnlichkeit mit MAS-7
- gelöst in 11 ml Albumin-Lösung vom Hersteller (1100 µg/11ml), Lagerung im Kühlschrank
- eingesetzte Endkonzentration: 10 µM

Staurosporin:

- ein Breitspektrum-Inhibitor von Proteinkinasen, v.a. der PKC
- gelöst in DMSO, Lagerung bei 4°C
- eingesetzte Endkonzentration: 10 nM

2.2.3.2 Durchführung der Induktion

Die Zellen wurden am Vortag der Induktion in kleine (50 ml) Kulturflaschen überführt und über Nacht in normalem Vollmedium inkubiert. Die Fibroblasten wurden in einer Zelldichte von 1×10^6 Zellen/ Flasche ausgesät. Zur Induktion wurden die gelösten Chemikalien in der jeweiligen Konzentration dem Vollmedium zugegeben und anschließend sterilfiltriert.

Das Medium aus den Kulturflaschen wurde abgesaugt und das frische Pharmakon-versetzte Vollmedium zupipettiert. Den Flaschen, die als Kontrolle, d.h. unbehandelt über den gleichen Zeitraum beobachtet wurden, wurde frisches normales Vollmedium zugegeben.

Nach 6, 12, 24 und 48 Stunden wurde dann jeweils eine induzierte und eine unbehandelte Flasche zur RNA-Extraktion verwendet. Zum Teil wurden die morphologischen Veränderungen der Fibroblasten unter dem Lichtmikroskop fotografisch festgehalten.

2.2.4 RNA-Extraktion

Bei der RNA-Extraktion wie auch bei den folgenden Schritten (cDNA-Synthese und PCR) sollten Kontaminationen vermieden werden. Insbesondere mußte RNase-frei gearbeitet werden, steriles Arbeiten war nicht erforderlich. Es wurde daher für die folgenden Arbeitsschritte jeweils ein eigener Satz Pipetten sowie RNase-freie, sterile Pipettenspitzen und sterilisierte Eppendorf Cups verwendet. Es wurde mit dem RNneasy MiniKit der Fa. Quiagen gearbeitet.

Vorgehen:

Zunächst mußten die adhärenen Zellen vom Flaschenboden gelöst und abzentrifugiert werden. Auf einen weiteren Waschschrift mit PBS⁻ erfolgte die Aufnahme des Pellets in ca. 1 ml PBS⁻ sowie die Überführung in 1 ml Eppendorf Cups. Nach erneuter Zentrifugation und Entfernen des Überstandes wurde das Pellet gevortext und in 350 µl RLT-Puffer aufgenommen. Dieser Puffer enthielt Guanidiniumthiocyanat (GITC) sowie Mercaptoethanol, welche zur Lyse der Zellen führten und gleichzeitig RNasen inaktivierten und somit gewährleisteten, daß vorwiegend intakte RNA isoliert wurde. Durch mehrmaliges Aufziehen mittels einer Kanüle wurde das Lysat homogenisiert. Anschließend wurden die Proben mit 350 µl 70%igem Ethanol vermischt, um die RNA an die Kieselerde-Membran zu binden. Nicht gebundenes Material wurde bei 10000 Umdrehungen für 15 Sekunden abzentrifugiert. Die RNA-Moleküle hafteten an der Matrix. Auf einen Waschschrift mit RW1-Puffer (350 µl Puffer, Zentrifugation bei 10000 Umdrehungen, 15 Sekunden) folgte eine 15 minütige Inkubation mit RNase-freier DNase, um eine Kontamination mit DNA zu vermeiden. Dann folgte ein weiterer Waschschrift mit RW1-Puffer (s.o.) und zwei mit RPE-Puffer (500 µl, Zentrifugation bei 20000 Umdrehungen, 15 Sekunden bzw. 1 Minute), die eventuelle Kontaminationen der Membran herauswaschen sollten. Zuletzt wurde die an die Matrix gebundene RNA mit 30 - 40 µl RNase-freiem destilliertem Wasser eluiert.

Die eluierte RNA-Menge wurde mittels Spektrophotometer bestimmt. Hierzu wurde die RNA auf ein Volumen von 200 µl 1:100 verdünnt und bei 260 nm in Quarzküvetten vermessen.

2.2.5 cDNA-Synthese

Die cDNA-Synthese wurde mit einem Kit der Firma Clontech durchgeführt. Im Kit waren alle für die Reaktion erforderlichen Chemikalien enthalten. Von der zuvor bei der RNA-Extraktion aus den Zellen gewonnenen und vermessenen RNA wurden 1 oder 2 µg entnommen und in 0,5 ml Eppendorf Cups auf 25 µl DEPC-Wasser aufgefüllt. Dazu wurden 1 oder 2 µl oligo dT 18-Primer pipettiert und das Gemisch kurz gevortext und zentrifugiert. Dann wurde die Probe für 2 Minuten bei 70 °C erhitzt, um die RNA zu entfalten, und sofort auf Eis abgekühlt, um die Rückfaltung zu verhindern. Gleichzeitig band der Primer fest an die RNA-Stränge.

Jetzt wurde jeder Probe 6,5 µl bzw. 13 µl des folgenden Mixes zugegeben:

- 5x reaction buffer 8 µl
- Recombinant RNase Inhibitor 1 µl
- dNTP-Mix 2 µl
- MMLV reverse transcriptase 2 µl

Nach Zugabe wurde das Gemisch gut gevortext und zentrifugiert. Anschließend erfolgte die reverse Transkription über 1 Stunde bei 42 °C im PCR Block. Nach 1 Stunde heizte der Block für 5 Minuten auf 94 °C auf, um die cDNA-Synthese zu stoppen.

Das Produkt wurde mit 80 µl bzw. 160 µl DEPC-Wasser verdünnt, gevortext und zentrifugiert. Man konnte die DNA nun sofort einsetzen oder bei -20 °C einfrieren.

Um zu prüfen, ob die cDNA-Synthese erfolgreich war, wurde von jeder Probe eine LightCycler PCR mit einem GAPDH Primer gemacht. GAPDH (Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase) ist ein Enzym der Glykolyse und daher in jeder natürlichen Zelle vorhanden. Geht man davon aus, daß gleiche Mengen RNA eingesetzt wurden, dann sollte in jeder Probe annähernd gleichviel GAPDH kodierende cDNA amplifiziert werden. Es kann also als Positivkontrolle bezüglich Qualität und Quantität der cDNA-Synthese herangezogen werden.

2.2.6 LightCycler RT-PCR

Die Reverse Transkriptase-Polymerasekettenreaktion (RT-PCR) ist eine heutzutage in der Forschung etablierte Methode, um bestimmte DNA-Sequenzen (z.B. Gene) exponentiell zu vervielfältigen. Bei der herkömmlichen RT-PCR wurden die amplifizierten Produkte in einem Agarosegel unter UV-Licht sichtbar gemacht. Die Auswertung erfolgte semiquantitativ anhand der Dicke der im Gel erhaltenen Banden.

Mit der LightCycler RT-PCR ist es neuerdings möglich, die erhaltenen Produkte zu quantifizieren. Hierbei wird das spezifische Produkt (z.B. IL-16) im Verhältnis zu einem internen Standard (hier: GAPDH) bewertet. Außerdem ermöglicht der LightCycler eine sehr viel schnellere Amplifikation als die herkömmliche PCR.

Aufbau des LightCyclers (LC):

Das Gerät ist aus einer oberen und einer unteren Einheit aufgebaut. Die obere enthält die Heizspirale. Die untere enthält die Temperaturkammer, darin das Karussell mit den Proben, das Fluorimeter, die Motoren sowie die Energieversorgung.

Arbeitsprinzip des LightCyclers:

Das Grundprinzip der Amplifikation der DNA ist gleich wie bei der herkömmlichen PCR. Es gibt jedoch einige bedeutende Unterschiede.

Die Temperaturregulierung im LC erfolgt über die Heizspirale. Die von ihr erzeugte warme Luft wird durch einen Ventilator (am Boden der Temperaturkammer) gleichmäßig in der Kammer verteilt, so daß um die Proben herum eine homogene Temperaturverteilung gewährleistet ist. Eine Abkühlung in der Wärmekammer wird durch Zufuhr von Raumluft erreicht.

Die Proben werden für die LC PCR in spezielle Glaskapillaren pipettiert. Die Kapillaren haben einen Außendurchmesser von 1,55 mm und sind 35 mm lang. Das erforderliche Reaktionsvolumen ist mit 10 - 20 µl minimal.

Die Verwendung von Luft zur Wärmeregulation sowie das optimale Oberflächen-Volumen-Verhältnis der Kapillaren ermöglicht die raschen Temperaturänderungen im LightCycler.

Durch eine Lichtquelle in der PCR-Kammer werden die Proben mit einer Emissionswellenlänge von 470 nm angeregt. Je nach Fluoreszenzträger der PCR-Reagenzien wird die Fluoreszenz von einem der drei Photodetektoren bei 530 nm, 640 nm oder 710 nm gemessen. Bei der Verwendung von SYBR Green I (siehe unten) erfolgt die Messung bei 530 nm.

Anhand der erstellten Schmelzkurve nach Abschluß der Amplifikation kann die Qualität des PCR-Produktes geprüft werden. Die Amplifikationsprodukte schmelzen rasch und vollständig bei einer produktspezifischen Temperatur. D.h. ein sauberes PCR-Produkt ergibt in der graphischen Darstellung der Schmelzkurve einen einzigen schmalen Peak, der dem Schmelzpunkt entspricht. Somit können spezifische von unspezifischen (mehrere Peaks) Produkten getrennt werden.

Im Falle meiner Arbeit wurde mit dem FastStart DNA Master SYBR Green I-Kit der Fa. Roche gearbeitet. Dieser Kit enthält eine speziell für den LC geeignete FastStart Taq DNA Polymerase sowie den Fluoreszenzfarbstoff SYBR Green I. Die chemisch modifizierte Taq Polymerase ist durch hitzeempfindliche Gruppen an einigen Aminoenden blockiert, so daß das Enzym bei Raumtemperatur (also bei allen Pipettierschritten) inaktiv ist. Das Enzym wird erst durch die Temperaturerhöhung auf z.B. 95 °C für die Denaturierung der Proben aktiviert. Hierdurch wird die Amplifikation unspezifischer Primerbindungen bei niedrigen Temperaturen weitgehend ausgeschlossen.

SYBR Green I ist ein Fluoreszenz-Farbstoff, der spezifisch doppelsträngige DNA bindet. Der Farbstoff bindet bei jedem Amplifikationsschritt an das PCR-Produkt, welches dann mittels Fluoreszenz detektiert und quantifiziert wird.

Quantifizierung der Produkte:

Die spezielle LC-Software ermittelt im Anschluß an die Amplifikation (in meiner Arbeit jeweils 35 Zyklen) die Anzahl an Kopien des spezifischen Produktes einer Probe (z.B. IL-16). Zusätzlich wird von jeder Probe auch ein sogenanntes „housekeeping gene“ (das in jeder Zelle vorhanden ist) als interner Standard amplifiziert, z.B. GAPDH. Im Anschluß wird aus den beiden Kopienzahlen ein Verhältnis gebildet, z.B. die Interleukin 16/GAPDH-Ratio. Dadurch werden etwaige Unterschiede in der cDNA-Menge der einzelnen Proben weitgehend

ausgeglichen und ein quantitativer Vergleich der Proben untereinander ermöglicht. Die exakte Methode zur Quantifizierung ist in Kapitel 2.2.11 beschrieben.

Pipettierschema:

Zur Qualitätskontrolle des PCR-Prozesses wird eine Standard-Verdünnungsreihe mit einem dsDNA-Molekül bekannter Konzentration in drei Verdünnungen amplifiziert. Aus den Standardwerten dieser Kontrolle wird eine Regressionsgerade erstellt. Wenn alle drei Werte auf dieser Geraden liegen, dann ist die Quantifizierung der Produkte exakt. Es wurde hier GAPDH als Standard eingesetzt.

Zur Herstellung der Standard-Verdünnungen wurden zu 18 µl Standard-Stabilisator-Lösung 2 µl GAPDH-Standard (Kit) zupipettiert. Nach gründlichem Vortexen und Abzentrifugieren wurde dieses Gemisch erneut 1:10 verdünnt. Dieses Prozedere wurde im Anschluß nochmals durchgeführt, so daß 3 Verdünnungen (1:10, 1:100 und 1:1000) vorlagen.

Der Standard-Primer-Mix wurde wie folgt hergestellt:

- 24 µl H₂O für PCR
- 8 µl GAPDH-Primer (Kit)
- 8 µl FastStart DNA Master SybrGreen (Kit)

In die LightCycler-Kapillaren wurden nun jeweils 10 µl Primer-Mix und 10 µl Standard-cDNA pipettiert.

Der Mix für eine Probe wurde folgendermaßen hergestellt:

- 14 µl H₂O für PCR
- 2 µl Primer (GAPDH oder IL-16 bzw. IL-18, Kit)
- 2 µl FastStart DNA Master SybrGreen (Kit)

je nach Anzahl der Proben wurde der Mix vervielfacht. In die LC-Kapillaren wurden jeweils 18 µl Primer-Mix und 2 µl Proben-cDNA pipettiert.

Die Kapillaren befanden sich während des Pipettierens in einem speziellen vorgekühlten Zentrifugen-Adapter. In diesem wurden die Proben im Anschluß für 1 Minute bei 1200 Umdrehungen abzentrifugiert. Dann wurden sie in das LightCycler-Karussell überführt und die PCR wurde gestartet.

2.2.7 Darstellung der amplifizierten Produkte

Die Darstellung der im LightCycler amplifizierten Produkte erfolgte mittels Gel-Elektrophorese. Es wurde ein 1,5 prozentiges Agarosegel verwendet, dem Ethidiumbromid zugesetzt war. Ethidiumbromid bindet an doppelsträngige DNA und fluoresziert bei Bestrahlung mit UV-Licht orange. Um zu prüfen, ob die richtigen Produkte dargestellt wurden, diente ein mitgelaufener 100 bp DNA-Marker zur Orientierung. Im Anschluß wurde das Gel photographisch dokumentiert.

Im einzelnen wurden folgende Lösungen benötigt:

- 20xTBE-Puffer: auf 1 l Aqua dest. kommen
- 121 g Trisaminomethan
 - 61,7 g Borsäure
 - 7,44 g EDTA-Natrium
- Agarosegel: auf 400 ml 20xTBE-Puffer kommen
- 6 g Agarose
 - 30 µl Ethidiumbromid
- 40xTAE-Puffer: auf 1 l Aqua dest. kommen
- 193,6 g Trisaminomethan
 - 108,9 g Natriumacetat
 - 15,2 g EDTA-Natrium
- Ladepuffer: auf 250 ml 40xTAE-Puffer kommen
- 5 ml Glycerin
 - 1 ml Bromophenolblau
 - 1 ml Xylene cyanol
 - 2,75 ml Aqua dest.
- 100 bp-Ladder-Mix:
- 30 µl bp-Ladder
 - 80 µl Ladepuffer
 - 50 µl ddH₂O

Versuchsdurchführung:

Die Agarose (6 g) wurde in 20 ml 20xTBE-Puffer und 380 ml Aqua dest. in der Mikrowelle unter gelegentlichem Schütteln aufgeköcht bis keine Schlieren mehr sichtbar waren. Nach Zugabe von 30 µl Ethidiumbromid wurde das Gel auf dem Magnetrührer auf ca. 60 °C abgekühlt und anschließend in die Gelkammer gegossen. Die Gelkammer ist mit einem Kamm bestückt, dessen Zinken Platz freihält für die spätere Probe. Nach dem Aushärten des Gels wird der Kamm entfernt und das Gel mit 1xTBE-Puffer bedeckt.

Es wurden 15 µl LightCycler-Produkt mit jeweils 5 µl Ladepuffer gut vermischt und anschließend 15 µl in die Vertiefungen des Gels eingebracht. In eine seitliche Tasche des Gels wurde 10 µl des 100 bp-DNA-Eichmarkers pipettiert. Anschließend wurde das Gel an ein Netzgerät angeschlossen und die Elektrophorese erfolgte bei einer Spannung von 65 Volt und 5 Milliampère. Sobald eine ausreichende Trennung der DNA-Stücke erreicht war, wurde das Gel mit UV-Licht bestrahlt und dadurch der DNA-Ethidiumbromid-Komplex sichtbar gemacht. Zum Abschluß wurde das Gel fotografiert.

2.2.8 Cell Death Detection ELISA (Roche)

Da Staurosporin Apoptose induzieren kann, wurde dieser Assay durchgeführt, um zu testen, in welchen Konzentrationen es für die geplanten Versuche (mit Fibroblasten) eingesetzt werden kann, ohne daß die Zellen apoptotisch werden. Außerdem sollte ausgeschlossen werden, daß es sich um Nekrose handelt.

Testprinzip:

In einer mit Streptavidin beschichteten 96-Well-Mikrotiterplatte (MTP) werden Zellysate bzw. Zellkulturüberstände mit monoklonalen Mausantikörpern gegen DNA und Histone inkubiert. Der Anti-Histon-Biotin-AK bindet einerseits an die Histon-Komponente der Nukleosomen, andererseits bindet es den gesamten Komplex über Biotinylierung an die Streptavidin-beschichtete Platte. Zusätzlich reagiert der Anti-DNA-Peroxidase-AK mit der DNA-Komponente der Nukleosomen. Es erfolgt die quantitative Bestimmung (photometrisch) der Nukleosomen über die gebundene Peroxidase, wobei ABTS als Substrat dient.

Durchführung:

Am Vortag wurden die Zellen in einer Dichte von 1×10^4 Zellen/ well (200 μ l) in einer 96-Well-Mikrotiterplatte ausgesät und über Nacht inkubiert. Am nächsten Morgen wurde das Medium abgesaugt und den adhären Zellen wurde frisches, mit Staurosporin in verschiedenen Konzentrationen (10 nM bis maximal 1000 nM) versehenes Medium zugegeben. Außerdem wurden Zellen als Negativkontrolle weiterhin nur mit Medium behandelt. Nach einer 24-stündigen Inkubation wurden die Zellen in der MTP für zehn Minuten bei 200 x g abzentrifugiert. Für die Untersuchung auf Nekrose wurden nun jeweils 20 μ l Überstand abpipettiert, in eine andere MTP überführt und im Kühlschrank zwischengelagert. Die Zellen, die auf Apoptose untersucht werden sollten, wurden anschließend für 30 Minuten bei Raumtemperatur mit einem Lyse-Puffer inkubiert. Daraufhin wurde das Lysat wie oben bei 200 x g abzentrifugiert und es wurden jeweils 20 μ l Überstand (= zytoplasmatische Fraktion) in die mit Streptavidin beschichtete MTP überführt. Außerdem wurden nun die im Kühlschrank gelagerten Überstände zur Nekrose-Untersuchung ebenfalls auf diese MTP pipettiert. Es wurden jeweils Doppelbestimmungen durchgeführt. Zusätzlich wurde eine im Kit enthaltene Positivkontrolle (DNA-Histon-Komplex) sowie eine Hintergrund-Kontrolle (Inkubationspuffer aus dem Kit) mitgeführt.

Anschließend wurde das Gemisch aus Antikörpern zugegeben (80 μ l). Dieses Gemisch wurde jeweils frisch angesetzt und enthielt 1/20 Anti-DNA-POD, 1/20 Anti-Histon-Biotin und 18/20 Inkubationspuffer. Die MTP wurde nun für zwei Stunden auf einem MTP-Schüttler bei Raumtemperatur inkubiert.

Im Anschluß an drei Waschschrte mit dem Inkubationspuffer (um nicht gebundene Antikörper auszuwaschen) erfolgte die Zugabe von 100 μ l Substrat (ABTS). Es wurde auf einem Schüttler inkubiert, bis ein Farbumschlag sichtbar war (ca. 10 - 20 Minuten).

Abschließend erfolgte die photometrische Messung bei 405 nm (Referenzwellenlänge 490 nm), wobei ABTS als Blank diente.

2.2.9 ApopDetect Plus Peroxidase Assay

Als Ergänzung zu dem o.a. Cell Death Detection ELISA wurde dieser In Situ Apoptosis Detection Kit durchgeführt.

Testprinzip:

Ein wichtiges Merkmal der Apoptose sind Veränderungen der Zellmorphologie. Die Zelle schrumpft, die Membran verändert sich, bleibt jedoch im Gegensatz zur Nekrose intakt. Ganz im Vordergrund steht eine durch Endonukleasen bewirkte Fragmentation der nukleären DNA (Chromatin) zu Oligonukleosomen (ca. 180 bp). Diese Oligonukleosomen werden als Apoptosekörperchen bezeichnet.

Im Test werden nun die freien 3'-OH-Enden der DNA-Fragmente mit chemisch markierten (Digoxigenin) bzw. nicht markierten Nukleotiden mittels der terminalen Deoxynucleotidyl-Transferase (TdT) gekennzeichnet. Das Verhältnis von markierten zu nicht markierten Nukleotiden ist so gewählt, daß eine optimale Bindung des Anti-Digoxigenin-Antikörpers an die Digoxigenin-Nukleotide möglich ist. Dieser Antikörper ist wiederum mit Peroxidase konjugiert, so daß nach Zugabe von DAB-Substrat (Diaminobenzidin) die einzelnen Apoptosekörperchen in rostbrauner Farbe dargestellt werden.

Durchführung:

Am Vorabend der Pharmaka-Zugabe wurden Zellen in 24-Well-Makroplatten ausgesät in einer Dichte von 1×10^5 Zellen/ well. Zu den adhärennten Zellen wurde am nächsten Morgen Staurosporin in verschiedenen Konzentrationen (10 nM, 100 nM, 500 nM, 1000 nM) gegeben, eine Negativkontrolle ohne Staurosporin wurde mitgeführt. Die Zellen wurden für 24 Stunden inkubiert.

Vor der Färbung wurden die Zellen mit gekühltem 4 %igem Formaldehyd für 10 Minuten fixiert. Nach 2 Waschschrritten mit PBS über jeweils 5 Minuten erfolgte die Hemmung endogener Peroxidasen mittels 30 %iger Wasserstoffperoxidlösung (5 Minuten). Auf zwei Waschschrritte (s.o.) folgte die Zugabe von je 65 µl Equilibrationspuffer direkt auf die Proben. Der Puffer wurde nur für ca. 10 Sekunden auf der Probe belassen und dann sofort abgesaugt. Auf die Zellen wurde ein Aliquot à 55 µl pipettiert, ein Gemisch aus Reaktionspuffer (77 µl,

enthält die Nukleotide) plus TdT-Enzym (33 µl). In einer feuchten Kammer wurden die Proben bei Raumtemperatur für 1 Stunde inkubiert.

Im Anschluß daran wurde die Reaktion durch Zugabe des Stop/Wasch-Puffers (1 ml Stop/Wasch-Puffer aus dem Kit + 34 ml dH₂O) für 10 Minuten gestoppt. Nach dreimaligem Waschen mit PBS⁻ für jeweils 1 Minute wurden je 65 µl Anti-Digoxigenin-Peroxidase-Konjugat zugegeben. Nach einer 30minütigen Inkubation in einer feuchten Kammer folgten erneut vier Waschschrte mit PBS⁻ (je 2 Minuten). Zuletzt erfolgte die Zugabe des Peroxidase-Substrates. Nach circa 3 - 6 Minuten konnte die Anfärbung der Apoptosekörperchen (rostbraun) unter dem Mikroskop beobachtet werden.

Die Färbung wurde photographisch dokumentiert, siehe unten.

2.2.10 Human-Interleukin-16 ELISA (Roche)

Der Test wurde eingesetzt, um zu prüfen, ob in den Überständen der behandelten Zellen IL-16-Protein vorhanden ist.

Zum einen wurden Überstände vor der RNA-Extraktion abgenommen und bei 70 °C gelagert.

Zum anderen wurde versucht, die Interleukin-16-Menge im Überstand durch Zugabe von Interleukin 1β (IL-1β) zu steigern. Es ist bekannt, daß IL-1β in der Lage ist, IL-16 zu induzieren [16, 29, 30]. In Vorversuchen ließ sich eine leichte Erhöhung an IL-16 durch IL-1β nachweisen.

Hierzu wurden Zellen in 24-well-Makroplatten ausgesät (2 x 10⁵ Zellen/well). Am nächsten Morgen wurden die adhärenen Zellen mit Staurosporin in verschiedenen Konzentrationen (10 nM, 50 nM, 100nM) sowie mit Forskolin (5 µM) induziert, wobei das verwendete Medium nur 0,5 % FCS enthielt. Dadurch sollte verhindert werden, daß die Zellen stark proliferieren. Diese beiden Substanzen wurden eingesetzt, da sie die mittels LightCycler bestimmte IL-16-Transkription am stärksten erhöht hatten. Nach 24 Stunden Inkubation wurde das Induktionsmedium aufgenommen und bei -70 °C gelagert. Die Proben wurden anschließend für weitere 24 Stunden mit Interleukin 1β in einer Konzentration von 10 ng/ml unter Verwendung des 0,5 % FCS-Mediums inkubiert. Die Überstände

wurden dann abgenommen und bis zur Testdurchführung wie oben beschrieben gelagert.

Testprinzip:

In den Überständen vorhandenes IL-16 bindet an einen Human-IL-16-Antikörper, der wiederum durch Biotinylierung an eine mit Streptavidin beschichtete MTP gebunden wird. Zusätzlich reagiert das IL-16 mit dem Peroxidase-gekoppelten Detektions-Antikörper, so daß der ganze Immunkomplex nun an der MTP fixiert ist. Nach einer ausreichenden Inkubationszeit wird die Menge an gebundener Peroxidase mit TMB (Tetramethylbenzidin) als Substrat photometrisch bestimmt.

Durchführung:

Auf die mit Streptavidin beschichtete MTP wurde der Human-IL-16-AK (im Kit: anti-hIL-16-biotin) gegeben und für 30 Minuten auf einem Schüttler inkubiert. Die Lösung wurde abgesaugt und es wurden jeweils 20 µl Proben-Überstände, Standards und Kontroll-Serum (beide im Kit enthalten) auf die MTP pipettiert. Außerdem wurden je 200 µl Detektions-AK (im Kit: anti-hIL-16-Peroxidase, HRP) zugegeben und es wurde für 2 Stunden auf dem Schüttler inkubiert. Es folgte ein Waschschrift mit Waschpuffer, durch den nicht gebundene Antikörper entfernt wurden. Anschließend wurden 200 µl TMB-Substrat zugegeben und die Platte wurde zugedeckt auf dem Schüttler inkubiert, bis ein deutlicher Farbumschlag zu sehen war (meist nach 15-25 Minuten). Abschließend erfolgte die photometrische Messung bei 370 nm (Referenzwellenlänge 492 nm), wobei das TMB-Substrat als Blank diente.

2.2.11 Quantifizierung im LightCycler und Auswertung

Für die Quantifizierung der einzelnen Proben im LightCycler wurde in meiner Arbeit die „Fit Point“-Methode herangezogen, da bei dieser Methode die „Crossing Line“ (Cr.L.) selbst gewählt werden kann. Bei der voreingestellten Cr.L. fallen nämlich Proben mit nur sehr geringer Fluoreszenz heraus, und da in meinem Fall für IL-16 häufig nur minimale Kopienzahlen zu erwarten waren, wären einige Messungen nicht quantifizierbar gewesen. Die Cr.L. wird so

eingestellt, daß der errechnete Fehlerwert minimal und der Korrelationskoeffizient r möglichst annähernd 1 ist. Außerdem sollte die errechnete Kopienzahl der mitgeführten externen Standards (hier: GAPDH, 3 Konzentrationen) möglichst exakt bei den vorgegeben Werten liegen.

Mittels zweier Meßpunkte, die im Bereich des linearen Anstiegs der Fluoreszenz liegen, wird die log-lineare Fluoreszenzkurve für jede einzelne Probe ermittelt. Der Schnittpunkt dieser Kurve mit der „Cr.L. markiert den sogenannten „Crossing Point“ (Cr.P.). Er wird als Zykluszahl angegeben (hier auf 2 Dezimalen gerundet). Aus den Cr.Ps. der drei GAPDH-Standards wird eine Graphik erstellt, in der die Zykluszahl gegen die Kopienzahl (in logarithmischer Form) aufgetragen ist. Mit Hilfe der so ermittelten Standardkurve können nun für die einzelnen Cr.Ps. der Proben die zugehörigen Kopienzahlen errechnet werden. Diese Kopienzahlen wurden in meiner Arbeit für die weitere Auswertung herangezogen, siehe unter 2.2.6.

Ergänzend wurde mit den Cr.Ps. gearbeitet. Von den 2 oder 3 LC-Läufen, die mit einer Zellkultur (z.B. Patient KNH) durchgeführt wurden, wurden für jedes Pharmakon separat jeweils die Mittelwerte aus den Cr.Ps. gebildet und die Standardabweichung ermittelt. Hierdurch sollten etwaige grobe Ungenauigkeiten bei der Versuchsdurchführung sichtbar gemacht werden. Dies erfolgte stets getrennt für GAPDH und das spezifische Produkt IL-16 oder IL-18. Im Ergebnisteil ist dies bei der Besprechung der einzelnen Kulturen, falls relevant jeweils kurz in tabellarischer Form dargestellt, eine ausführliche Darstellung findet sich im Anhang (Kapitel 7.4).

Die statistische Beurteilung, d.h. die Prüfung auf Signifikanz erfolgte in Zusammenarbeit mit dem Institut für Medizinische Biometrie der Universität Tübingen. Für die Auswertung wurden die IL-16/GAPDH- bzw. die IL-18/GAPDH-Ratios als Ausgangsdaten verwendet. Aus diesen Daten wurden die entsprechenden geometrischen Mittelwerte gebildet. Die weitere Berechnung erfolgte nach einem modifizierten t-Test (Dunnett-Methode): es wurde der 10er-Logarithmus der geometrischen Mittelwerte berechnet und die erhaltenen Werte wurden dann erneut gemittelt. Im Anschluß erfolgte für jedes Pharmakon der

Vergleich mit der Kontrolle, d.h. den unbehandelten Zellen. Aus den gewonnenen Daten ließ sich dann eine Aussage zur Signifikanz machen.

Das Signifikanzniveau wurde bei 5 % festgelegt.

3 Ergebnisse

3.1 Zellkultur und Zellwachstum

Sowohl die synovialen Primärkulturen als auch die Haut-Primärkulturen wurden in den ersten Tagen nach dem Verdau möglichst wenig bewegt, um das Auswachsen aus den Gewebestückchen und das Festwachsen am Boden der Kulturflaschen nicht zu stören.

Um eine ausreichende Anzahl Zellen für die weiteren Versuche zu erhalten, wurden die Zellen mindestens bis zur dritten Subkultivierung passagiert. Je nachdem wieviel Gewebe zur Anlage der Primärkultur vorhanden war, dauerte dies zwischen vier bis sechs Wochen. Die Subkultivierung erfolgte immer dann, wenn die für viele Gewebe typische Kontaktinhibition die Zellen an der weiteren Proliferation hinderte.

Die Kultur der gekauften Zellen erfolgte ab der 1. Passage wie diejenige der Primärkulturen.

3.2 Immunhistochemische Zelltypcharakterisierung

Die angelegten Kulturen der aufgearbeiteten Gewebe konnten in allen Fällen durch die immunhistochemische Färbung mit dem fibroblastenspezifischen Antikörper AS02 als Fibroblasten identifiziert werden, beispielhaft in Abb. 2a gezeigt.

Mit dem monoklonalen Antikörper gegen CD68 markierte Makrophagen bzw. Monozyten trat in keinem Fall eine Reaktion auf, so daß eine Kontamination der Kulturen mit Makrophagen bzw. Monozyten ausgeschlossen werden konnte.

Die Negativkontrollen zeigten, daß der verwendete Zweitantikörper nicht unspezifisch mit dem Substrat reagiert hat, siehe Abb. 2b.

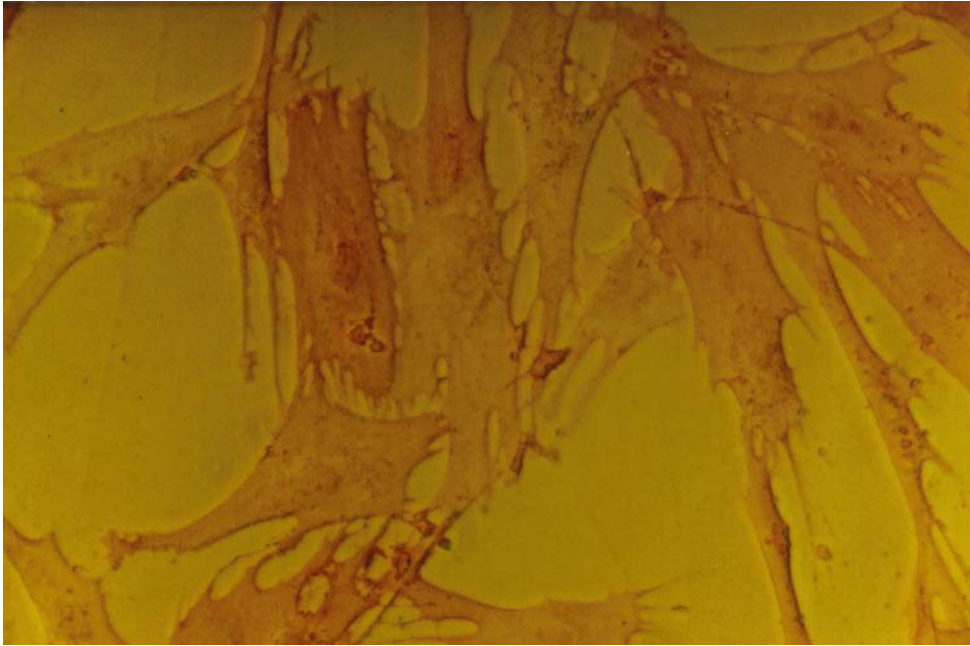


Abb. 2a: **Positivkontrolle**, Färbung mit fibroblastenspezifischem Antikörper

Die rote Färbung weist die Zellen als Fibroblasten aus.

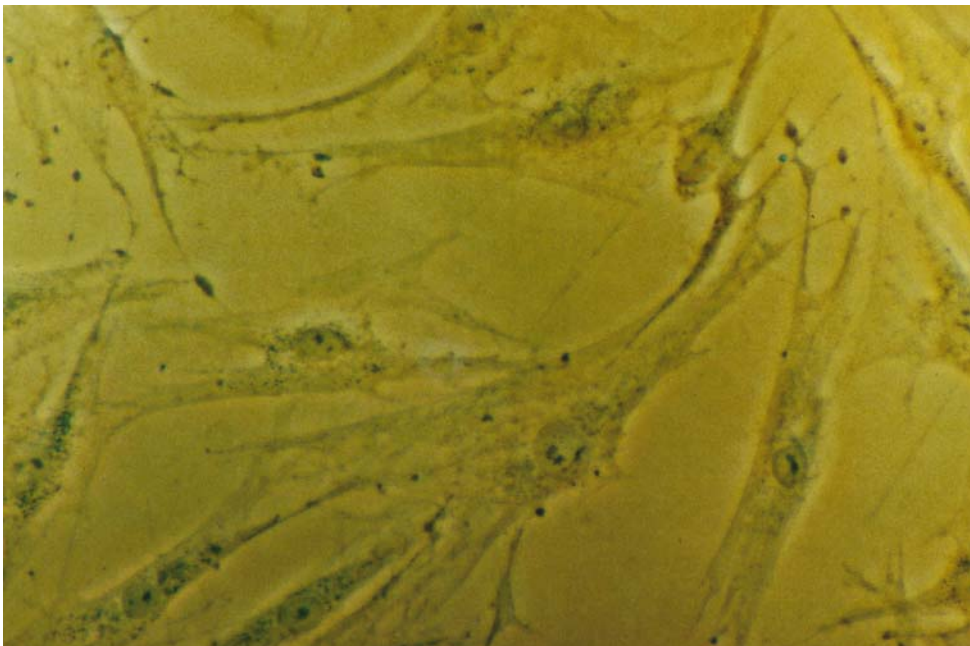


Abb. 2b: **Negativkontrolle**, d.h. kein spezifischer Erstantikörper

Die Zellen sind nicht angefärbt, d.h. es kam nicht zu einer unspezifischen Reaktion.

3.3 Titration mit MAS-7

Um herauszufinden, bei welcher Konzentration die maximale Wirkung auf die IL-16-Expression ohne Vitalitätsverlust der Zellen liegt, wurden diese mit MAS-7 in verschiedenen Konzentrationen über 24 h behandelt:

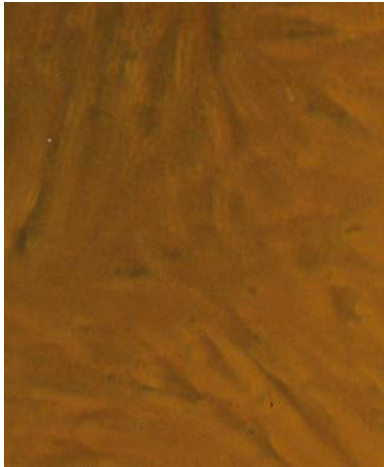


Abb. 3a: unbehandelte Zellen
unauffällige Zellmorphologie

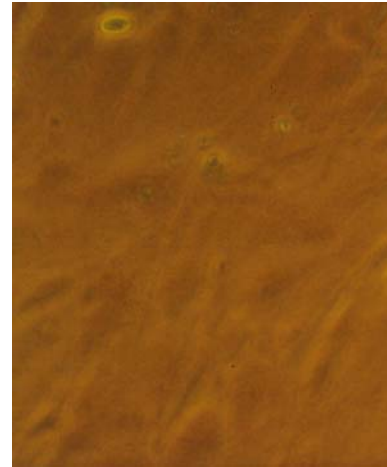


Abb. 3b: MAS-7 10 µM
die Morphologie der Zellen ist
im Vergleich zu unbehandelten
Zellen nicht verändert

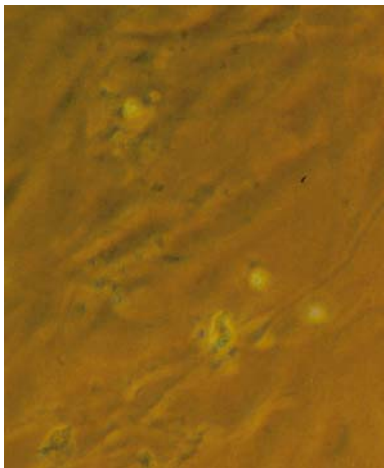


Abb. 3c: MAS-7 30 µM
die Zellmorphologie ist leicht verändert

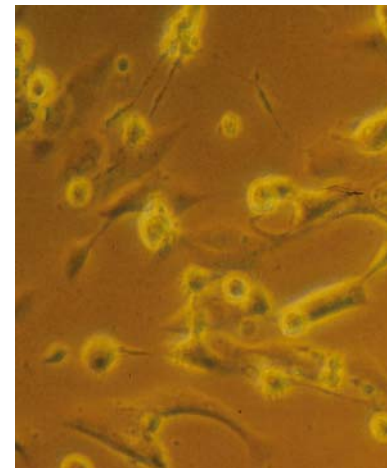


Abb. 3d: MAS-7 70 µM
es sind kaum mehr vitale Zellen
vorhanden,
keine RNA-Extraktion möglich

Für das Experiment wurden Hautfibroblasten eines Patienten in der 4. Subkultur eingesetzt.

Mit der Real-Time-PCR (LightCycler) ergab sich folgendes:

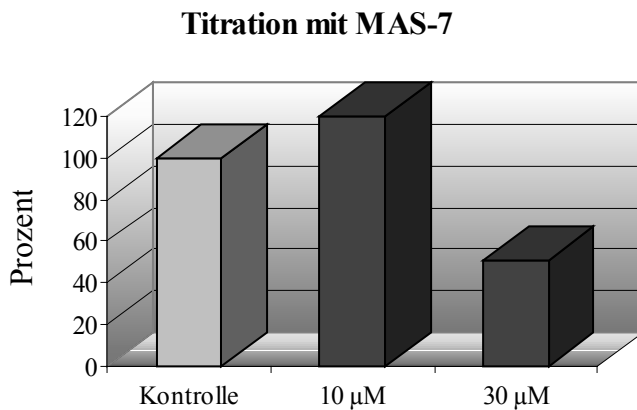


Abb. 4: dargestellt ist die IL-16/GAPDH-Ratio umgerechnet in Prozent, bezogen auf die Kontrolle (unbehandelte Zellen)

Tab. 1: Mittelwerte und Standardabweichungen (Stabwn) der „crossing points“ bei Titration mit MAS-7

KNH	Kontrolle	10 µM	30 µM
<u>GAPDH</u>			
Mittelwerte:	15,315	14,955	14,935
Stabwn:	0,655	0,395	0,365
<u>IL-16</u>			
Mittelwerte:	30,265	29,595	31,055
Stabwn:	0,735	0,345	0,615

Auswertung der Ergebnisse:

Es ließ sich bereits bei den unbehandelten Zellen (Kontrolle) eine spontane IL-16-Transkription nach 24 Stunden nachweisen. Durch Zugabe von MAS-7 in einer Konzentration von 10 µM konnte die IL-16-mRNA-Menge um 20 Prozent gesteigert werden, ohne daß die Zellen eine sichtbare morphologische Schädigung davontrugen (siehe oben). Eine deutliche Reduzierung des IL-16-mRNA-

Signals zeigte sich nach 24 stündiger Inkubation mit 30 μM MAS-7 (Rückgang auf 51 Prozent).

Aufgrund der erhaltenen Ergebnisse und in Übereinstimmung mit Ergebnissen aus anderen Arbeiten wurde für die weiteren Experimente MAS-7 in einer Konzentration von 10 μM eingesetzt.

3.4 Titration mit Staurosporin

3.4.1 Einfluß von Staurosporin auf die IL-16-Transkription

Auch für die Experimente mit Staurosporin sollte zunächst, wie für MAS-7 die optimale Arbeitskonzentration herausgefunden werden. Es galt auch hier die Konzentration zu finden, bei der eine deutliche Wirkung auf die IL-16-Expression auftritt, ohne daß die Zellen darunter leiden.

Bei Staurosporin mußte allerdings noch in Betracht gezogen werden, daß es eine apoptotische Wirkung besitzt. Es mußte also ausgeschlossen werden, daß bei der eingesetzten Konzentration die Zellen bereits vermehrt in Apoptose gingen. Dies wurde zum einen durch die Betrachtung der Zellen unter dem Mikroskop überprüft, zum anderen wurde ein ELISA durchgeführt, der zum Nachweis von Apoptose geeignet ist, der Cell Death Detection ELISA, siehe unten.

Folgende Konzentrationen wurden ausgetestet:

10 nM, 30 nM, 50 nM, 70 nM und 100 nM, zusätzlich wurde eine unbehandelte Kontrolle mitgeführt. Nach 24 stündiger Inkubation ließ sich unter dem Mikroskop ab einer Staurosporin-Konzentration von 50 nM eine geringe Veränderung der Zellen erkennen. Morphologisch sahen die Zellen, soweit beurteilbar unverändert aus. Die Zelldichte war jedoch im Vergleich zu den unbehandelten bzw. zu den mit 10 nM und 30 nM behandelten Zellen reduziert. Es konnte aus allen Proben RNA isoliert werden. Die spektrophotometrisch bestimmte RNA-Menge war jedoch bei den höheren Staurosporin-Konzentration, v.a. jedoch bei 100 nM deutlich reduziert.

Der Versuch wurde mit gekauften neonatalen Hautfibroblasten (Charge 6499) in der vierten Passage durchgeführt.

Mit der RT-PCR am LightCycler ergaben sich folgende Ergebnisse:

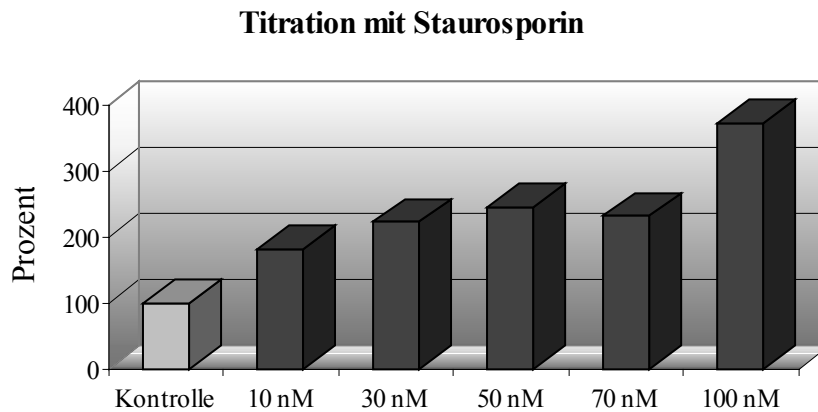


Abb. 5: dargestellt ist die IL-16/GAPDH-Ratio umgerechnet in Prozent, bezogen auf die Kontrolle (unbehandelte Zellen)

Tab. 2: Mittelwerte und Standardabweichungen (Stabwn) der „crossing points“ bei Titration mit Staurosporin

NHDF, 4.SK	Kontr.	10 nM	30 nM	50 nM	70 nM	100 nM
<u>GAPDH</u>						
Mittelwerte:	13,770	13,735	13,575	13,520	13,735	13,820
Stabwn:	0,380	0,365	0,375	0,400	0,355	0,330
<u>IL-16</u>						
Mittelwerte:	29,080	28,165	27,705	27,520	27,810	27,195
Stabwn:	0,600	0,425	0,445	0,370	0,460	0,405

Auswertung der Ergebnisse:

Es war bei den unbehandelten Zellen nach 24 h ein spontanes IL-16-Signal detektierbar. Durch Zugabe von Staurosporin zum Medium ließ sich die IL-16-Expression für alle eingesetzten Konzentration steigern. Je höher die eingesetzte Konzentration, desto größer die Menge an IL-16-mRNA-Transkript (Ausnahme bei 70 nM, s. Abb. 5). Bei einer Staurosporin-Konzentration von 10 nM

zeigte sich bereits eine deutliche Steigerung (182 Prozent), bei 100 nM ließ sich die Transkriptmenge sogar beinahe vervierfachen.

Unter Berücksichtigung der Ergebnisse aus dem Apoptose-ELISA, bei dem sich zeigte, daß mit dem Anstieg der Staurosporin-Konzentration gleichermaßen auch die Apoptose geringgradig zunimmt, wurde bei den folgenden Experimenten mit der niedrigsten Staurosporin-Konzentration (10 nM) gearbeitet. Außerdem war so gewährleistet, daß die Ergebnisse mit den Resultaten aus anderen Arbeiten verglichen werden konnten.

3.4.2 Einfluß von Staurosporin auf die IL-18-Transkription

Untersucht werden sollte, ob die verschiedenen Staurosporin-Konzentrationen auch eine konzentrationsabhängige Veränderung der IL-18-Transkription bewirken.

Das Experiment wurde mit der gleichen aus neonatalen Hautfibroblasten der 4. Subkultur gewonnenen cDNA wie unter 3.4.1 durchgeführt (NHDF 6499). Die Zellen wurden ebenfalls über 24 Stunden inkubiert.

Die LightCycler RT-PCR ergab folgendes:

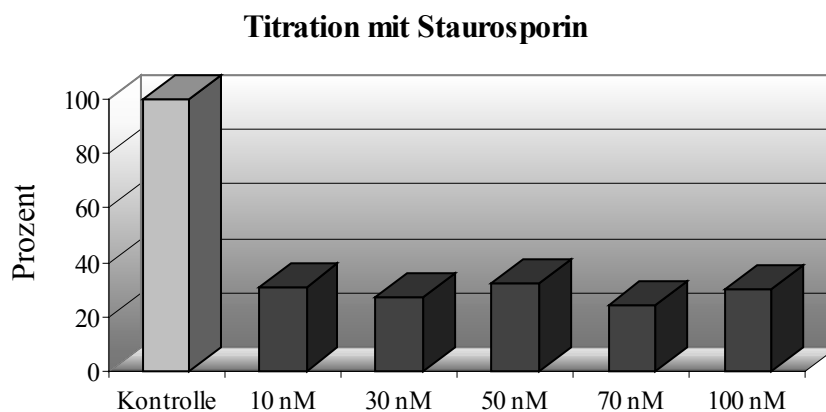


Abb. 6: dargestellt ist die IL-18/GAPDH-Ratio umgerechnet in Prozent, bezogen auf die Kontrolle (unbehandelte Zellen)

Auswertung der Ergebnisse:

Nach 24 h war ein spontanes IL-18-Signal vorhanden (100 %). Die Zugabe von Staurosporin in verschiedenen Konzentration reduzierte in allen Fällen das IL-18-mRNA-Produkt deutlich auf ca. 30 Prozent. Es ließ sich jedoch keine Konzentrationsabhängigkeit der Reduktion nachweisen.

Die erhaltenen Ergebnisse haben somit keine weitere Auswirkung auf die Auswahl der geeigneten Staurosporin-Konzentration gehabt.

3.5 Ergebnisse der IL-16-Regulation durch Pharmakoninduktion

3.5.1 Untersuchung dermalen Fibroblasten von Patienten

Für die folgenden Experimente wurden die Zellen jeweils in der 3. Subkultur eingesetzt.

3.5.1.1 Unbehandelte Zellen

Bei allen untersuchten Kulturen (4 Patienten, s. unten) zeigte sich in der RT-PCR (LightCycler) ein spontanes IL-16-mRNA-Signal.

In der Auswertung wurde dieses IL-16-Signal im Verhältnis zum GAPDH-Signal jeweils als 100 Prozent gewertet. Die Veränderungen des IL-16-Transkriptes durch die Inkubation mit den einzelnen Pharmaka wurden in Relation zu diesem Wert gesetzt.

3.5.1.2 Inkubation mit MAS-7, 10 µM

Abgesehen von einem Patienten (SRF) hatte die Inkubation mit MAS-7 über 24 Stunden keine Auswirkung auf die IL-16-Transkription. Bei dem o.a. Patienten ließ sich das IL-16-Signal im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle um 27 Prozent steigern. Die Steigerung war jedoch nicht statistisch signifikant.

LightCycler RT-PCR:

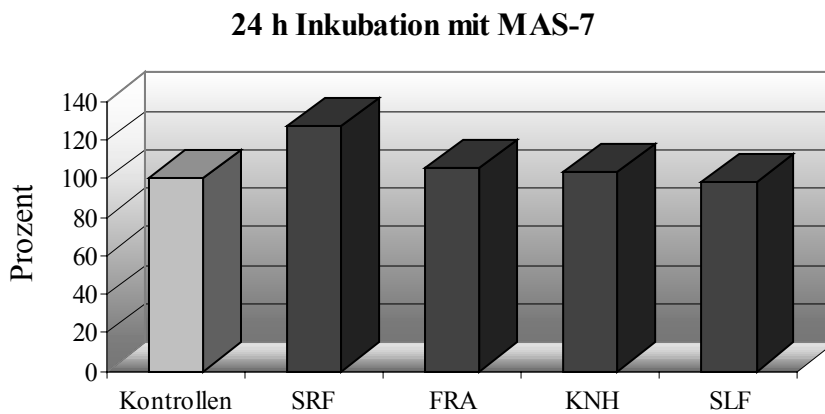


Abb. 7: dargestellt ist die IL-16/GAPDH-Ratio umgerechnet in Prozent, bezogen auf die jeweilige unbehandelte Kontrolle

3.5.1.3 Inkubation mit Wespengift, 10 μ M

Die Inkubation mit Wespengift reduzierte in drei Fällen (SRF, FRA und SLF) die Interleukin 16-Transkriptmenge auf 70-80 %. Bei dem Patienten KNH führte das Wespengift zu einer Steigerung des IL-16-Signals um 30 %. Wegen der entgegengesetzten Effekte der 4 Patienten wurde das Signifikanzniveau aber nicht erreicht.

LightCycler RT-PCR:

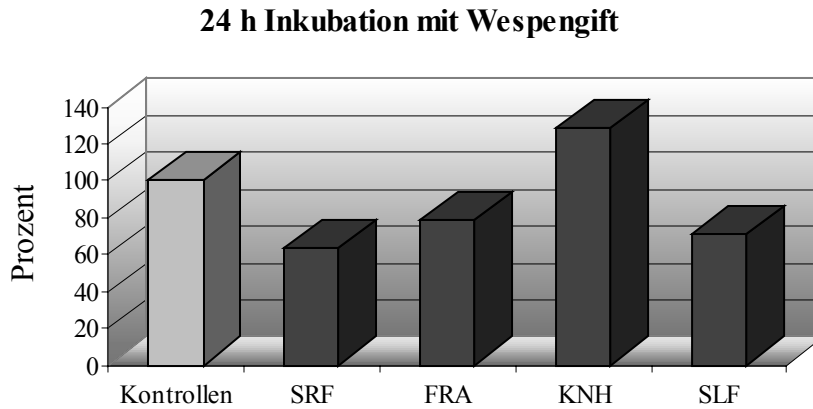


Abb. 8: dargestellt ist die IL-16/GAPDH-Ratio umgerechnet in Prozent, bezogen auf die jeweilige unbehandelte Kontrolle

Tab. 3: Mittelwerte und Standardabweichungen (Stabwn) der „crossing points“ nach 24 h Inkubation mit Wespengift

	Kontr.	SRF	FRA	KNH	SLF
<u>GAPDH</u>					
Mittelwerte:	13,771 *	14,870	13,595	13,703	13,670
Stabwn:	0,463	0,769	0,265	0,877	0,321
<u>IL-16</u>					
Mittelwerte:	28,178 *	29,440	29,290	28,365	27,853
Stabwn:	0,479	0,545	0,140	0,385	0,371

* die jeweiligen Mittelwerte der vier Patienten sind hier erneut gemittelt

3.5.1.4 Inkubation mit Ocadaic Acid, 10 nM

Bei Betrachtung der Zellen unter dem Mikroskop nach 24 h Inkubation mit Ocadaic Acid (OA) waren einige der Zellen vom Flaschenboden abgelöst und schwammen im Überstand. Die Zellen hatten ein kugeliges Aussehen, machten jedoch einen vitalen Eindruck (siehe Abb. 9a).

In allen vier Fällen wurde das IL-16-Signal stark verringert. Verglichen mit den unbehandelten Kontrollen ging die Menge an IL-16-mRNA auf 22 - 34 Prozent

zurück. Dies entspricht einer statistisch signifikanten Reduktion der Transkriptmenge.

Lichtmikroskopie: 24 h Inkubation mit Ocadaic Acid (OA)

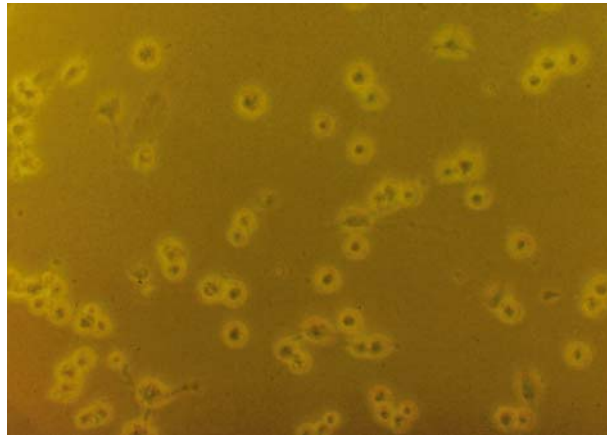


Abb. 9a: Die Zellen sind abgerundet und vom Flaschenboden gelöst.

LightCycler RT-PCR:

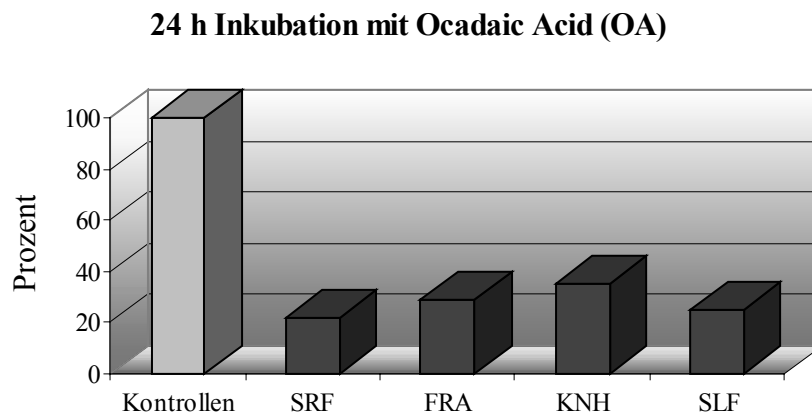


Abb. 9b: dargestellt ist die IL-16/GAPDH-Ratio umgerechnet in Prozent, bezogen auf die jeweilige unbehandelte Kontrolle

Tab. 4: Mittelwerte und Standardabweichungen (Stabwn) der „crossing points“ nach 24 h Inkubation mit OA

	Kontr.	SRF	FRA	KNH	SLF
<u>GAPDH</u>					
Mittelwerte:	13,771 *	14,183	13,470	13,480	13,990
Stabwn:	0,463	0,685	0,350	0,830	0,299
<u>IL-16</u>					
Mittelwerte:	28,178 *	31,163	30,970	30,285	30,493
Stabwn:	0,479	1,143	0,330	0,355	0,573

* die jeweiligen Mittelwerte der vier Patienten sind hier erneut gemittelt

3.5.1.5 Inkubation mit Ionomycin, 200 ng/ml

Im Vergleich zu dem spontan vorhandenen IL-16-Signal trat in drei Fällen durch die Inkubation mit Ionomycin über 24 h eine geringe Reduktion auf. Die IL-16 mRNA-Menge sank auf Werte zwischen 82 und 90 Prozent ab, jedoch nicht signifikant. Bei dem Patienten FRA zeigte sich keine Veränderung.

LightCycler RT-PCR:

24 h Inkubation mit Ionomycin

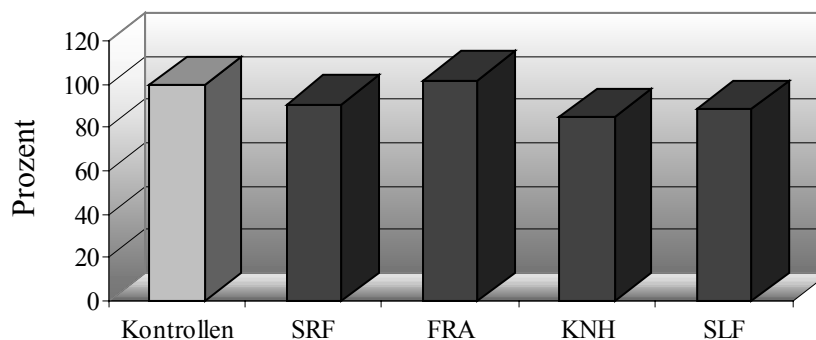


Abb. 10: dargestellt ist die IL-16/GAPDH-Ratio umgerechnet in Prozent, bezogen auf die jeweilige unbehandelte Kontrolle

3.5.1.6 Inkubation mit cAMP, 10 μ M

Bei der Inkubation mit cAMP wurde die IL-16-mRNA-Menge bei einem Patienten auf 74 Prozent reduziert. Bei den anderen drei Patienten zeigte sich jedoch eine Erhöhung des IL-16-Signals um 20-30 %. Die Veränderungen erwiesen sich als nicht signifikant.

LightCycler RT-PCR:

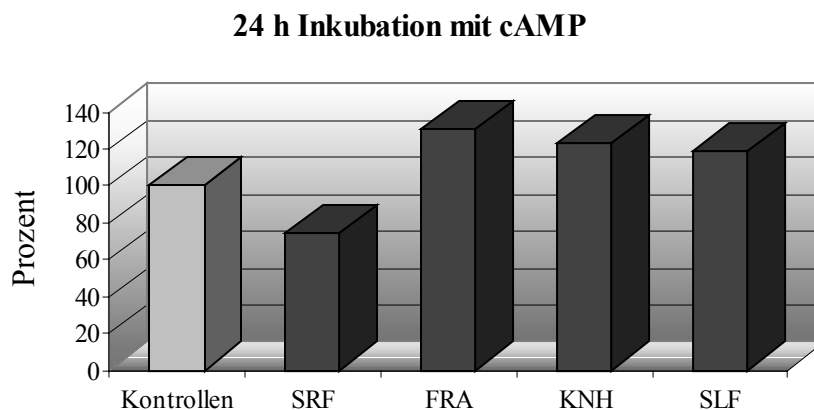


Abb. 11: dargestellt ist die IL-16/GAPDH-Ratio umgerechnet in Prozent, bezogen auf die jeweilige unbehandelte Kontrolle

3.5.1.7 Inkubation mit Forskolin, 5 μ M

Nach 24 h Inkubation mit Forskolin konnte das IL-16-Transkript in drei Fällen erhöht werden. Bei zwei der untersuchten Patienten (SLF und KNH) konnte sogar eine deutliche Steigerung auf das 2,5- bzw. 3-fache im Vergleich mit den unbehandelten Zellen erzielt werden. Die Veränderung erwies sich aber als nicht signifikant. Lediglich bei dem Patienten SRF führte die Behandlung mit Forskolin zu einer geringen Reduktion des IL-16-Signals auf 75 %.

LightCycler RT-PCR:

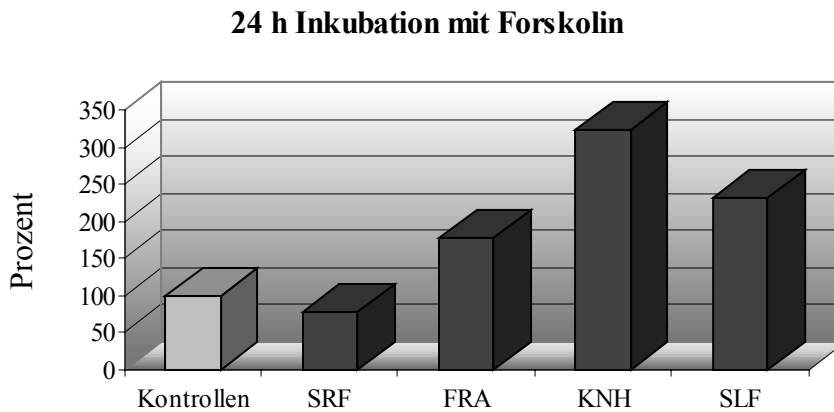


Abb. 12: dargestellt ist die IL-16/GAPDH-Ratio umgerechnet in Prozent, bezogen auf die jeweilige unbehandelte Kontrolle

Tab.5: Mittelwerte und Standardabweichungen (Stabwn) der „crossing points“ nach 24 h Inkubation mit Forskolin

	Kontr.	SRF	FRA	KNH	SLF
<u>GAPDH</u>					
Mittelwerte:	13,771 *	14,033	13,185	13,778	13,557
Stabwn:	0,463	0,760	0,155	0,853	0,298
<u>IL-16</u>					
Mittelwerte:	28,178 *	28,207	27,395	26,465	25,683
Stabwn:	0,479	0,538	0,145	0,375	0,258

* die jeweiligen Mittelwerte der vier Patienten sind hier erneut gemittelt

3.5.1.8 Inkubation mit Staurosporin, 10 nM

Bei der Inkubation mit Staurosporin zeigte sich eine uneinheitliche Veränderung. Bei einem der vier Patienten (SLF) änderte sich die IL-16-mRNA-Menge durch Staurosporin nicht. Ein Patient (KNH) reagierte mit einer starken Erhöhung der IL-16-Transkription auf das 2,5-fache verglichen mit der unbehandelten Kontrolle. Die Patienten SRF und FRA zeigten eine Steigerung

um gut 30 Prozent. Es handelte sich jedoch nicht um eine signifikante Beeinflussung des IL-16-Signals.

LightCycler RT-PCR:

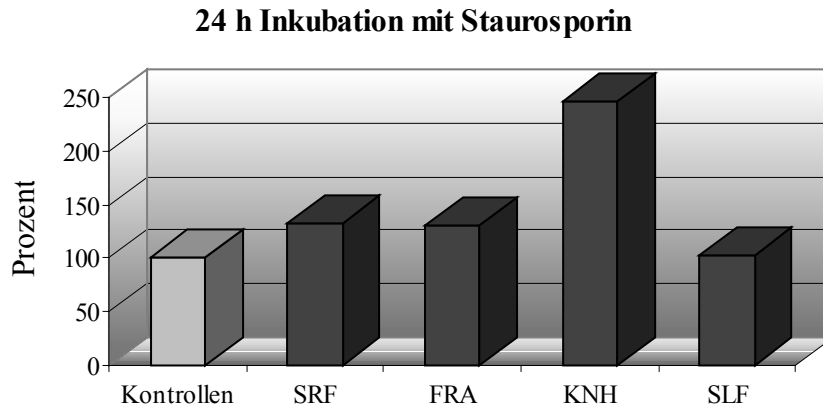


Abb. 13: dargestellt ist die IL-16/GAPDH-Ratio umgerechnet in Prozent, bezogen auf die jeweilige unbehandelte Kontrolle

Tab. 6: Mittelwerte und Standardabweichungen (Stabwn) der „crossing points“ nach 24 h Inkubation mit Stauro

	Kontr.	SRF	FRA	KNH	SLF
GAPDH					
Mittelwerte:	13,771 *	14,237	13,180	13,355	13,480
Stabwn:	0,463	0,785	0,270	0,954	0,324
IL-16					
Mittelwerte:	28,178 *	27,443	27,870	27,170	27,047
Stabwn:	0,479	0,539	0,270	0,430	0,249

* die jeweiligen Mittelwerte der vier Patienten sind hier erneut gemittelt

3.5.1.9 Inkubation mit PMA (Phorbol-Myristat-Acetat), 1 ng/ml

Durch die Behandlung mit PMA über 24 h zeigte sich in allen vier Fällen eine Reduktion des IL-16-Signals. Bei den Patienten KNH und SLF ging die IL-16-mRNA-Menge verglichen mit der unbehandelten Kontrolle auf ca. zwei Drittel zurück, bei FRA auf 85 Prozent. Beim vierten untersuchten Patienten (SRF) trat eine starke Reduktion um 60 Prozent auf. Insgesamt erwies sich die Signalverringering aber nicht als signifikant.

LightCycler RT-PCR:

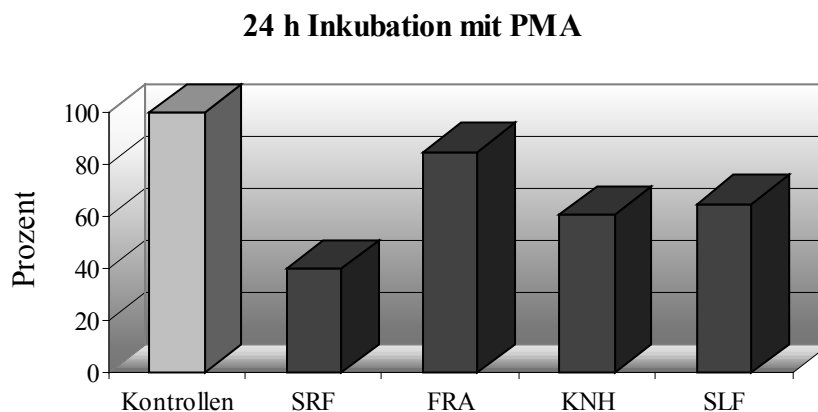


Abb. 14: dargestellt ist die IL-16/GAPDH-Ratio umgerechnet in Prozent, bezogen auf die jeweilige unbehandelte Kontrolle

Tab. 7: Mittelwerte und Standardabweichungen (Stabwn) der „crossing points“ nach 24 h Inkubation mit PMA

	Kontr.	SRF	FRA	KNH	SLF
<u>GAPDH</u>					
Mittelwerte:	13,771 *	14,130	13,295	13,648	13,777
Stabwn:	0,463	0,732	0,265	0,873	0,332
<u>IL-16</u>					
Mittelwerte:	28,178 *	29,530	28,830	29,370	28,167
Stabwn:	0,479	0,552	0,180	0,330	0,297

* die jeweiligen Mittelwerte der vier Patienten sind hier erneut gemittelt

3.5.1.10 Inkubation mit H7 (Dihydrochlorid), 100 µM

Nach 24 stündiger Inkubation mit H7 waren unter dem Mikroskop nur noch sehr wenige vitale Zellen zu sehen. Der Zellrasen war aufgelockert und im Überstand schwammen viele Zelltrümmer herum. Nur vereinzelte Zellen waren adhärent geblieben (siehe Abbildung 15a). Es konnte dementsprechend nur sehr wenig RNA isoliert werden.

In der LightCycler PCR zeigte sich, daß durch die Inkubation mit H7 bei allen vier Patienten das IL-16-Signal auf ein Minimum reduziert wurde. Im Vergleich zur Kontrolle sank die IL-16-mRNA-Transkription auf ein Zehntel, was einen signifikanten Rückgang bedeutet.

Lichtmikroskopie: *24 h Inkubation mit H7*

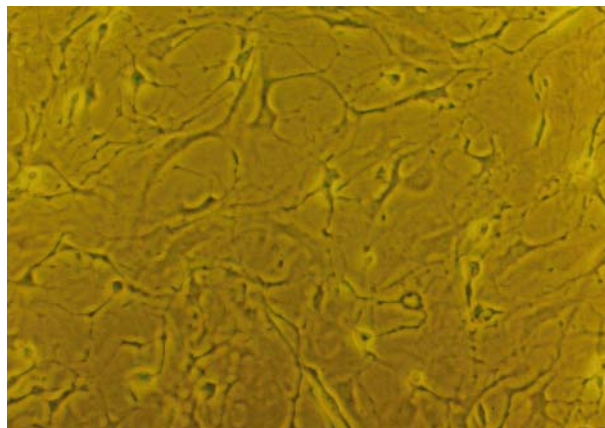


Abb. 15a: Es finden sich überwiegend avitale Zellen in der Kultur.

LightCycler RT-PCR:

24 Inkubation mit H7

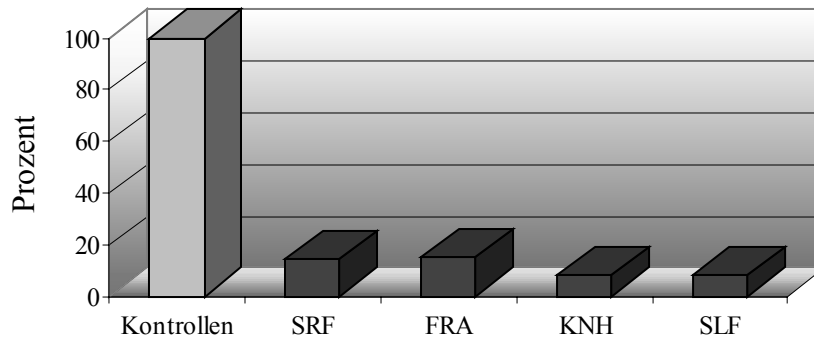


Abb. 15b: dargestellt ist die IL-16/GAPDH-Ratio umgerechnet in Prozent, bezogen auf die jeweilige unbehandelte Kontrolle

Tab. 8: Mittelwerte und Standardabweichungen (Stabwn) der „crossing points“ nach 24 h Inkubation mit H7

	Kontr.	SRF	FRA	KNH	SLF
<u>GAPDH</u>					
Mittelwerte:	13,771 *	13,943	13,175	13,508	13,787
Stabwn:	0,463	0,778	0,255	0,912	0,316
<u>IL-16</u>					
Mittelwerte:	28,178 *	30,953	32,010	32,950	31,683
Stabwn:	0,479	0,601	0,380	0,040	0,885

* die jeweiligen Mittelwerte der vier Patienten sind hier erneut gemittelt

Im folgenden ist beispielhaft an der Kultur FRA die Darstellung im 1,5 %igen Agarosegel gezeigt. Es sind alle eingesetzten Substanzen in einem Gel dargestellt.

24 h Inkubation mit diversen Chemikalien

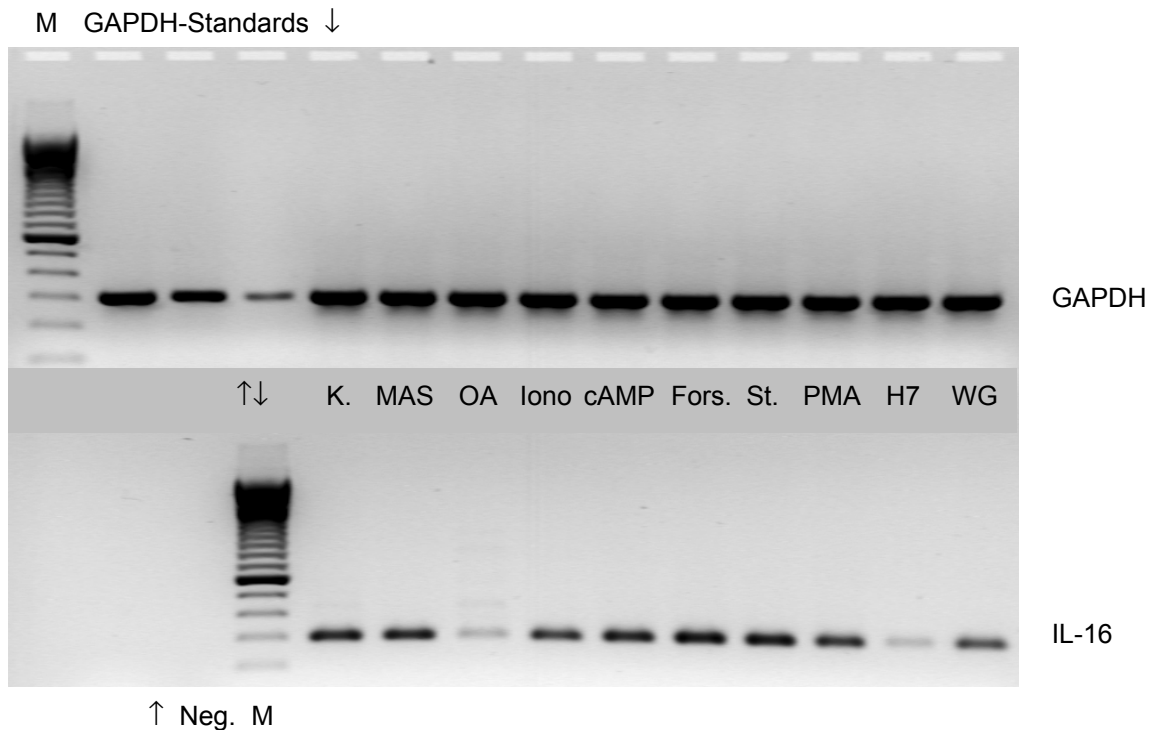


Abb. 16: gleichmäßige GAPDH-Banden sprechen für eine gleichmäßige cDNA-Menge, es zeigt sich ein gegenüber der Kontrolle etwas intensiveres IL-16-Signal durch Forskolin und Staurosporin, signifikant reduziert ist das Signal nach Inkubation mit OA und H7

M = Marker, Neg. = Negativkontrolle, d.h. Wasser

K. = unbehandelte Kontrolle, MAS = MAS-7, OA = Ocadaic Acid,

Iono = Ionomycin, Fors. = Forskolin, St. = Staurosporin,

WG. = Wespengift

3.5.2 Untersuchung einer neonatalen Hautfibroblasten-Zelllinie

Es wurden neonatale dermale Fibroblasten der Charge NHDF 6499 in der 3. Passage für diesen Versuch herangezogen. Nach 24 stündiger Inkubation der Zellen mit den verschiedenen Pharmaka zeigte sich folgendes:

Die unbehandelten Zellen zeigten ein spontanes IL-16-Signal. Eine deutliche Steigerung des IL-16-Signals trat lediglich durch Staurosporin auf. Eine geringe Reduktion konnte bei Inkubation mit Ionomycin und Forskolin beobachtet werden. Durch Wespengift, Ocadaic Acid und PMA wurde die IL-16-Transkriptmenge deutlich bis stark reduziert. Ohne Auswirkung blieb die Inkubation mit MAS-7 oder cAMP.

LightCycler RT-PCR:

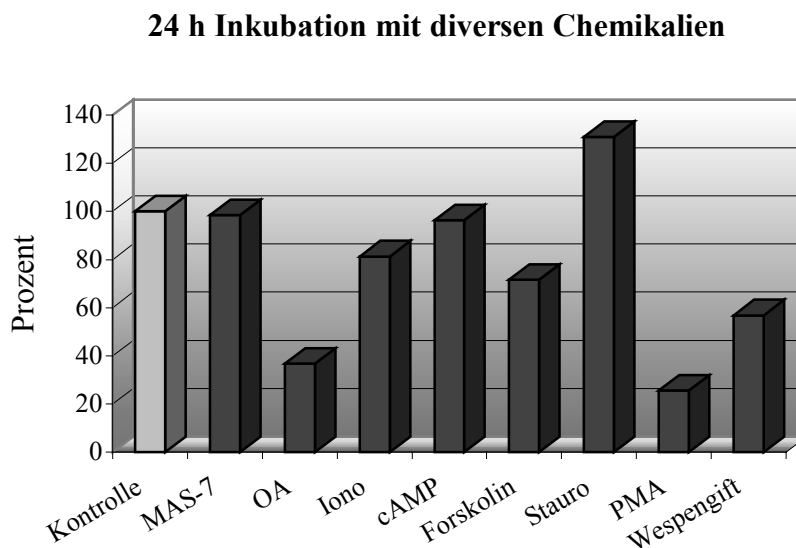


Abb. 17: dargestellt ist die IL-16/GAPDH-Ratio umgerechnet in Prozent, bezogen auf die jeweilige unbehandelte Kontrolle

Tab. 9: Mittelwerte und Standardabweichungen (Stabwn) der „crossing points“ nach 24 h Inkubation mit diversen Chemikalien (neonatale Hautfibroblasten)

NHDF	Kontr.	MAS-7	OA	Iono	cAMP	Fors.	Stauro	PMA	H7	Wesp.
<u>GAPDH</u>										
Mittelwerte:	14,796	15,110	14,712	15,030	14,404	14,640	14,666	14,704	Ø	14,768
Stabwn:	0,899	0,945	0,841	0,903	0,835	0,653	0,813	0,747		0,713
<u>IL-16</u>										
Mittelwerte:	28,223	28,617	30,007	28,907	27,900	28,570	27,673	30,550	Ø	29,220
Stabwn:	0,872	0,897	0,949	0,865	0,880	0,882	0,947	0,832		0,987

Ø keine RNA-Isolation möglich, da Zellen stark geschädigt waren

3.5.3 Untersuchung synovialer Fibroblasten von Patienten

3.5.3.1 Unbehandelte Zellen

Die beiden verwendeten Kulturen der Patienten SRF (3. Subkultur) und SLF (4. Subkultur) zeigten in der RT-PCR (LightCycler) ein spontanes IL-16-mRNA-Signal.

In der Auswertung wurde dieses IL-16-Signal im Verhältnis zum GAPDH-Signal jeweils als 100 Prozent gewertet. Die Veränderungen des IL-16-Transkriptes durch die Inkubation mit den einzelnen Pharmaka wurden in Relation zu diesem Wert gesetzt.

3.5.3.2 Pharmakoninduktion synovialer Fibroblasten zweier Patienten

Nach 24 h Inkubation mit den verschiedenen Pharmaka konnte folgendes beobachtet werden:

Die Behandlung mit Forskolin bewirkte in beiden Fällen eine enorme Zunahme der Interleukin 16-Expression auf das 3- bis 3,5-fache des spontanen IL-16-Signals.

Bei dem Patienten SRF konnte das IL-16-Signal außerdem durch PMA und Staurosporin stark angehoben werden, nämlich auf das 2- bzw. 1,5-fache. Ein

geringerer Anstieg ließ sich durch cAMP und MAS-7 erzielen. Keine bzw. nur eine geringe Reduktion erbrachte die Inkubation mit Ionomycin und Wespengift bei diesem Patienten.

Eine deutliche Verringerung des IL-16-Signals konnte nach Behandlung mit OA gezeigt werden (40 %). Durch H7 wurde die IL-16-Expression auf 14 Prozent verglichen mit dem spontanen Signal minimiert.

Anders dagegen beim Patienten SLF: hier konnte das IL-16-Signal durch das Wespengift auf 170 % gesteigert werden, wohingegen durch Staurosporin und PMA keine Änderung bzw. sogar eine deutliche Reduktion des Signals (PMA auf 40 %) auftrat. Durch Zugabe von MAS-7 und Ionomycin zeigte sich eine mäßige Zunahme der Transkriptmenge.

Keine Auswirkung auf die IL-16-Transkription hatte beim Patienten SLF die Inkubation mit cAMP.

Wie beim Patienten SRF ließ sich auch bei diesem Patienten eine starke Verringerung des IL-16-Signals durch H7 auf 20 Prozent beobachten.

Eine Auswertung der mit OA behandelten Zellen war hier nicht möglich, da diese durch die Substanz stark in Mitleidenschaft gezogen waren und sich für eine RNA-Isolierung nicht mehr genügend vitale Zellen in Kultur befanden.

Die Pharmakonzugabe bewirkte in keinem Fall eine signifikante Beeinflussung der Transkriptmenge.

LightCycler RT-PCR:

Synoviale Fibroblasten der Patienten SRF und SLF

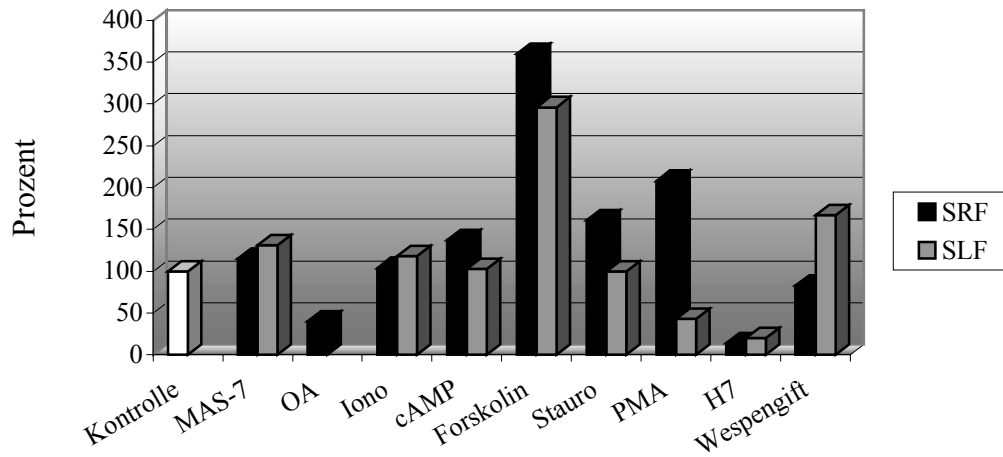


Abb. 18: dargestellt ist die IL-16/GAPDH-Ratio umgerechnet in Prozent, bezogen auf die jeweilige unbehandelte Kontrolle

Tab. 10: Mittelwerte und Standardabweichungen (Stabwn) der „crossing points“ nach 24 h Inkubation mit diversen Chemikalien (synoviale Fibroblasten)

SRF syn	Kontr.	MAS-7	OA	Iono	cAMP	Fors.	Stauro	PMA	H7	Wesp.
<u>GAPDH</u>										
Mittelw.:	14,586	14,188	14,270	14,306	14,214	14,398	14,228	14,234	14,854	14,722
Stabwn:	0,178	0,388	0,428	0,421	0,402	0,428	0,317	0,351	0,359	0,372
<u>IL-16</u>										
Mittelw.:	28,174	27,750	29,547	28,113	27,367	25,980	27,160	27,253	31,700	28.877
Stabwn:	0,546	0,653	0,787	0,587	0,649	0,616	0,629	0,511	0,551	0,560
<u>SLF syn</u>										
<u>GAPDH</u>										
Mittelw.:	14,586	14,925	Ø	15,313	14,490	14,515	14,303	14,455	14,383	14,955
Stabwn:	0,178	0,909		0,877	0,778	0,804	0,854	0,713	0,865	0,867
<u>IL-16</u>										
Mittelw.:	28,174	28,937	Ø	29,407	28,930	26,620	28,820	29,753	31,383	28,253
Stabwn:	0,546	0,473		0,243	0,366	0,287	0,226	0,443	0,439	0,210

Ø keine RNA-Isolation möglich, da Zellen stark geschädigt waren

3.5.4 Behandlung mit Staurosporin über 48 h

3.5.4.1 Dermale Fibroblasten der Patienten KNH und OTA

Für die Versuche wurden die Zellen beider Patienten bis zur 3. Subkultur passagiert.

Auf die Inkubation mit Staurosporin reagierten beide Patienten annähernd gleich. Anzumerken ist, daß sich sowohl für das spontane IL-16-Signal als auch für das modifizierte Signal eine signifikante Zunahme mit der Zeit herausgestellt hat, einzige Ausnahme ist das IL-16-Signal der Staurosporin-behandelten Zellen nach 12 h.

Nach 6 stündiger Inkubation konnte das IL-16-Signal durch Staurosporin kaum bzw. nur gering (KNH: 1,4-fach) gegenüber dem spontanen Signal verstärkt werden.

Bereits nach 12 h ließ sich jedoch in beiden Fällen eine deutliche Steigerung der IL-16-Transkription auf das rund 2,5-fache beobachten.

Weitere 12 h später (nach 24 h) betrug das modifizierte Signal etwa das Doppelte des Signals der unbehandelten Zellen.

Auch nach 48 h war das Staurosporin-induzierte IL-16-Signal 1,7-fach (KNH) bzw. 2,3-fach (OTA) stärker.

Man kann also festhalten, daß ab einer Inkubationsdauer von mindestens 12 h eine deutliche Auswirkung von Staurosporin auf die IL-16-Expression bei nativen Hautfibroblasten auftrat, die jedoch nicht das Signifikanzniveau von 5 % erreichte.

Das folgende Diagramm zeigt den Verlauf beispielhaft an der Kultur KNH.

LightCycler RT-PCR:

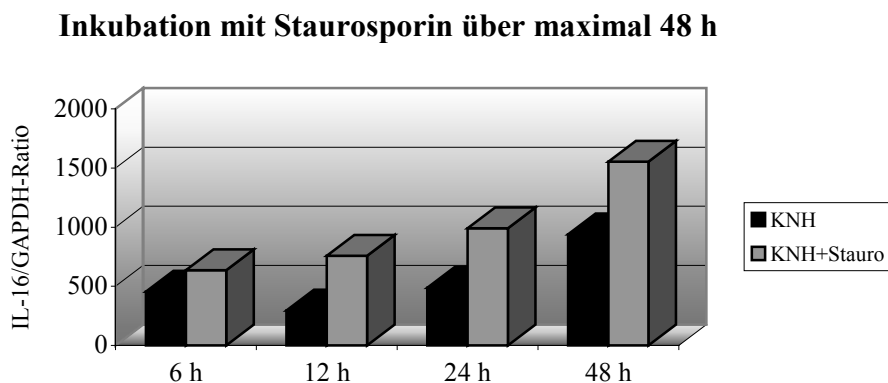


Abb. 19: dargestellt ist die IL-16/GAPDH-Ratio

Tab. 11: Mittelwerte und Standardabweichungen (Stabwn) der „crossing points“ nach Inkubation mit Stauro über maximal 48 h

KNH	<u>6 h</u>		<u>12 h</u>		<u>24 h</u>		<u>48 h</u>	
	Kontr.	Stauro	Kontr.	Stauro	Kontr.	Stauro	Kontr.	Stauro
<u>GAPDH</u>								
Mittelw.:	14,627	14,640	14,413	14,397	14,590	14,483	15,577	15,377
Stabwn:	0,332	0,366	0,374	0,338	0,319	0,257	0,236	0,330
<u>IL-16</u>								
Mittelw.:	29,700	28,945	30,180	28,295	29,525	27,845	29,275	27,855
Stabwn:	0,200	0,115	0,040	0,105	0,125	0,235	0,405	0,075

Darstellung im 1,5 %igen Agarosegel:

Inkubation mit Staurosporin über maximal 48 h

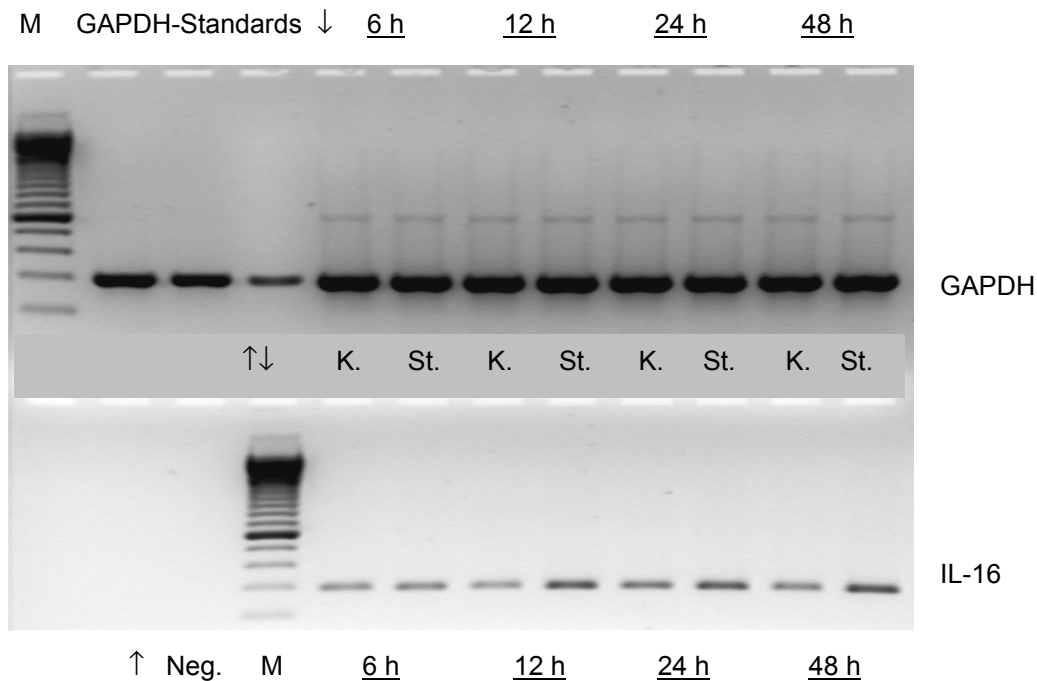


Abb. 20: gleichmäßige GAPDH-Banden sprechen für eine gleichmäßige cDNA-Menge, es zeigt sich eine signifikante Signalintensivierung mit zunehmender Inkubationsdauer sowie eine (nicht signifikante)

Steigerung des Staurosporin-induzierten IL-16-Signals verglichen mit der Kontrolle

M = Marker, Neg. = Negativkontrolle, d.h. Wasser

K. = unbehandelte Kontrolle, St. = Staurosporin,

3.5.4.2 Neonatale Hautfibroblasten

Die neonatalen dermalen Fibroblasten NHDF 6381 wurden in der 4. Subkultur für das Experiment eingesetzt, die Zellen der zweiten Charge (NHDF 6455) wurden bis zur fünften Passage subkultiviert.

Wie bei den oben beschriebenen nativen Hautfibroblasten zeigte sich auch bei diesen Zellen eine kontinuierliche Zunahme beider IL-16-Signale mit zunehmender Inkubationsdauer (signifikant). Bei den Zellen in der 4. Subkultur war die Zunahme des IL-16-Signals allerdings sehr viel ausgeprägter als bei denen in der 5. Subkultur.

Desweiteren unterschieden sich beide Kulturen deutlich in der Reaktion auf die 6 stündige Inkubation mit Staurosporin: Die Zellen der 4. Passage reagierten kaum, die Zellen der höheren Passage zeigten jedoch eine Steigerung der IL-16-Transkription auf rund das Doppelte.

Für die zwei folgenden Zeitpunkte verhielten sich die Kulturen gleich. Nach 12 h konnte eine geringe Erhöhung des Signals auf das etwa 1,4-fache beobachtet werden. 24 h nach Beginn der Inkubation betrug das modifizierte Signal etwa das Doppelte des spontanen Signals.

Nach 48 h blieb die Steigerung bei den Zellen der 5. Passage etwa beim zweifachen, während in der 4. Subkultur die IL-16-Expression bei den behandelten Zellen auf das 2,5-fache angehoben wurde.

Es zeigte sich also auch bei diesen Zellen, daß das IL-16-Transkript durch Staurosporin erhöht werden kann, allerdings erwies sich auch hier die Steigerung als nicht signifikant.

Die folgende Abbildung zeigt den Verlauf anhand der Kultur mit neonatalen dermalen Fibroblasten in der 4. Subkultur.

LightCycler RT-PCR:

Inkubation mit Staurosporin über maximal 48 h

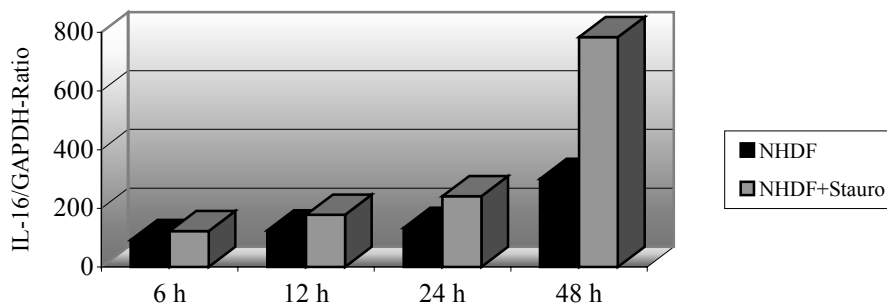


Abb. 21: dargestellt ist die IL-16/GAPDH-Ratio

Tab. 12: Mittelwerte und Standardabweichungen (Stabwn) der „crossing points“ nach Inkubation mit Stauro über maximal 48 h (neonatale Hautfibroblasten)

NHDF, 4. SK	6 h		12 h		24 h		48 h	
	Kontr.	Stauro	Kontr.	Stauro	Kontr.	Stauro	Kontr.	Stauro
<u>GAPDH</u>								
Mittelwerte:	15,097	14,700	14,743	14,827	14,990	14,550	15,357	15,050
Stabwn:	0,411	0,318	0,474	0,349	0,324	0,304	0,381	0,492
<u>IL-16</u>								
Mittelwerte:	32,110	31,455	31,220	30,665	31,335	29,920	30,270	27,995
Stabwn:	0,550	0,695	0,690	0,575	0,455	0,680	0,730	0,615

3.5.5 Behandlung mit MAS-7 über 48 h

3.5.5.1 Dermale Fibroblasten von drei Patienten

Für diesen Versuch wurden native dermale Fibroblasten der Patienten HTF, OTA und KNH verwendet. Bis auf die Zellen von Patient HTF (4.Subkultur) kamen die Zellen in der 3. Subkultur zum Einsatz.

Die drei Kulturen verhielten sich in ihrer Reaktion auf die Behandlung mit MAS-7 von geringen Unterschieden abgesehen ziemlich ähnlich.

Nach 6 h zeigten zwei der drei Kulturen, nämlich HTF und OTA einen geringen Anstieg des IL-16-Signals um ca. 40 Prozent gegenüber dem spontanen Signal. Beim Patienten KNH wurde das Signal durch MAS-7 um 20 Prozent leicht reduziert.

12 h nach Zugabe der Substanz konnte in allen drei Fällen eine Reduktion der IL-16-Transkription um rund 30 Prozent beobachtet werden. Das gleiche Ergebnis zeigte sich nach 24 stündiger Inkubation. Auch hier war das modifizierte Signal jeweils etwa ein Drittel niedriger als das spontane Signal.

Nach 48 h Behandlung mit MAS-7 verhielten sich die Kulturen OTA und HTF erneut ähnlich. Hier wurde die IL-16-Expression um 30 bzw. 50 Prozent gesenkt. Bei den Zellen von KNH zeigte sich jedoch durch MAS-7 nach 48 h keine Veränderung des Expressionsmusters.

Auch hier sollte erwähnt werden, daß bei den unbehandelten Zellen das spontane IL-16-Signal über 48 h langsam zunahm. Das MAS-7-induzierte Signal stieg bei den Patienten OTA und KNH ebenfalls leicht an, bei HTF allerdings nicht.

Die Abbildung 22 zeigt den Verlauf der IL-16-Expression nach der Inkubation mit MAS-7 über 48 h beispielhaft an der Kultur OTA.

LightCycler RT-PCR:

Inkubation mit MAS-7 über maximal 48 h

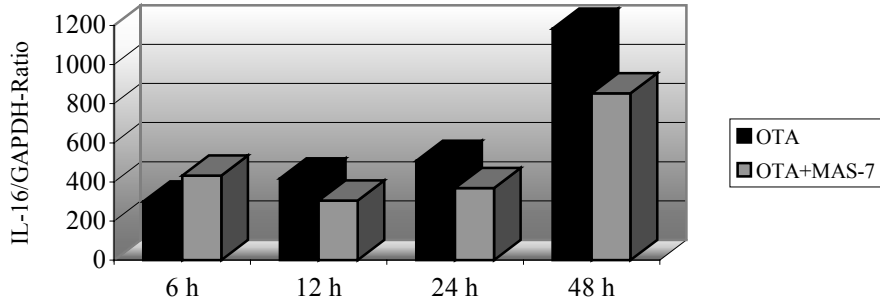


Abb. 22: dargestellt ist die IL-16/GAPDH-Ratio

Tab. 13: Mittelwerte und Standardabweichungen (Stabwn) der „crossing points“ nach Inkubation mit MAS-7 über maximal 48 h

OTA	6 h		12 h		24 h		48 h	
	Kontr.	MAS-7	Kontr.	MAS-7	Kontr.	MAS-7	Kontr.	MAS-7
<u>GAPDH</u>								
Mittelwerte:	14,157	14,643	14,403	14,290	14,483	14,590	15,283	14,867
Stabwn:	0,425	0,419	0,408	0,411	0,367	0,397	0,486	0,464
<u>IL-16</u>								
Mittelwerte:	29,360	29,080	28,940	29,505	28,795	29,425	27,800	28,080
Stabwn:	0,310	0,310	0,200	0,245	0,235	0,315	0,340	0,250

Darstellung im 1,5%igen Agarosegel:

Inkubation mit MAS-7 über maximal 48 h

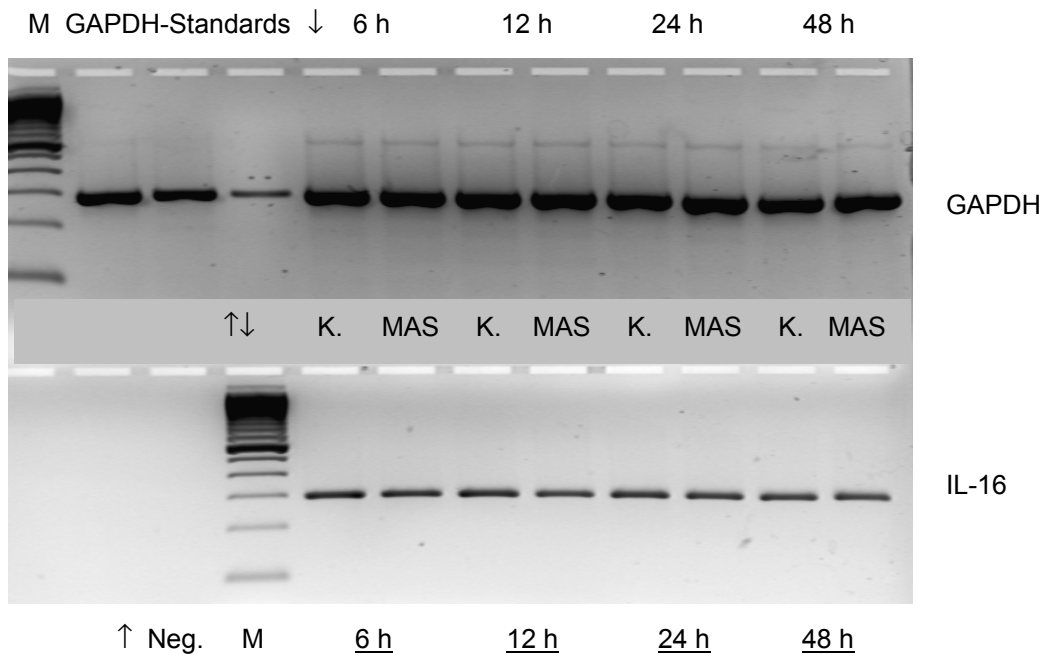


Abb. 23: gleichmäßige GAPDH-Banden sprechen für eine gleichmäßige cDNA-Menge, in der Geldarstellung ist kein Unterschied in der Intensität der beiden IL-16-Signale (spontan bzw. MAS-7-induziert) zu erkennen
M = Marker, Neg. = Negativkontrolle, d.h. Wasser
K. = unbehandelte Kontrolle, MAS = MAS-7,

3.5.5.2 Adulte und neonatale Hautfibroblasten aus Zelllinien

Es wurden adulte dermale Fibroblasten (NHDF 6448) in der 4. Subkultur für den Versuch herangezogen.

Wie im Schaubild unten dargestellt konnte durch MAS-7 zu den Zeitpunkten 6, 12 und 48 h eine geringe Steigerung (um jeweils ca. 30 Prozent) der IL-16-Transkription verglichen mit den unbehandelten Zellen erzielt werden. Nach

24 h Inkubation zeigte sich sogar ein sehr deutlicher Anstieg des IL-16-Signals um das 2,5-fache.

Bemerkenswert ist das Absinken der anfänglich hohen IL-16-Signale nach 12 h und die folgende allmähliche Annäherung an die Höhe der ersten Signale. Dies trifft sowohl für das spontane als auch für das MAS-7-induzierte Signal zu.

LightCycler RT-PCR:

Inkubation mit MAS-7 über maximal 48 h

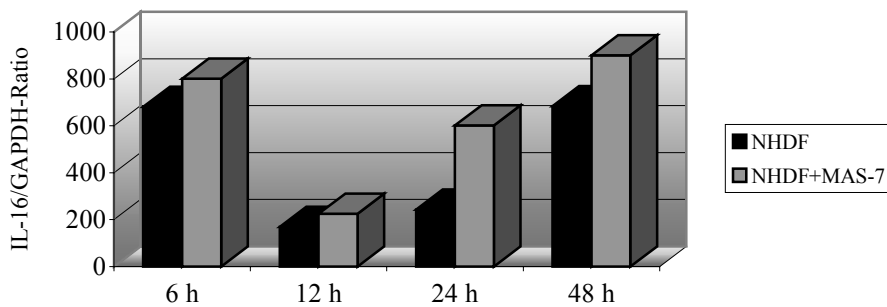


Abb. 24: dargestellt ist die IL-16/GAPDH-Ratio

Tab. 14: Mittelwerte und Standardabweichungen (Stabwn) der „crossing points“ nach Inkubation mit MAS-7 über maximal 48 h

NHDF adult	6 h		12 h		24 h		48 h	
	Kontr.	MAS-7	Kontr.	MAS-7	Kontr.	MAS-7	Kontr.	MAS-7
<u>GAPDH</u>								
Mittelwerte:	15,173	15,390	14,483	14,697	14,280	14,480	14,467	14,480
Stabwn:	0,158	0,326	0,379	0,313	0,289	0,373	0,318	0,283
<u>IL-16</u>								
Mittelwerte:	28,265	28,085	30,090	29,720	29,245	27,815	27,545	26,970
Stabwn:	0,275	0,255	0,280	0,200	0,365	0,135	0,275	0,210

Bei den neonatalen Hautfibroblasten wurden einerseits Zellen aus der Charge 6381 in der 4. Subkultur, andererseits Zellen der Charge 6455 in der 6. Subkultur eingesetzt.

Bis auf den ersten Zeitpunkt zeigten beide Kulturen ganz ähnliche IL-16-Expressionsmuster.

Nach 6 h konnte für die Zellen in der 4. Subkultur eine Reduktion des Signals um 30 % beobachtet werden, wohingegen die Zellen in der höheren Passage hier auf das MAS-7 mit einer Zunahme der IL-16-Transkription um rund 40 Prozent reagierten.

Weitere 6 h später zeigte sich im Falle der 6. Subkultur keine Änderung durch MAS-7. Bei den anderen Zellen wurde das Signal um 40 Prozent erniedrigt.

Zu den zwei letzten Zeitpunkten ließ sich entweder keine Auswirkung (nach 24 h) durch MAS-7 erkennen bzw. lediglich eine minimale Reduktion des Signals um maximal 20 Prozent nachweisen (nach 48 h).

Auffallend war, daß bei den Zellen der höheren Passage kein stetiger Anstieg der IL-16-Signale (wie bei der 4. Subkultur) zu beobachten war, sondern diese über den ganzen Beobachtungszeitraum relativ konstant blieben.

3.5.5.3 Synoviale Fibroblasten des Patienten HTF

Für diesen Versuch wurden die nativen synovialen Fibroblasten bis zur 4. Passage subkultiviert.

Es konnte zu allen vier Zeitpunkten eine Steigerung der IL-16-Transkription durch die Inkubation mit MAS-7 beobachtet werden.

Nach 6 bzw. 12 h war die Zunahme mit jeweils rund 30 Prozent jedoch noch relativ gering, wohingegen nach 24 h und nach 48 h das MAS-7-induzierte IL-16-Signal auf gut das Doppelte des spontanen Signals erhöht werden konnte.

LightCycler RT-PCR:

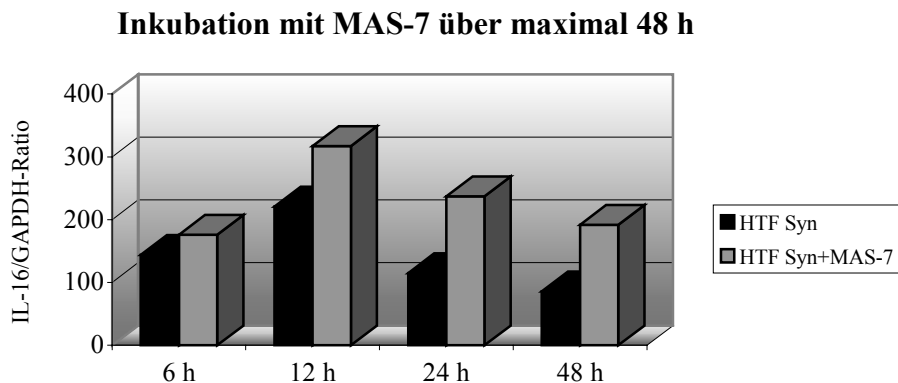


Abb. 25: dargestellt ist die IL-16/GAPDH-Ratio

Tab. 15: Mittelwerte und Standardabweichungen (Stabwn) der „crossing points“ nach Inkubation mit MAS-7 über maximal 48 h (adulte Hautfibroblasten)

HTF syn	6 h		12 h		24 h		48 h	
	Kontr.	MAS-7	Kontr.	MAS-7	Kontr.	MAS-7	Kontr.	MAS-7
<u>GAPDH</u>								
Mittelwerte:	13,995	14,000	13,630	13,825	13,660	13,920	13,975	13,840
Stabwn:	0,335	0,340	0,340	0,315	0,450	0,410	0,365	0,360
<u>IL-16</u>								
Mittelwerte:	29,070	28,605	27,935	27,465	29,090	28,065	29,870	28,330
Stabwn:	0,110	0,405	0,145	0,245	0,100	0,195	0,270	0,290

3.6 Ergebnisse der IL-18-Regulation durch Pharmakoninduktion

3.6.1 Untersuchung dermalen Fibroblasten von Patienten

3.6.1.1 Unbehandelte Zellen

Bei allen untersuchten Kulturen (2 Patienten, s. unten) zeigte sich in der RT-PCR (LightCycler) ein spontanes IL-18-mRNA-Signal.

In der Auswertung wurde dieses IL-18-Signal im Verhältnis zum GAPDH-Signal jeweils als 100 Prozent gewertet. Die Veränderungen des IL-18-Transkriptes durch die Inkubation mit den einzelnen Pharmaka wurden in Relation zu diesem Wert gesetzt.

3.6.1.2 Pharmakoninduktion bei Hautfibroblasten zweier Patienten

Die Zellen der beiden Patienten KNH und FRA wurden in der 3. Passage eingesetzt.

Wie in der Abb. 26 unten dargestellt, zeigte sich nach 24 h Inkubation mit verschiedenen Pharmaka folgendes:

Beim Patienten KNH ließ sich durch Ionomycin eine Steigerung des IL-18-Signals um 40 Prozent erzielen, bei FRA zeigte sich lediglich eine Zunahme um rund 10 Prozent. Ansonsten konnte eine geringe Steigerung (10 %) beim Patienten KNH nur noch durch Zugabe von PMA erreicht werden. Bei FRA führte dies zur Reduktion des Signals auf 83 Prozent.

Die Inkubation mit MAS-7, OA, cAMP und Wespengift bewirkte im Falle des Patienten KNH keine Änderung bzw. eine mäßige Verringerung der IL-18-Transkriptmenge um maximal 20 %.

Beim Patienten FRA reduzierten MAS-7 und Wespengift das Signal um ca. 20 %, OA und cAMP bewirkten eine Reduktion um 50 %.

Die Behandlung mit Staurosporin führte bei KNH ebenso wie Forskolin zu einer deutlich reduzierten IL-18-Transkriptmenge (20 %). Bei den FRA-Zellen ließ sich das Transkript durch Forskolin ebenfalls auf ca. 25 % reduzieren, jedoch bewirkte Staurosporin verglichen mit KNH nur eine geringere Reduktion auf ca. 60 Prozent.

Die IL-18-Expression beim Patienten KNH wurde durch H7 fast ganz unterdrückt. Beim Patienten FRA hingegen trat lediglich eine merkliche Verringerung auf 35 Prozent auf.

Insgesamt zeigte sich, daß die Zellen des Patienten KNH mit Ausnahme der H7-Behandlung höhere bzw. allenfalls gleiche IL-18-Signale aufwiesen.

Das Signifikanzniveau von 5 % wurde in keinem Fall erreicht.

LightCycler RT-PCR:

Hautfibroblasten der Patienten KNH und FRA

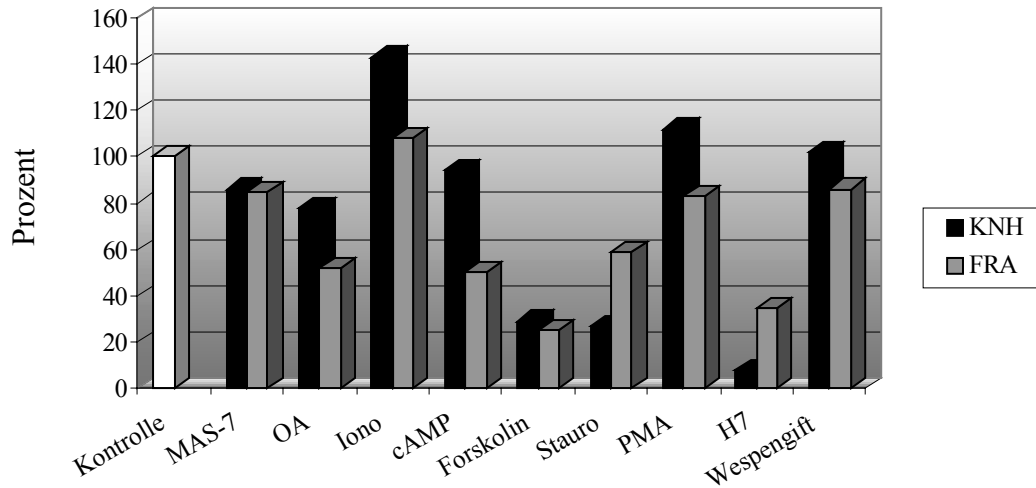


Abb. 26: dargestellt ist die IL-18/GAPDH-Ratio umgerechnet in Prozent, bezogen auf die jeweilige unbehandelte Kontrolle

Tab. 16: Mittelwerte und Standardabweichungen (Stabwn) der „crossing points“ nach 24 h Inkubation mit diversen Chemikalien

KNH	Kontr.	MAS-7	OA	Iono	cAMP	Fors.	Stauro	PMA	H7	Wesp.
<u>GAPDH</u>										
Mittelw.:	13,498	13,478	13,480	13,813	13,410	13,778	13,355	13,648	13,508	13,703
Stabwn:	0,961	0,962	0,830	1,033	0,933	0,853	0,954	0,873	0,912	0,877
<u>IL-18</u>										
Mittelw.:	27,990	28,245	28,260	27,750	28,245	30,125	29,870	27,970	32,615	28,025
Stabwn:	0,060	0,065	0,170	0,030	0,145	0,235	0,370	0,080	0,295	0,045
FRA	Kontr.	MAS-7	OA	Iono	cAMP	Fors.	Stauro	PMA	H7	Wesp.
<u>GAPDH</u>										
Mittelw.:	13,330	13,155	13,470	13,510	13,230	13,185	13,180	13,295	13,175	13,595
Stabwn:	0,330	0,295	0,350	0,320	0,340	0,155	0,270	0,265	0,255	0,265
<u>IL-18</u>	es wurde nur ein IL-18-Lauf durchgeführt									

Darstellung der IL-18- und der GAPDH-Signale im 1,5%igen Agarosegel:

24 h Inkubation mit diversen Chemikalien

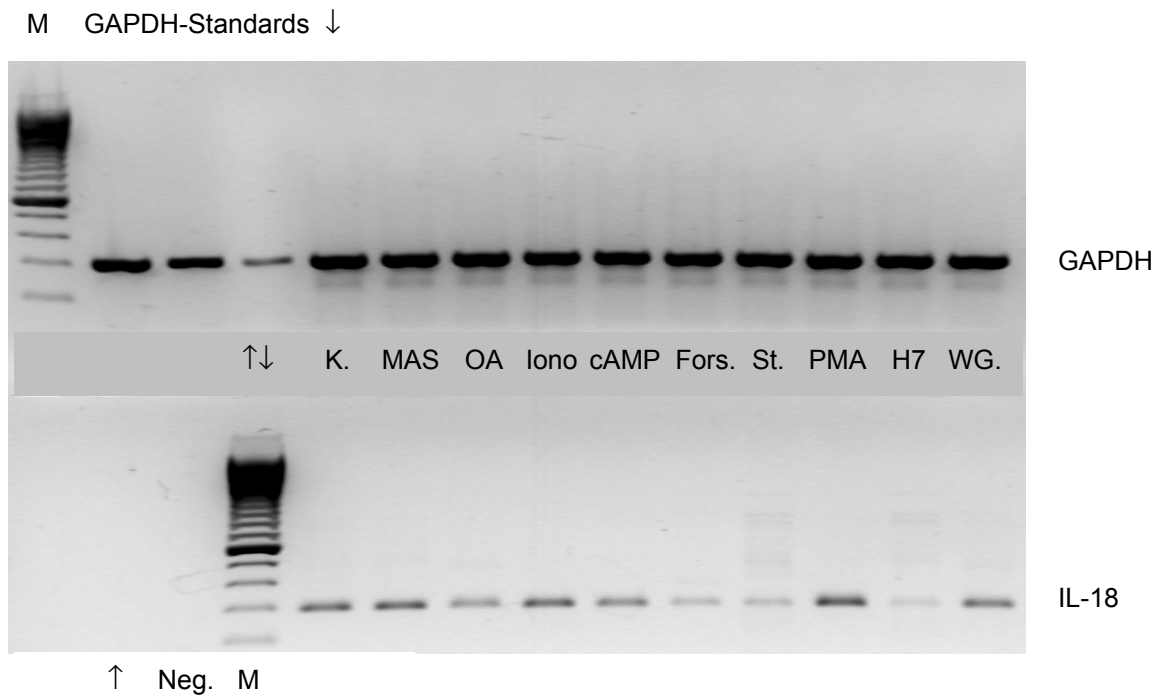


Abb. 27: gleichmäßige GAPDH-Banden sprechen für eine gleichmäßige cDNA-Menge, es zeigt sich eine recht deutliche, aber nicht signifikante Reduktion des IL-18-Signals durch Inkubation mit Forskolin bzw. Staurosporin sowie durch H7 und OA

M = Marker, Neg. = Negativkontrolle, d.h. Wasser

K. = unbehandelte Kontrolle, MAS = MAS-7, OA = Ocadaic Acid,

Iono = Ionomycin, Fors. = Forskolin, St. = Staurosporin,

WG. = Wespengift

3.6.2 Untersuchung einer neonatalen Hautfibroblasten-Zelllinie

Für den Versuch wurden die Zellen aus der Zelllinie NHDF 6499 bis zur 3. Passage subkultiviert und dann eingesetzt.

Nach 24 h zeigte sich eine enorme Steigerung der IL-18-Transkriptmenge auf das Doppelte durch PMA. Auch die Inkubation mit Wespengift bewirkte eine deutliche Zunahme um 70 Prozent. Durch Ionomycin und cAMP konnte eine Steigerung um rund 15 Prozent erzielt werden.

Die 24 stündige Inkubation mit MAS-7 und OA brachte keine Änderung mit sich. Reduziert wurde das IL-18-Signal durch Staurosporin (80 %) und noch deutlicher durch Forskolin (45 %).

Nach Inkubation mit H7 war keine mRNA mehr detektierbar, da die Zellen stark geschädigt waren.

LightCycler RT-PCR:

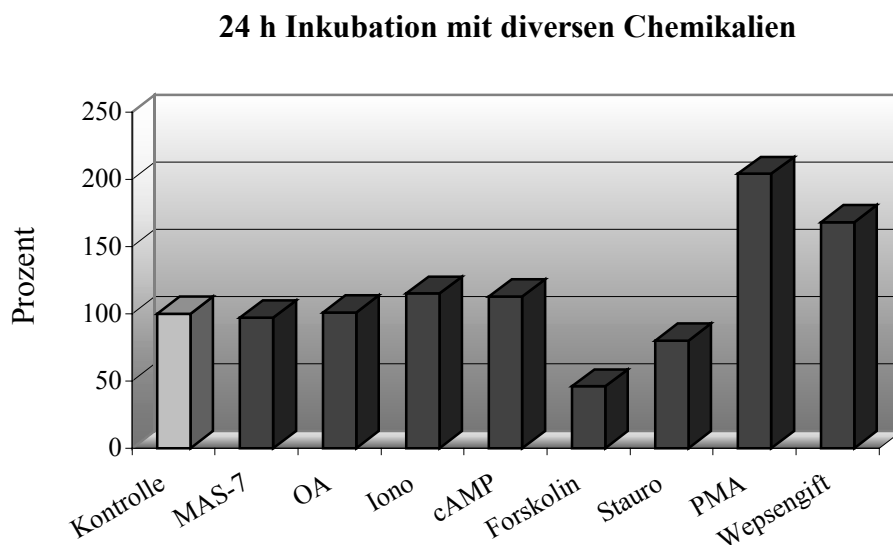


Abb. 28: dargestellt ist die IL-18/GAPDH-Ratio umgerechnet in Prozent, bezogen auf die jeweilige unbehandelte Kontrolle

3.6.3 Untersuchung synovialer Fibroblasten von Patienten

3.6.3.1 Unbehandelte Zellen

Bei allen untersuchten Kulturen (2 Patienten, s. unten) zeigte sich in der RT-PCR (LightCycler) ein spontanes IL-18-mRNA-Signal.

In der Auswertung wurde dieses IL-18-Signal im Verhältnis zum GAPDH-Signal jeweils als 100 Prozent gewertet. Die Veränderungen des IL-18-Transkriptes durch die Inkubation mit den einzelnen Pharmaka wurden in Relation zu diesem Wert gesetzt.

3.6.3.2 Pharmakoninduktion synovialer Fibroblasten von Patienten

Die synovialen Fibroblasten des Patienten SRF wurden in der 3. Subkultur für den Versuch eingesetzt, diejenigen des Patienten SLF in der 4. Subkultur.

Bei beiden Patienten ließ sich nach 24 h die IL-18-mRNA-Menge lediglich durch Ionomycin steigern, im Falle des Patienten SLF sogar um annähernd 60 %.

Desweiteren war bei beiden Patienten nach Zugabe von Staurosporin und Forskolin eine deutliche Reduktion auf rund 40 bzw. 30 Prozent nachzuweisen. Durch die Behandlung mit H7 konnte das IL-18-Signal fast vollständig unterdrückt werden.

Eine mäßige Reduktion beim Patienten SRF (um ca. 20 %) bzw. keine Veränderung der IL-18-Transkription bei SLF trat durch MAS-7 und cAMP auf. PMA bewirkte in beiden Fällen eine stärkere Reduktion auf 74% (SRF) bzw. auf 53 % (SLF).

Die 24 stündige Inkubation mit Wespengift führte bei SRF zu einer geringen Reduktion, wohingegen sie bei SLF zu einer deutlichen Steigerung (150 %) des IL-18-Signals führte.

Die Inkubation mit OA bewirkte bei SRF keine Veränderung.

Bei SLF ließ sich aufgrund der doch erheblichen Beeinflussung der Zellvitalität durch diese Substanz keine mRNA mehr gewinnen.

Die Auswirkung auf das IL-18-Signal war jeweils nicht signifikant.

LightCycler RT-PCR:

Synoviale Fibroblasten der Patienten SRF und SLF

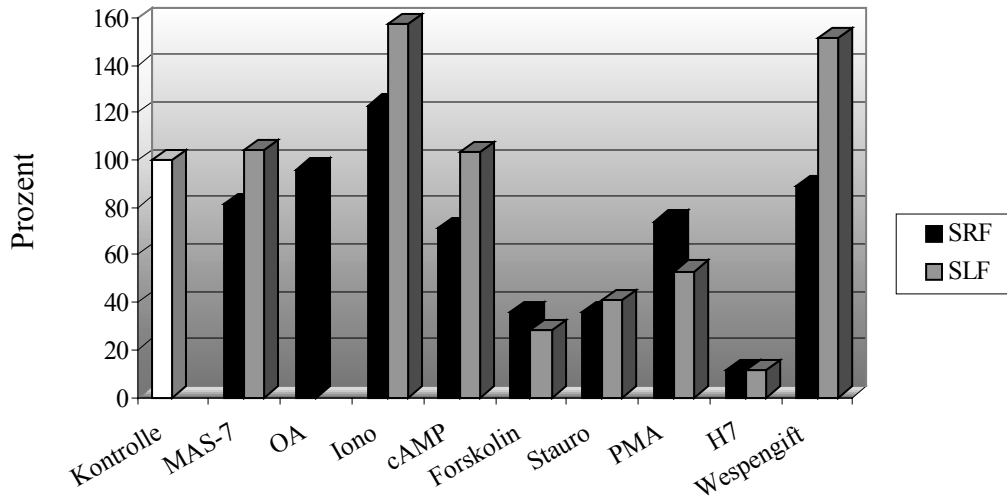


Abb. 29: dargestellt ist die IL-18/GAPDH-Ratio umgerechnet in Prozent, bezogen auf die jeweilige unbehandelte Kontrolle

Tab. 17: Mittelwerte und Standardabweichungen (Stabwn) der „crossing points“ nach 24 h Inkubation mit diversen Chemikalien

SRF syn	Kontr.	MAS-7	OA	Iono	cAMP	Fors.	Stauro	PMA	H7	Wesp.
GAPDH	siehe IL-16-Darstellung									
<u>IL-18</u>										
Mittelw.:	24,975	25,085	25,020	24,580	25,455	26,640	26,525	25,290	29,010	25,420
Stabwn:	0,105	0,085	0,080	0,100	0,015	0,160	0,085	0,190	0,050	0,180
SLF syn	Kontr.	MAS-7	OA	Iono	cAMP	Fors.	Stauro	PMA	H7	Wesp.
GAPDH	siehe IL-16-Darstellung									
IL-18	es wurde nur ein IL-18-Lauf durchgeführt									

3.6.4 Behandlung mit Staurosporin über 48 Stunden

In diesem Versuch wurden die Zellen über maximal 48 h mit Staurosporin inkubiert. Jeweils nach 6, 12, 24 und 48 Stunden wurde RNA isoliert.

Zum einen wurden Zellen vom o.a. Patienten KNH in der 3. Subkultur eingesetzt. Zum anderen wurden zwei verschiedene neonatale Hautfibroblasten-Zelllinien verwendet. Die Zellen der Linie NHDF 6381 wurden in der 4. Subkultur und diejenigen der Linie NHDF 6455 in der 5. Subkultur eingesetzt.

Es ließ sich in allen drei Fällen zu jedem Zeitpunkt eine deutliche Reduktion der IL-18-Expression durch Inkubation mit Staurosporin beobachten.

Bei allen drei untersuchten Kulturen blieb die Menge an IL-18-Transkript bei den mit Staurosporin behandelten Zellen über 48 h bis auf kleinere Schwankungen konstant. Bei den neonatalen Hautfibroblasten der 5. Subkultur sowie bei den Patientenzellen KNH nahm jedoch über die Zeit die spontane IL-18-Expression stetig zu. Nach 48 h betrug diese ca. das 2,5-fache des Ausgangswertes. Bei diesen beiden Kulturen hat daher das IL-18-Signal der inkubierten Zellen in Relation zu dem Signal der unbehandelten Zellen mit zunehmender Inkubationsdauer abgenommen. Nach 6 h hat Staurosporin zu einer Reduzierung der IL-18-Transkription auf 50 Prozent derjenigen der unbehandelten Zellen geführt, weitere 6 h später auf ein Drittel, nach 24 h auf 20 bzw. 25 Prozent (KNH). Nach 48 h schließlich betrug das IL-18-Signal der behandelten Zellen rund 16 % (NHDF 6455) bzw. 10 % (KNH) des spontanen IL-18-Signals.

Bei den neonatalen Hautfibroblasten der 4. Subkultur blieb sowohl das IL-18-Signal der behandelten als auch das spontane IL-18-Signal weitgehend konstant, so daß hier das Staurosporin-induzierte Signal verglichen mit dem spontanen Signal zu allen vier Zeitpunkten stets rund ein Drittel betrug.

Exakte Aussagen über die Signifikanz sind hier aufgrund zu weniger Meßwerte nicht verlässlich zu machen.

Beispielhaft ist im folgenden das Diagramm für die neonatalen Hautfibroblasten in der 5. Subkultur (NHDF 6455) dargestellt.

LightCycler RT-PCR:

Inkubation mit Staurosporin über maximal 48 h

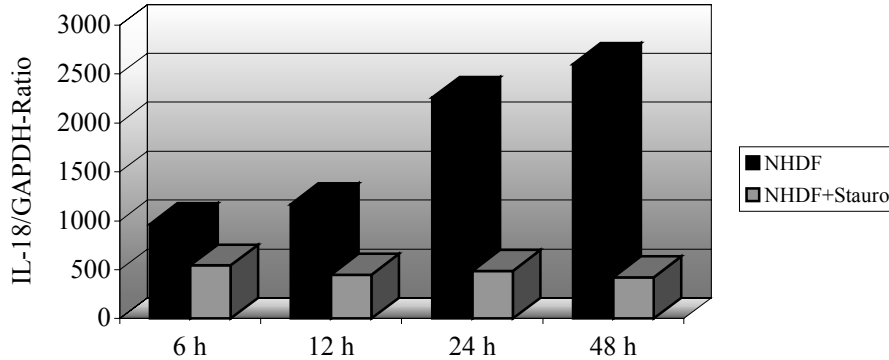


Abb. 30: dargestellt ist die IL-18/GAPDH-Ratio

Tab. 18: Mittelwerte und Standardabweichungen (Stabwn) der „crossing points“ nach Inkubation mit Stauro über maximal 48 h (neonatale Hautfibroblasten)

NHDF, 5.SK	6 h		12 h		24 h		48 h	
	Kontr.	Stauro	Kontr.	Stauro	Kontr.	Stauro	Kontr.	Stauro
<u>GAPDH</u>								
Mittelwerte:	14,120	13,980	14,207	14,243	14,593	14,420	15,320	14,633
Stabwn:	0,527	0,545	0,522	0,622	0,660	0,507	0,602	0,669
<u>IL-18</u>	es wurde nur ein IL-18-Lauf durchgeführt							

Darstellung im 1,5 %igen Agarosegel:

Inkubation mit Staurosporin über maximal 48 h

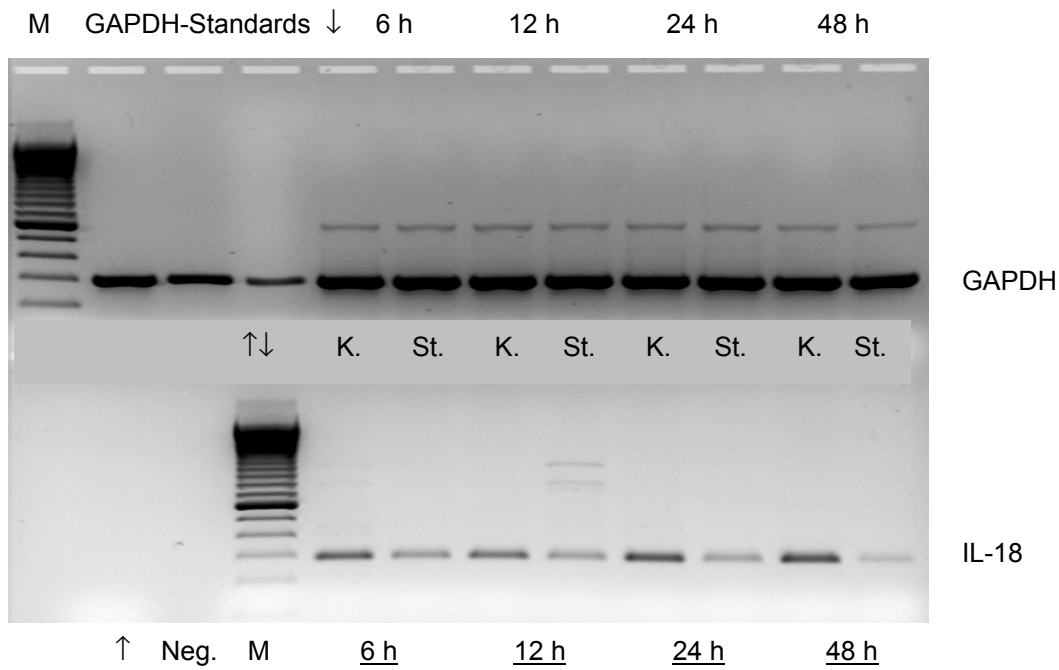


Abb. 31: gleichmäßige GAPDH-Banden sprechen für eine gleichmäßige cDNA-Menge, es zeigt sich eine zeitunabhängige deutliche Reduzierung des IL-18-Signals durch die Behandlung mit Staurosporin, das Signal der unbehandelten Kontrolle dagegen wird mit zunehmender Inkubationsdauer intensiver

M = Marker, Neg. = Negativkontrolle, d.h. Wasser
K. = unbehandelte Kontrolle, St. = Staurosporin,

3.6.5 Behandlung mit MAS-7 über 48 Stunden

In diesem Versuch wurden die Zellen über maximal 48 h mit MAS-7 inkubiert. Jeweils nach 6, 12, 24 und 48 Stunden wurde RNA isoliert.

Einerseits wurden Hautfibroblasten der Patienten HTF (4.Subkultur), KNH und OTA (jeweils in der 3. Subkultur) für das Experiment verwendet. Andererseits kamen adulte und neonatale Hautfibroblasten-Zelllinien jeweils in der 4. Passage zum Einsatz.

Bei den Patientenzellen zeigten sich zu den ersten drei Zeitpunkten jeweils nur minimale Unterschiede zwischen spontaner IL-18-Expression und derjenigen MAS-7- behandelter Zellen. Nach 48 h war in allen drei Fällen eine Reduktion des IL-18-Signals bei den behandelten Zellen nachweisbar. Die IL-18-Transkriptmenge betrug noch zwischen 85 % und 60 % der spontanen Transkriptmenge.

Es ließ sich demnach in keinem der drei Fälle eine nennenswerte Auswirkung von MAS-7 auf die IL-18-Transkription nachweisen.

Bei den neonatalen sowie den adulten Hautfibroblasten zeigte sich folgendes: Bei beiden Kulturen trat zu jedem Zeitpunkt (Ausnahme adulte Zellen nach 6 h: hier leichte Steigerung) eine geringe Reduktion des modifizierten IL-18-Signals verglichen mit dem spontanen Signal auf. Die Reduktion betrug zwischen 20 und maximal 40 Prozent.

In Abbildung 32 ist der MAS-7-Zeitverlauf über 48 h der Hautfibroblasten-Kultur OTA beispielhaft dargestellt.

LightCycler RT-PCR:

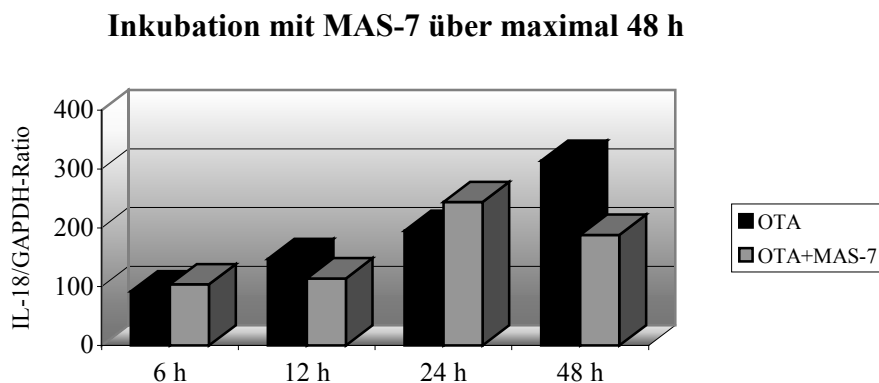


Abb. 32: dargestellt ist die IL-18/GAPDH-Ratio

3.7 Cell Death Detection ELISA

Für dieses Experiment wurden native Hautfibroblasten des Patienten KNH in der fünften Subkultur sowie neonatale Hautfibroblasten der Zelllinie NHDF 6499 in der vierten Subkultur verwendet.

Die Zellkulturen wurden jeweils über 24 h mit Staurosporin inkubiert. Im Anschluß wurde, wie in Kapitel 2.2.8 beschrieben verfahren. Entweder wurde der Überstand sofort abgenommen für die Untersuchung auf Nekrose oder aber die Zellen wurden vorher lysiert und der Überstand wurde erst anschließend abpipettiert (Apoptose-Test).

Apoptose-Test:

In einem ersten Versuch mit den Zellen des Patienten KNH wurden die gleichen Staurosporin-Konzentrationen eingesetzt wie bei der Titration, d.h. also maximal 100 nM. Es sollte untersucht werden, ob in diesem Bereich, in dem ja noch eine deutliche Zunahme der IL-16-Transkription mit steigender Konzentration im LightCycler nachgewiesen werden konnte, bereits Apoptose in nennenswertem Umfang auftritt.

Bis zu einer Staurosporin-Konzentration von 50 nM waren die gemessenen Extinktionen nicht höher als diejenige der Negativkontrolle (zwischen

$E_{405} = 0,033$ und $E_{405} = 0,037$), d.h. also der unbehandelten Zellen. Bei 100 nM Staurosporin konnte bereits eine höhere Extinktion von $E_{405} = 0,056$ gemessen werden. Diese Steigerung um gut 60 Prozent deutet auf eine leichte Zunahme der Apoptosevorgänge in der Kultur hin. Die Extinktionen waren jedoch alle sehr niedrig im Vergleich zur mitgeführten Positivkontrolle. Die im Kit mitgelieferte Positivkontrolle bestand aus DNA-Histon-Komplexen und zeigte mit einer gemessenen Extinktion von 0,594 eine deutliche Apoptose.

Man kann also festhalten, daß in dem eingesetzten Konzentrationsbereich nur sehr wenige Zellen apoptotisch werden. Die geringe Zunahme bei 100 nmolarem Staurosporin deutet aber darauf hin, daß diese Substanz in höheren Konzentrationen durchaus in der Lage sein könnte, Apoptose zu induzieren.

Deshalb sollte in einem erneuten Ansatz mit den neonatalen Hautfibroblasten die Auswirkung einer sehr viel höheren Staurosporin-Konzentration getestet werden. Der Versuch wurde daher mit den obigen Konzentration plus einer Kultur mit 1000 nM Staurosporin durchgeführt.

Hier fand sich bei 10 nM eine ähnliche Extinktion wie bei der Negativkontrolle ($E_{405} = 0,025$ bzw. $0,032$). Bereits die 50 nM-Kultur zeigte eine mäßige Erhöhung und bei 100 nM war die gemessene Extinktion doppelt so hoch wie diejenige der Negativkontrolle ($E_{405} = 0,069$). Bei der mit 1000 nmolarem Staurosporin behandelten Kultur waren die Zellen jetzt deutlich apoptotisch, dies zeigte die gemessene Extinktion von 1,098. Dieses Ergebnis lag im Bereich der Positivkontrolle.

Es konnte also nachgewiesen werden, daß Staurosporin in hohen Konzentrationen Apoptose induziert.

Dies konnte durch die Ergebnisse aus dem ApopDetect Plus Peroxidase Assay (siehe unten) bestätigt werden.

APOPTOSE, Staurosporin - induziert

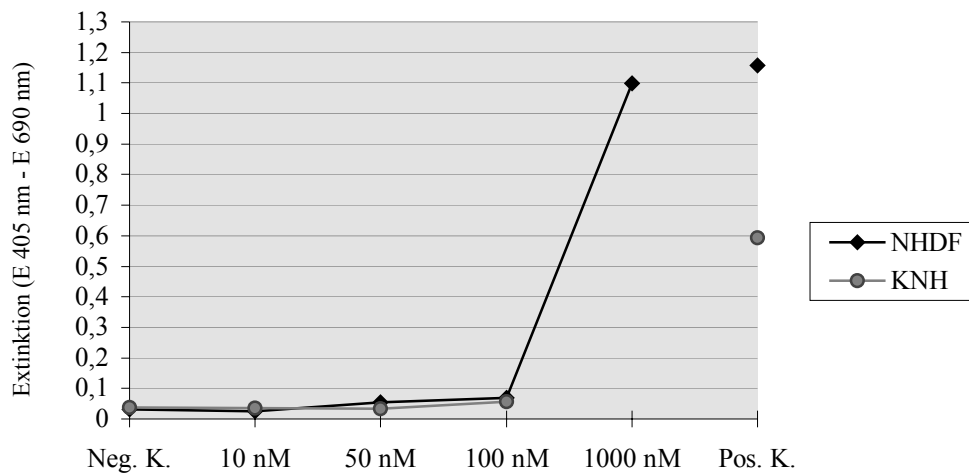


Abb. 33a: gezeigt sind die gemessenen Extinktionen bei 405 nm;

Neg. K.= Negativkontrolle, d.h. unbehandelte Zellen

Pos. K.= Positivkontrolle aus DNA-Histon-Komplexen

Untersuchung auf Nekrose

Dieser Versuch wurde mit den o.a. neonatalen Hautfibroblasten in der 4. Subkultur parallel zum Apoptose-Test durchgeführt. D.h. die Zellen wurden mit den gleichen Staurosporin-Konzentrationen ebenfalls über 24 h inkubiert.

Wie in Schaubild 33b unten dargestellt, zeigte sich folgendes:

Die Negativkontrolle, d.h. die unbehandelten Zellen sowie die mit 10 nM, 50 nM und 100 nM Staurosporin inkubierten Zellen zeigten ähnlich niedrige Extinktionswerte um $E_{405} = 0,12$ bis $E_{405} = 0,15$.

Bei der hohen Staurosporin-Konzentration (1000 nM) konnte dann eine deutliche Nekrose beobachtet werden. Diese war in ihrem Ausmaß ähnlich stark ausgeprägt wie diejenige der mitgeführten Positivkontrolle.

Es hat sich also gezeigt, daß die Differenzierung zwischen Apoptose und Nekrose bei hohen Staurosporin-Konzentrationen nicht möglich ist. Ließ sich bei der Untersuchung auf Apoptose noch eine geringe Steigerung der apoptotischen Zellvorgänge mit steigender Konzentration beobachten, so

scheint die Nekrose in diesen Bereichen von der Staurosporin-Konzentration unabhängig zu sein.

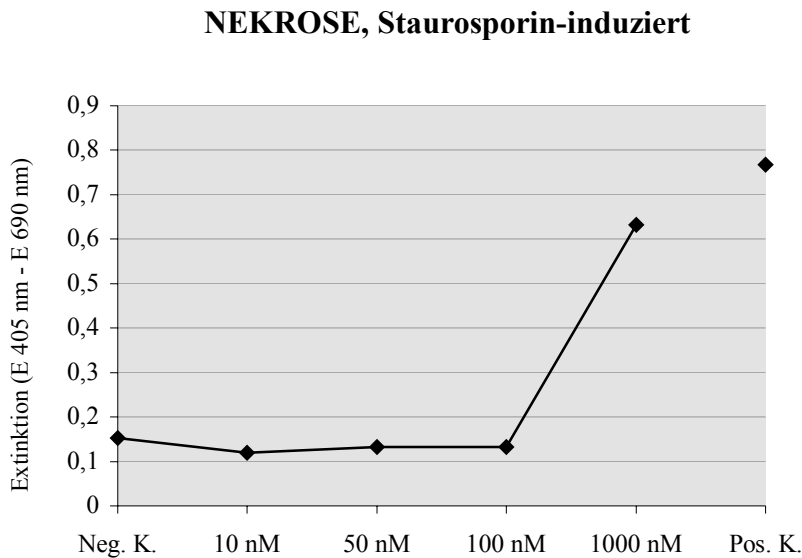


Abb. 33b: gezeigt sind die gemessenen Extinktionen bei 405 nm

3.8 ApopDetect Plus Peroxidase Assay

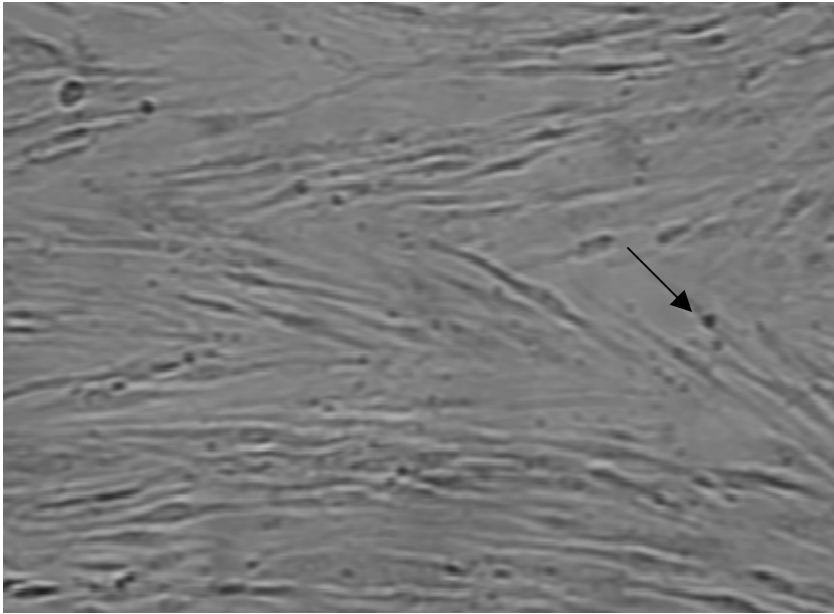
Bei diesem Test werden wie in Kapitel 2.2.9 ausführlich erklärt Apoptosekörperchen (Oligonukleosomen) durch das DAB-Substrat rostbraun angefärbt. Da es nicht möglich war Farbfotos zu machen, stellen sich die Oligonukleosomen hier jedoch schwarz dar.

Es wurden neonatale Hautfibroblasten (NHDF 6499) in der 6. Subkultur über 24 h mit Staurosporin in drei verschiedenen Konzentrationen inkubiert. Die beiden hohen Konzentrationen von 500 nM und 1000 nM sollten nach den Ergebnissen aus dem Cell Death Detection ELISA eigentlich eine deutliche Apoptose verursachen, wohingegen 100 nmolares Staurosporin diese nur in geringem Ausmaß induzieren sollte. Zusätzlich wurde eine Negativkontrolle, also unbehandelte Zellen mitgeführt.

Nach 24 stündiger Inkubation war die mit 1000 nmolarem Staurosporin behandelte Kultur bereits unter dem Mikroskop sichtbar so geschädigt, daß sich die Mehrzahl der Zellen vom Boden gelöst hatten. Deshalb gingen bei den

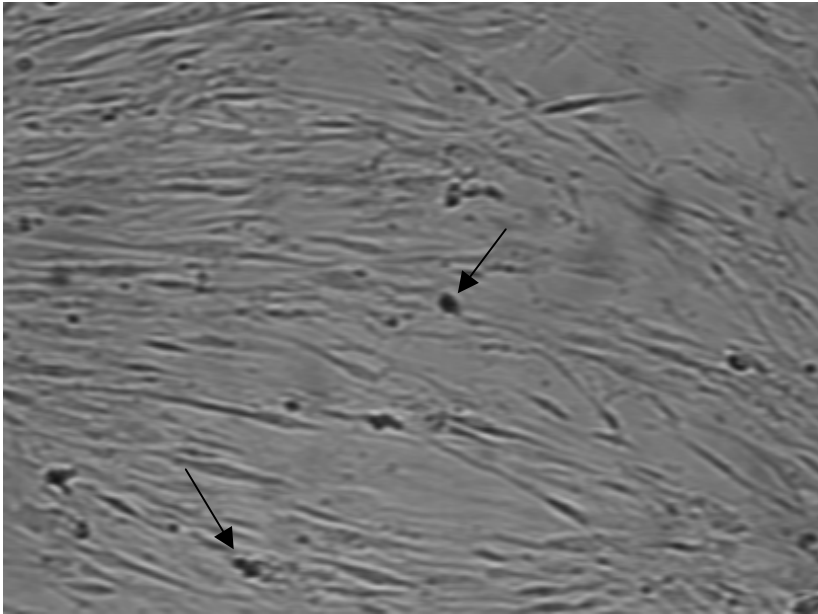
folgenden Waschsritten viele Zellen verloren, so daß nach der Fixierung kein zusammenhängender Zellrasen mehr vorhanden war und eine aussagekräftige Färbung daher nicht mehr möglich war.

Es wurden also nur die drei anderen Kulturen angefärbt.



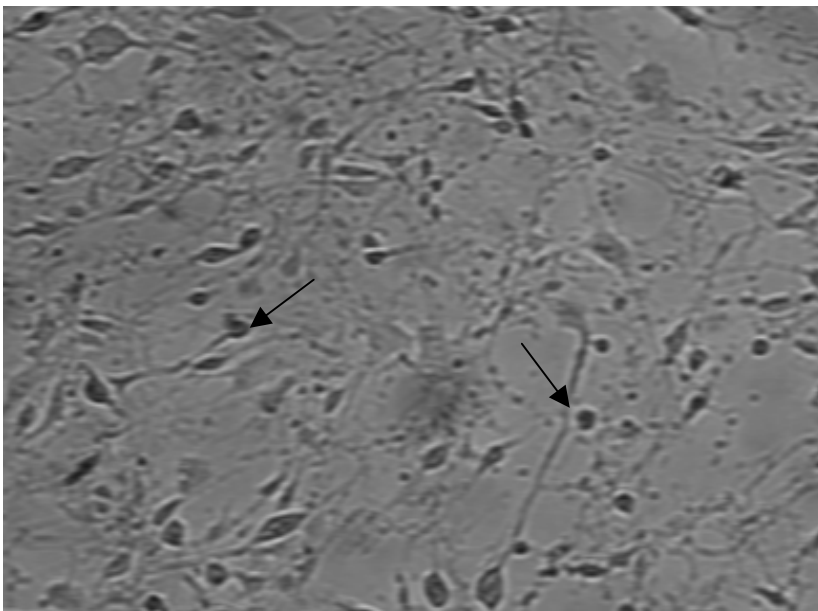
Negativkontrolle

Abb. 34a zeigt, daß sich bei der Negativkontrolle nur vereinzelt Apoptosekörperchen (Pfeil) angefärbt haben.



Staurosporin 100 nM

Abb. 34b zeigt, daß sich nach Inkubation mit Staurosporin in einer Konzentration von 100 nM bereits mehr Apoptosekörperchen (Pfeile) anfärben ließen.



Staurosporin 500 nM

Abb. 34c zeigt, daß 500 nmolares Staurosporin eine sehr deutliche Apoptose induziert. Die Anzahl der gefärbten Oligonukleosomen (Pfeile) hat im Vergleich

zu der niedrigeren Konzentration und v.a. zur Negativkontrolle stark zugenommen.

Dieses Ergebnis unterstreicht die im Cell Death Detection ELISA gewonnene Erkenntnis, daß Staurosporin in hohen Konzentrationen Apoptose induziert. Auch die Tatsache, daß bei der Behandlung mit 100 nmolarem Staurosporin in geringem Ausmaß Apoptosekörperchen vorzufinden waren paßt zu den Ergebnissen aus dem ELISA.

3.9 Human-Interleukin-16 ELISA

Wie in Kapitel 2.2.10 bereits erwähnt, kann mit diesem ELISA humanes IL-16-Protein in Zellkulturüberständen nachgewiesen und quantifiziert werden.

Zum einen wurde der ELISA mit den Überständen durchgeführt, die bei der in den vorigen Kapiteln erwähnten Pharmakoninduktion der Fibroblasten gewonnen wurden, d.h. Überstände nativer dermaler Fibroblasten sowie neonataler Hautfibroblasten aus Zelllinien (1. Versuchsansatz).

Bei einem zweiten Versuchsansatz wurden die Zellen über 24 Stunden mit verschiedenen Staurosporin-Konzentrationen (max. 100 nM) und mit Forskolin inkubiert, wobei das Nährmedium nur einen FCS-Anteil von 0,5 % enthielt (sonst 10 %) und anschließend über weitere 24 h mit Interleukin 1 β (ebenfalls nur 0,5 % FCS) behandelt. Sowohl nach 24 als auch nach 48 Stunden wurden die Überstände abgenommen. Durch die Behandlung mit Interleukin 1 β wurde eine Erhöhung der Menge an IL-16 im Überstand erhofft.

1. Versuchsansatz:

Eingesetzt wurden Überstände aus der 3. Subkultur von Hautfibroblasten des Patienten KNH. Einerseits waren die Zellen zuvor über 24 h mit den diversen Substanzen inkubiert worden, andererseits wurden die Überstände bei den MAS-7- und Staurosporin-Zeitverläufen über 48 h jeweils zu den vier Zeitpunkten gewonnen.

Außerdem sollte bei neonatalen Hautfibroblasten (Charge NHDF 6499) der dritten Subkultur, die ebenfalls über 24 h behandelt waren, IL-16 nachgewiesen werden.

Zusätzlich wurden die Überstände aus der Titration mit Staurosporin sowie vom ApopDetect Plus Peroxidase Assay (maximale Stauro-Konzentration 1000 nM) verwendet.

Desweiteren wurde jeweils das zugehörige Inkubationsmedium untersucht.

Bedauerlicherweise konnte in keinem einzigen Überstand humanes Interleukin 16 nachgewiesen werden.

Bei den parallel dazu untersuchten Standards aus rekombinantem humanem IL-16 war mit Ausnahme des ersten Standards jeweils eine deutlich positive Extinktion meßbar (ODs von 0,040 bis max. 1,854), so daß sich eine klassische Eichkurve mit zunehmenden IL-16-Mengen von 0 bis 800 pg/ml erstellen ließ. Die mitgeführte Positivkontrolle lag im Test bei ca. 300 pg/ml Interleukin 16. Daher läßt sich ein Versagen des Testes relativ sicher ausschließen.

Die bei den untersuchten Überständen gemessenen IL-16-Mengen lagen allesamt außerhalb des Steigungsbereiches dieser Eichkurve (nur minimal positive Extinktionen), so daß sie nicht ausgewertet werden konnten.

Lediglich bei einer Staurosporin-Konzentration von 1000 nM zeigte sich eine etwas höhere Extinktion als bei den anderen Überständen, jedoch lag auch diese noch nicht im verlässlich quantifizierbaren Bereich.

2. Versuchsansatz:

Für diesen Versuch wurden neonatale Hautfibroblasten in der sechsten Subkultur (NHDF 6499) herangezogen. Diese wurden wie oben beschrieben behandelt.

Leider ließ sich auch nach Zugabe von Interleukin 1 β zu den Zellen kein stimulierender Einfluß auf die Menge an IL-16 in den Überständen beobachten. Sowohl bei den Staurosporin-behandelten Kulturen als auch durch Forskolin konnte in keinem Fall humanes IL-16 im Überstand detektiert werden.

Die mitgeführten Standards ergaben eine ganz ähnliche Eichkurve wie beim 1. Ansatz, und auch die Positivkontrolle lag im gleichen Bereich. Die Extinktionen

der untersuchten Überstände waren jedoch auch hier so niedrig, daß sie nicht mehr im Steigungsbereich der Eichkurve lagen.

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß trotz im LightCycler meßbarer IL-16-Transkription bei allen eingesetzten Substanzen und Konzentrationen in den Überständen kein IL-16-Protein nachweisbar war.

Möglicherweise ist die geringe Anzahl an Kopien des IL-16-Gens, die im LightCycler noch quantifizierbar war doch zu niedrig, um in den Kulturüberständen für eine deutlich meßbare Menge an Protein zu sorgen.

4 Diskussion

4.1 Beurteilung der Methoden

4.1.1 Übertragbarkeit des in vitro Modells auf in vivo Vorgänge

Es hat sich bisher in mehreren Studien gezeigt, daß die Aussagekraft von in vitro-Ergebnissen sehr hoch ist und eine Übertragung auf die in vivo Situation generell zulässig ist, jedoch kritisch bewertet werden sollte [1].

Grundsätzliche Unterschiede bestehen u.a. darin, daß in vitro immunologische Vorgänge sowie die Vaskularisation fehlen. Desweiteren fehlt das Zusammenspiel mit dem Gesamtorganismus, so werden zum Beispiel hormonelle Einflüsse oder der Umgang mit anfallenden Abbauprodukten, z.B. bei der Verstoffwechslung von Medikamenten nicht berücksichtigt. Die Primärkulturen wiederum sind einem enormen mechanischen Streß bei der Aufarbeitung des Gewebes ausgesetzt und sie sind Temperaturschwankungen und unterschiedlicher Zelldichte in einem höheren Maße als in vivo ausgeliefert, da sie wenig Möglichkeiten zur Gegenregulation haben.

Man hat jedoch über die Jahre für viele Zellarten optimale Kulturbedingungen herausgefunden, unter denen es möglich ist, die Zellen über längere Zeit zu kultivieren und dabei den in vivo-Phänotyp weitgehend zu erhalten. Mit dem Nährmedium erhalten die Zellen die Nährstoffe, die für das natürliche Wachstum erforderlich sind und die in vivo aus dem Blut bezogen werden. Je länger die Kultivierungsdauer und je häufiger die Zellen passagiert werden, desto unsicherer ist allerdings die Übertragung der Ergebnisse auf in vivo Vorgänge. Es lassen sich dann gelegentlich deutliche Unterschiede bezüglich des Phänotyps feststellen. Dies kann auch zu Problemen führen, wenn Ergebnisse zu unterschiedlichen Zeiten bzw. zwischen verschiedenen Labors interpretiert bzw. verglichen werden sollen. Am idealsten ist daher immer der Einsatz von Primärkulturen.

Da sich in der Zellkultur gezielt einzelne Parameter verändern und deren Auswirkungen untersuchen lassen und die ethischen Bedenken bei klinischen

Studien und Tierversuchen stets vorhanden sind, ist diese Methode heutzutage von großer Bedeutung. Dies erfordert jedoch im Anschluß an die experimentelle Untersuchung trotz allem eine randomisierte klinische Studie.

4.1.2 Zellkultur

Im Rahmen dieser Experimente wurden die Zellen in einem zweidimensionalen System (Plastikflaschen) kultiviert. Die primären Fibroblastenkulturen (sowohl dermale als auch synoviale) zeigten ein inselartiges Wachstum um die Gewebestückchen herum, bevor sie am Boden der Flasche entlang wuchsen. Möglicherweise befinden sich im Gewebe Wachstumsfaktoren, die im Nährmedium nicht enthalten sind und so die Zellen quasi anlocken. Sobald nach der ersten Subkultivierung keine Gewebepartikel mehr in Kultur waren, wuchsen die Zellen einlagig am Boden der Flasche entlang und erst nach Erreichen der Konfluenz konnte ein mehrlagiges Wachsen beobachtet werden. Um möglichst reine Kulturen zu erhalten und ein Überwuchern durch schneller wachsende Zellen zu verhindern, wurden die Zellen bereits bei der Aufarbeitung häufig gereinigt und bei den folgenden Mediumwechseln sind überdies nicht adhärent gewordene Zellen ausgespült worden. Bei der Kultur von Fibroblasten ist hauptsächlich die Verunreinigung mit Makrophagen und Monozyten zu befürchten. Mit der Dauer der Kultivierung werden diese jedoch weitgehend eliminiert, da sie verglichen mit den Fibroblasten eine recht kurze Lebensdauer von 5 – 7 Tagen haben. Vor dem Einsatz der Kulturen im Experiment wurde stets eine immunhistochemische Zelltypcharakterisierung vorgenommen, um eine Verunreinigung mit den o.a. Zellen auszuschließen. Hämatopoetische Zellen, die aus dem Gewebe auswachsen, werden mit dem ersten Mediumwechsel ausgewaschen, da sie nicht adhärent wachsen. Eine potentielle Gefahr für jede Kultur stellt die Kontamination durch Pilze und Bakterien, v.a. in der warmen Jahreszeit dar. Deshalb wurde den Kulturen prophylaktisch ein Antimykotikum sowie zwei Antibiotika (Penicillin und Streptomycin) ins Nährmedium zugegeben.

Um möglichst einheitliche Bedingungen ohne Nährstoffschwankungen für die verschiedenen Kulturen zu gewährleisten, wurde immer das gleiche Grundmedium (DMEM) mit jeweils identischen Zusätzen verwendet. Es wurde darauf geachtet, daß die Produkte, v.a. das FCS (fetales Kälberserum) aus einer einzigen Charge bezogen wurden. Fetales Kälberserum wurde eingesetzt, da humanes Serum aus ethischen Gründen und wegen der höheren Infektionsgefahr nicht für die Zellkultur verwendet werden darf.

4.1.3 Immunhistochemische Zelltypcharakterisierung

Es kam zum einen der fibroblastenspezifische Antikörper AS02 zum Einsatz, zum anderen ein gegen das CD68-Molekül gerichteter Antikörper (Ki-M6). Mit diesen beiden Antikörpern sollte die Identifikation der Zellpopulation als Fibroblasten bestätigt werden und gleichzeitig eine Verunreinigung durch Makrophagen oder Monozyten (CD68⁺) ausgeschlossen werden.

Der monoklonale Antikörper AS02 der Immunglobulinklasse G (aus Mäusen) bindet an ein membranständiges Protein auf humanen Fibroblasten, unabhängig von deren Ursprung. D.h. es werden sowohl synoviale als auch dermale Fibroblasten erkannt. Laut Herstellerangaben (Fa. Dianova) handelt es sich um einen hochspezifischen Antikörper.

Ki-M6 ist ebenfalls ein monoklonaler Antikörper (Maus IgG1), der ein zytoplasmatisches lysosomales Epitop erkennt. Die humane Speziesreaktivität für Monozyten und Makrophagen ist hoch.

Bei der Durchführung der Färbung können einige Fehler auftreten, die ein zuverlässiges Ergebnis verhindern. Bei der Aussaat der Zellen muß darauf geachtet werden, daß die Zellen nicht zu dicht wachsen, da dies die Differenzierung zwischen Zellen und eventuell fälschlicherweise gefärbtem Background unmöglich macht. Andererseits müssen vor dem Fixieren ausreichend Zellen adhärent sein, da sonst bei den Spülvorgängen zu viele Zellen verloren gehen. Bei meinen Experimenten wurden die Zellen in 24-well-Schalen kultiviert und es war in allen Fällen eine ausreichende Zellzahl vorhanden, wobei die einzelnen Zellen noch optimal zu unterscheiden waren.

Desweiteren kann es zu einem falsch positiven Ergebnis kommen, wenn der zweite Antikörper unspezifisch bindet. Hier wurden biotinylierte Antikörper gegen Maus und Kaninchen eingesetzt (DAKO-Kit). Es kam in keinem Fall zu einer unspezifischen Bindung, auch nicht bei den Negativkontrollen (kein Erstantikörper). Außerdem wurden mit Phenylhydrazin endogene Peroxidasen gehemmt und die Inkubation mit BSA vor der Zugabe des spezifischen Antikörpers blockierte unspezifische Bindungsstellen.

Man kann also von einer hohen Spezifität und Sensitivität der Methode ausgehen.

Grundsätzlich gilt aber für die immunhistochemische Färbung, daß lediglich qualitative Aussagen getroffen werden können. Für eine quantitative Bewertung wäre z.B. eine FACS-Analyse heranzuziehen.

4.1.4 RNA-Extraktion und cDNA-Synthese

Der zur RNA-Extraktion verwendete RNeasy MiniKit arbeitet mit der GITC-Methode. Durch Zugabe eines Puffers, der sowohl GITC als auch Mercaptoethanol enthält, werden die Zellen lysiert und gleichzeitig RNasen inaktiviert, so daß von der Isolierung überwiegend intakter RNA ausgegangen werden kann. Der Nachteil dieses Verfahrens liegt in der Toxizität dieser beiden Substanzen. Deshalb wurde die gesamte RNA-Isolierung mit Handschuhen unter dem Abzug durchgeführt.

Da es bei der Isolierung leicht zur Kontamination mit dem RNA-spaltenden Enzym RNase kommen kann, wurde für alle Arbeitsschritte ein eigener Satz RNA-Pipetten sowie RNase-freie, sterile Gefäße, Pipettenspitzen und Chemikalien verwendet. Steriles Arbeiten war nicht erforderlich.

Um eine Verunreinigung mit DNA zu vermeiden, wurden die Proben nach der RNA-Ausfällung 15 Minuten mit RNase-freier DNase inkubiert.

Bei den durchgeführten RNA-Extraktionen kam es in keinem Fall zu einer Kontamination der Proben mit fremder RNA oder DNA.

Durch die spektrophotometrische Bestimmung der eluierten RNA-Mengen konnten äquivalente Mengen (1 oder 2 µg) für den Umschrieb in cDNA

eingesetzt werden. Dies ermöglichte die Vergleichbarkeit der Ergebnisse auch dann, wenn durch zelltoxische Pharmaka die Zellzahl in den verschiedenen Ansätzen unterschiedlich groß war. Die Qualität der Aufarbeitung wurde anhand des Extinktionskoeffizienten 260/280 nm bestimmt. Dieser sollte um 1,8 betragen. Kleinere Werte weisen auf eine Verunreinigung mit Proteinen, größere auf Verunreinigungen mit Salzen hin. Der Koeffizient lag jeweils im Normbereich, so daß von der Extraktion reiner, intakter RNA ausgegangen werden konnte.

Der Umschrieb in cDNA wurde für alle Kulturen stets mit dem gleichen Reagenzienkit der Fa. Clontech gemacht. Für die einzelnen Proben eines Patienten wurde jeweils ein gemeinsamer Reagenzienmix verwendet, um konstante Bedingungen und damit eine optimale Vergleichbarkeit der Ergebnisse zu gewährleisten. Die Synthese erfolgte in einem PCR-Block mit automatischer Temperaturregulierung, so daß auch hier gleiche Verhältnisse für alle Proben angenommen werden konnten.

4.1.5 LightCycler RT-PCR

Der entscheidende Vorteil der LightCycler PCR gegenüber der herkömmlichen PCR ist, daß die Produkte quantifiziert werden (bisher nur semiquantitative Auswertung). Die LC-Software ermittelt die Anzahl Kopien des spezifischen Produktes (z.B. IL-16) und eines internen Standards (z.B. GAPDH). Der interne Standard dient wie bei der herkömmlichen PCR der Kontrolle, ob in den einzelnen Proben annähernd gleiche Mengen an cDNA enthalten sind. Dies läßt sich beim LightCycler sowohl durch den Vergleich der absoluten Kopienzahlen als auch durch den Vergleich der „Crossing Points“ (siehe Kapitel 2.2.11) beurteilen. Es hat sich im Rahmen der Versuche gezeigt, daß innerhalb eines Versuchsansatzes die Cr.Ps. für GAPDH sehr nahe beieinanderlagen. Um die Vergleichbarkeit der Proben noch zu verbessern, wurde das Kopien-Verhältnis aus spezifischem Produkt und internem Standard (z.B. IL-16/GAPDH-Ratio) gebildet. Dadurch wurden kleinere Unterschiede in der cDNA-Menge ausgeglichen.

Um sicher zu gehen, daß die Quantifizierung der Produkte optimal ist, wurde jeweils eine Standard-Verdünnungsreihe (3 Verdünnungen, GAPDH) mitgeführt. Der LC ermittelt aus den 3 dazugehörigen Cr.Ps. eine Regressionsgerade (Standardkurve, s. Kapitel 2.2.11). Wenn alle drei Cr.Ps. auf dieser Geraden liegen, kann von einer exakten Quantifizierung ausgegangen werden. Es hat sich jedoch herausgestellt, daß bei der Wiederholung einer PCR die berechneten Kopienzahlen für die gleichen Proben beträchtlich schwanken, obwohl die zugehörigen Cr.Ps. jeweils in ähnlichen Bereichen lagen. Das Verhältnis der einzelnen Induktionen zur Kontrolle blieb jedoch stets konstant. Für die statistische Auswertung wurden daher die Cr.Ps. herangezogen.

Ein weiterer Vorteil des LightCyclers ist die Schnelligkeit. Eine PCR (35 Zyklen) ist in ca. 50 Minuten abgeschlossen.

Wie bei der PCR im Thermocycler kann es bei der LC-PCR ebenfalls zu Verunreinigungen bzw. zur Amplifikation unspezifischer Produkte kommen. Um dies zu vermeiden bzw. es im Zweifelsfall erkennen zu können, wurden Positiv- und Negativkontrollen mitgeführt. Desweiteren wird im LC im Anschluß an die PCR eine Schmelzkurve erstellt, die die Unterscheidung von spezifischem und unspezifischem Produkt ermöglicht. Die Amplifikationsprodukte schmelzen vollständig bei einer produktspezifischen Temperatur und ergeben daher einen einzigen schmalen Peak (Schmelzpunkt) in der Kurve. Treten mehrere kleinere Peaks auf, so muß von einer unspezifischen Amplifikation ausgegangen werden. Dies sollte anhand der Geldarstellung überprüft werden. Zusätzlich ist die eingesetzte Taq Polymerase (Fa. Roche) chemisch modifiziert, so daß sie bei Raumtemperatur inaktiv ist und erst durch die Temperaturerhöhung im LC aktiviert wird. Dadurch werden unspezifische Primerbindungen während der Pipettiervorgänge minimiert.

Eine entscheidende Rolle spielt jedoch nach wie vor die Affinität der Primerpaare zur cDNA. Dies hängt sowohl von der Qualität der Primer als auch von der cDNA-Qualität ab. Die verwendeten Primer der Fa. Search LC waren als hochspezifisch ausgewiesen und speziell für den LC entwickelt.

Bei den durchgeführten PCRs im Rahmen dieser Doktorarbeit hat sich gezeigt, daß die Primer für IL-16 und GAPDH qualitativ sehr gut sind. Es konnten immer

saubere Produkte amplifiziert werden. Für IL-18 dagegen konnte bei einigen Proben, die mit den anderen Primern gut funktioniert hatten, nur eine unspezifische Amplifikation beobachtet werden. Dies zeigte sich an unsauberen Schmelzkurven sowie an mehreren Banden in der Gelelektrophorese. Erstaunlicherweise korrelierten diese beiden Ergebnisse jedoch kaum miteinander. Einige Zellpopulationen (siehe Kapitel 3) lieferten jedoch sowohl im LC als auch im Gel saubere Produkte. Da die anderen beiden Primer funktioniert haben und nur bei IL-18 Probleme auftraten, spricht dies eher für Mängel am IL-18-Primer und weniger für eine unzulängliche Qualität der cDNA.

Damit die Ansätze eines Patienten zuverlässig verglichen werden konnten, wurde jeweils ein gemeinsamer Reagenzienansatz verwendet. Winzige Unterschiede z.B. in der SYBR Green-Konzentration führen nämlich bei den minimalen Volumina bereits zu beträchtlichen Unterschieden. Deshalb stellt auch das Pipettieren bei der LC-PCR eine nicht unbedeutende Fehlerquelle dar. Das Pipettieren von solch kleinen Volumina erfordert sehr viel Erfahrung und Übung, da sich geringste Ungenauigkeiten hier gleich deutlich bemerkbar machen.

4.1.6 Gel-Elektrophorese

Die Gelelektrophorese mit Ethidiumbromid-Fluoreszenz ermöglicht eine einfache rasche Visualisierbarkeit der PCR-Produkte. Anhand eines mitgeführten 100 bp DNA-Markers kann geprüft werden, ob die richtigen Produkte spezifisch amplifiziert wurden.

Ein Nachteil der Methode ist, daß das EtBr selbst in minimaler Konzentration durch normale Handschuhe diffundiert und mutagen wirkt. Deshalb wurden spezielle Handschuhe aus Nitril benutzt, durch die EtBr nicht durchdringt.

Nachteilig kann sich auch die Weiterverarbeitung der Fluoreszenz-Signale durch Videokamera, PC und Drucker auswirken. Vor allem schwache Signale sind gelegentlich im Ausdruck nicht mehr zu erkennen.

4.1.7 Cell Death Detection ELISA

Der verwendete Kit der Fa. Roche hat den Vorteil, daß bereits Streptavidin-beschichtete Mikrotiterplatten mitgeliefert werden, so daß Fehler bei der Platten-Beschichtung nicht auftreten können.

Der Anti-Histon-Biotin-AK reagiert mit Histonen diverser Spezies, u.a. auch mit humanen, wie für meine Experimente erforderlich. Der Anti-DNA-POD-AK reagiert mit einzel- und doppelsträngiger DNA. Von Seiten der eingesetzten Antikörper waren daher keine Probleme zu erwarten.

Die mitgeführte Positivkontrolle, ein DNA-Histon-Komplex sollte laut Herstellerangaben eine Extinktion > 600 mU zeigen. Dies war jeweils auch der Fall.

Um systematische Fehler auszuschließen wurden Doppelbestimmungen durchgeführt, so daß von einer hohen Genauigkeit der Ergebnisse ausgegangen werden konnte.

4.1.8 ApopDetect Plus Peroxidase Assay

Bei diesem Test werden Apoptosekörperchen (Oligonukleosomen) mit dem DAB-Substrat rostbraun angefärbt.

Ein Schwachpunkt dieses Tests liegt darin, daß man, um eine sichere Beurteilung bezüglich der Menge an gefärbten Apoptosekörperchen treffen zu können, einen möglichst dichten Zellrasen benötigt. Es hat sich jedoch gezeigt, daß bei der Fixierung mit Formaldehyd einige Zellen verloren gehen, v.a. bei den hohen Konzentrationen, bei denen bereits viele Zellen durch das Staurosporin so geschädigt waren, daß sie sich von der Unterlage gelöst hatten. Bei der 1000 nM-Probe zum Beispiel waren nach der Fixierung keine Zellen mehr vorhanden.

Grundsätzlich kann bei diesem Assay nur eine subjektive Beurteilung der Menge an gefärbten Oligonukleosomen vorgenommen werden, was lediglich ein vergleichendes Abschätzen des Apoptose-Ausmaßes ermöglicht. Eine zuverlässige quantitative Bestimmung ist nicht möglich.

4.1.9 Human-Interleukin 16 ELISA

Bei diesem ELISA der Fa. Roche ist die im Kit enthaltene Mikrotiterplatte zwar bereits Streptavidin-beschichtet, es ist jedoch eine zusätzliche Beschichtung mit dem Human-IL-16-AK (anti-human-IL-16-biotin) notwendig. Da es vor Beginn des Tests keine Möglichkeit gibt, die Qualität der Beschichtung zu überprüfen, besteht hier eine mögliche Fehlerquelle. Um nach der Testdurchführung sicher sein zu können, daß der ELISA optimal funktioniert hat, wird deshalb eine Standardkurve mit humanem IL-16 in sechs verschiedenen Konzentrationen (ungefähr 0 bis 800 pg/ml hIL-16) sowie eine Positivkontrolle (300 pg/ml hIL-16) mitgeführt.

Bei der Durchführung ergab sich jeweils eine typische Standardkurve und die Positivkontrolle lag im vorgegeben Bereich. Daß der Nachweis von IL-16-Protein bei den untersuchten Proben misslang, lag daher sehr wahrscheinlich nicht an einem Versagen des ELISAs, sondern deutet eher daraufhin, daß wirklich zu geringe Mengen an Protein in den Überständen vorhanden waren. In den Herstellerangaben wird 8 pg/ml hIL-16 als Untergrenze des Detektionslimits angegeben. Darunter ist eine zuverlässige Differenzierung zwischen hIL-16 und Background nicht möglich. Der IL-16-Gehalt meiner Proben lag vermutlich in diesem Bereich.

Es wurden auch bei diesem ELISA jeweils Doppelbestimmungen durchgeführt, um die Genauigkeit der Ergebnisse zu erhöhen. Eine Auswertung der Ergebnisse war jedoch aus den oben erwähnten Gründen nicht möglich.

4.2 Diskussion der Ergebnisse

4.2.1 Inkubation der Zellen mit Pharmaka

4.2.1.1 Lösungsmittel

Die verschiedenen Pharmaka wurden entweder in Wasser (H₂O dest.) oder in DMSO gelöst, siehe Kapitel 2.2.3.1. Um auszuschließen, daß die beiden Lösungsmittel allein einen Einfluß auf die Transkription der Zytokine haben,

wurde den Zellkulturen einmalig Wasser oder DMSO in der höchsten zur Lösung der Pharmaka eingesetzten Menge zugegeben. Die Zellen wurden anschließend über 24 h inkubiert. Es zeigte sich, daß die beiden Lösungsmittel verglichen mit Kontrollzellen (ohne Lösungsmittelzusatz) keine Änderung des Transkriptionsmusters bewirkten. Für die durchgeführten Versuche konnte demnach von einheitlichen Bedingungen für alle Zellen, unabhängig vom jeweiligen Lösungsmittel, ausgegangen werden.

4.2.1.2 Kurzdarstellung der Ergebnisse

Tabelle 19 (nächste Seite) zeigt zusammenfassend die Auswirkungen der einzelnen Pharmaka auf die Transkription von Interleukin 16 und Interleukin 18 nach 24 stündiger Inkubation.

Legende zur Tabelle 19:

- ↔ Keine nennenswerte Änderung der IL-16-Transkription ($\pm 10\%$)
- ↑ Steigerung der IL-16-Transkription um bis zu 40 %
- ↑↑ Steigerung der IL-16-Transkription zwischen 40 % und 70 %
- ↑↑↑ Steigerung der IL-16-Transkription um mehr als 70 %
- ↓ Reduktion der IL-16-Transkription um bis zu 40 %
- ↓↓ Reduktion der IL-16-Transkription zwischen 40 % und 70 %
- ↓↓↓ Reduktion der IL-16-Transkription um mehr als 70 %
- nicht untersucht

Tabelle 19:

Zelltyp	Patientenanzahl IL-16/-18	Pharmakon	Auswirkung auf IL-16-Transkription	Auswirkung auf IL-18-Transkription
Hautfibroblasten	4 / 2	MAS-7	↑, ↔, ↔, ↔	↓, ↓
	4 / 2	OA	↓↓↓, ↓↓↓, ↓↓↓, ↓↓↓	↓, ↓↓
	4 / 2	Iono	↔, ↔, ↓, ↔	↑↑, ↔
	4 / 2	cAMP	↓, ↑, ↑, ↑	↔, ↓↓
	4 / 2	Forskolin	↓, ↑↑↑, ↑↑↑, ↑↑↑	↓↓↓, ↓↓↓
	4 / 2	Stauro	↑, ↑, ↑↑↑, ↔	↓↓↓, ↓↓
	4 / 2	PMA	↓↓, ↓, ↓, ↓	↑, ↓
	4 / 2	H7	↓↓↓, ↓↓↓, ↓↓↓, ↓↓↓	↓↓↓, ↓↓
	4 / 2	Wespengift	↓, ↓, ↑, ↓	↔, ↓
NHDF neonatal	1 / 1	MAS-7	↔	↔
	1 / 1	OA	↓↓	↔
	1 / 1	Iono	↓	↑
	1 / 1	cAMP	↔	↑
	1 / 1	Forskolin	↓	↓↓
	1 / 1	Stauro	↑	↓
	1 / 1	PMA	↓↓↓	↑↑↑
	1 / 1	H7	-	-
	1 / 1	Wespengift	↓	↑↑
Synoviale Fibroblasten	2 / 2	MAS-7	↑, ↑	↓, ↔
	2 / 2	OA	↓↓, -	↔, -
	2 / 2	Iono	↔, ↑	↑, ↑↑
	2 / 2	cAMP	↑, ↔	↓, ↔
	2 / 2	Forskolin	↑↑↑, ↑↑↑	↓↓, ↓↓↓
	2 / 2	Stauro	↑↑, ↔	↓↓, ↓↓
	2 / 2	PMA	↑↑↑, ↓↓	↓, ↓↓
	2 / 2	H7	↓↓↓, ↓↓↓	↓↓↓, ↓↓↓
	2 / 2	Wespengift	↓, ↑↑	↓, ↑↑

Tabelle 20 zeigt die Effekte auf die Transkription der beiden Zytokine nach der Behandlung mit Staurosporin bzw. MAS-7 über einen Zeitraum von max. 48 h.

Legende zur Tabelle 20:

- ↔ Keine nennenswerte Änderung der IL-16-Transkription ($\pm 10\%$)
- ↑ Steigerung der IL-16-Transkription um bis zu 40 %
- ↑↑ Steigerung der IL-16-Transkription zwischen 40 % und 70 %
- ↑↑↑ Steigerung der IL-16-Transkription um mehr als 70 %
- ↓ Reduktion der IL-16-Transkription um bis zu 40 %
- ↓↓ Reduktion der IL-16-Transkription zwischen 40 % und 70 %
- ↓↓↓ Reduktion der IL-16-Transkription um mehr als 70 %
- nicht untersucht

Tabelle 20a: Inkubation mit Staurosporin

Zelltyp	Patientenanzahl IL-16/-18	Inkubationsdauer [h]	Auswirkung auf IL-16-Transkription	Auswirkung auf IL-18-Transkription
Hautfibroblasten	2 / 1	6	↑, ↑	↓↓
	2 / 1	12	↑↑↑, ↑↑↑	↓↓↓
	2 / 1	24	↑↑, ↑↑	↓↓↓
	2 / 1	48	↑↑, ↑	↓↓↓
NHDF neonatal	2 / 2	6	↑, ↑↑	↓↓, ↓↓
	2 / 2	12	↑, ↑	↓↓↓, ↓↓↓
	2 / 2	24	↑↑, ↑↑	↓↓↓, ↓↓↓
	2 / 2	48	↑↑↑, ↑↑	↓↓↓, ↓↓↓

Tabelle 20b: Inkubation mit MAS-7

Zelltyp	Patientenanzahl IL-16/-18	Inkubationsdauer [h]	Auswirkung auf IL-16-Transkription	Auswirkung auf IL-18-Transkription
Hautfibroblasten	3 / 3	6	↑, ↑, ↑	↔, ↔, ↔
	3 / 3	12	↓, ↓, ↓	↔, ↔, ↔
	3 / 3	24	↓, ↓, ↓	↔, ↔, ↔
	3 / 3	48	↓, ↓↓, ↔	↓, ↓, ↓

Fortsetzung Tabelle 20b: Inkubation mit MAS-7

Zelltyp	Patienten- anzahl IL-16/-18	Inkubations- dauer [h]	Auswirkung auf IL-16-Transkription	Auswirkung auf IL-18-Transkription
NHDF adult	1 / 1	6	↑	↑
	1 / 1	12	↑	↓
	1 / 1	24	↑↑↑	↓
	1 / 1	48	↑	↓
NHDF neonatal	2 / 1	6	↑, ↓	↓
	2 / 1	12	↔, ↓	↓
	2 / 1	24	↔, ↔	↓
	2 / 1	48	↓, ↓	↓
Synoviale Fibroblasten	1 / 0	6	↑	-
	1 / 0	12	↑	-
	1 / 0	24	↑↑↑	-
	1 / 0	48	↑↑↑	-

Im folgenden werden die Ergebnisse ausführlich diskutiert, wobei v.a. auf jene Substanzen näher eingegangen wird, die zu einer merklichen Änderung des Transkriptionsmusters von IL-16 und IL-18 geführt haben.

4.2.1.3 Inkubation mit cAMP

Zyklisches Adenosinmonophosphat, cAMP ($C_{10}H_{11}N_5O_6PNa$) gehört zu den sogenannten sekundären Botenstoffen, die bei der Signaltransduktion eine wichtige Rolle spielen. Bei der Signaltransduktion wird ein extrazelluläres Signal, z.B. die Bindung eines Hormons an seinen membranständigen Rezeptor in die intrazelluläre Wirkung, z.B. die Hormonwirkung umgewandelt. Die Hormon-Rezeptor-Interaktion bewirkt die Freisetzung der sekundären Botenstoffe, also z.B. cAMP oder IP_3 (Inositoltrisphosphat), die dann weitere Schritte in der Signalumwandlung katalysieren. So steuern sie u.a. die Aktivität von Proteinkinasen (cAMP) oder die intrazelluläre Ca^{2+} -Freisetzung (IP_3). Außerdem führen diese Moleküle zu einer beträchtlichen Verstärkung des Signals.

In vivo wird cAMP durch die membrangebundene Adenylatzyklase gebildet. cAMP führt einerseits zur Aktivierung der cAMP-abhängigen Proteinkinase A (PKA), welche in vielen Zellen vorhanden ist und als multifunktionelle Proteinkinase für die Phosphorylierung und damit für die Regulierung der Aktivität verschiedenster Zielproteine verantwortlich ist [12]. So wird z.B. durch diese PKA auch der Transkriptionsfaktor CREB (cAMP Response Element Binding Protein) mittels Phosphorylierung aktiviert [49]. CREB ist zusammen mit anderen Transkriptionsfaktoren, z.B. ATF (aktivierter Transkriptionsfaktor) an der Steuerung der Genexpression beteiligt. Nach der Phosphorylierung von CREB kommt es zur Bildung eines Transkriptions-Aktivierungskomplexes, der an die Promotorregion der DNA bindet, was dann zur Aktivierung der Gentranskription führt [15, 24, 33, 46, 74, 108]. Bannert et al. konnten zeigen, daß CREB durch Interaktion mit GA binding protein (GABP)-Transkriptionsfaktoren eine wichtige Rolle bei der Kontrolle des Interleukin 16-Promotors in T-Lymphozyten spielt. Es gibt im IL-16-Promotor zwei Bindungsstellen für GABP. CREB wiederum lagert sich an das GABP-Molekül an und verstärkt dadurch die Promotor-Induktion [10]. CREB wird allerdings nicht nur durch cAMP-Signale reguliert, sondern auch durch Ca^{2+} -abhängige Calmodulin-Kinasen (CamK) [92], siehe Kapitel 4.2.1.9.

Die PKA wird bereits durch cAMP-Konzentrationen von 10 nM aktiviert. In den Versuchen wurde mit einer Endkonzentration von 10 μM gearbeitet, so daß eigentlich von einer ausreichenden PKA-Aktivierung ausgegangen werden konnte. Um dies zu optimieren wurde außerdem Dibutyryl-cAMP ($\text{C}_{18}\text{H}_{23}\text{N}_5\text{O}_8\text{P}$) eingesetzt. Dieses Molekül ist weniger polar als das cAMP-Molekül und daher besser membranpermeabel.

Die Inkubation der Zellen mit cAMP ergab in einigen Fällen eine geringe Steigerung, insgesamt jedoch keine einheitliche Änderung der IL-16-Transkription, unabhängig vom jeweiligen Zelltyp. Für IL-18 gilt dies in ähnlichem Maße. Eine zuverlässige Aussage über eine Beeinflussung der Transkription der beiden Zytokine durch cAMP kann daher kaum getroffen werden. Ein Grund hierfür könnte sein, daß mit einer cAMP-Konzentration gearbeitet wurde, die für diesen Versuch nicht optimal war. Bei Betrachtung der

Ergebnisse nach Forskolin-Behandlung erscheint es nämlich wahrscheinlich, daß ein cAMP-abhängiger Signaltransduktionsweg an der Regulation der Zytokine beteiligt ist, da hier eine starke Induktion der IL-16-Transkription bzw. eine deutliche Reduktion der IL-18-Transkription aufgetreten ist, s. Kapitel 4.2.1.4.

4.2.1.4 Inkubation mit Forskolin

Forskolin ($C_{22}H_{34}O_7$) ist ein Diterpen aus der Wurzel der indianischen Pflanze *Coleus forskohlii*. Die Substanz führt über die Stimulierung der membranständigen Adenylatzyklase zu einem raschen und reversiblen Anstieg der cAMP-Konzentration in vielen Geweben, u.a. in kardialem und zerebralem Gewebe.

In Experimenten ließ sich nachweisen, daß für die Aktivierung der Adenylatzyklase durch Forskolin im Gegensatz zu der hormonell bzw. Neurotransmitter vermittelten Aktivierung keine Interaktion mit Oberflächenrezeptoren erforderlich ist [91]. Desweiteren zeigten Smellie et al., daß die Forskolin-vermittelte Bildung von cAMP nicht durch eine Inhibierung von Phosphodiesterasen bedingt ist, da die Zugabe von z.B. Methylxanthin, einem potenten Phosphodiesterase-Inhibitor keine Auswirkung auf die cAMP-Konzentration hatte [95]. Dies führte zu der Annahme, daß Forskolin direkt am Enzymkomplex der Adenylatzyklase angreift und über die Erhöhung der cAMP-Konzentration zur Aktivierung der PKA und konsekutiv des Transkriptionsfaktors CREB führt, siehe Kapitel 4.2.1.3.

Laut Hersteller (Calbiochem) liegt die EC_{50} (Konzentration, die 50 % der maximalen Wirkung hervorruft) bei einer Konzentration von 4 μ M. Seamon et al. wiesen bei einer Forskolin-Konzentration von 5 μ M eine Aktivitätssteigerung der Adenylatzyklase um das 10-fache nach [91]. Für meine Versuche wurde mit einer Endkonzentration von 5 μ M gearbeitet, so daß bei einer Inkubation über 24 h eine deutliche Steigerung der Enzymaktivität zu erwarten war.

Forskolin führte bei fast allen untersuchten Kulturen zu einer überdurchschnittlichen (> 70 %) Steigerung der IL-16-Transkription, sowohl bei den nativen Hautfibroblasten als auch bei den synovialen Fibroblasten. Lediglich

eine Hautfibroblastenkultur reagierte mit einer geringen Abschwächung des IL-16-Signals verglichen mit der unbehandelten Kontrolle. Die synovialen Fibroblasten desselben Patienten verhielten sich jedoch ähnlich wie die anderen untersuchten Zellen, so daß nicht von einem komplett differenten Reaktionsmuster dieser Kultur ausgegangen werden sollte. Der Patient ist zudem sowohl vom Alter und vom Geschlecht als auch von der Erkrankung (Coxarthrose) mit den anderen Patienten vergleichbar.

Die im Vergleich zur Behandlung mit cAMP sehr viel deutlichere Steigerung der IL-16-Transkription läßt sich vielleicht durch die größere Effizienz des Forskolins im Hinblick auf die Erhöhung der cAMP-Konzentration erklären. Forskolin bewirkte in diesem Konzentrationsbereich wahrscheinlich eine starke (bis zu 10-fache ?) Aktivitätssteigerung der Adenylatzyklase, welche dann wiederum zu einer enormen Zunahme der cAMP-Menge geführt hat, die in diesem Ausmaß durch die Inkubation mit 10 nM cAMP nicht erreicht wurde. Die daraus folgende starke Aktivitätssteigerung der Proteinkinase A bewirkt möglicherweise eine vermehrte Phosphorylierung von CREB. Es wäre dann eine gesteigerte Induktion des IL-16-Promotors beispielsweise über die Interaktion mit GABP denkbar, siehe Kapitel 4.2.1.3.

Interessanterweise zeigte sich für die Interleukin 18-Transkription ein ganz anderes Reaktionsmuster. Forskolin bewirkte in allen Kulturen eine starke Reduktion des IL-18-Signals, unabhängig vom Zelltyp. Anders als bei IL-16 scheint hier also eine Steigerung der cAMP-Konzentration die Transkription zu unterdrücken.

Die erhaltenen Ergebnisse deuten darauf hin, daß ein cAMP-abhängiger Mechanismus bei der Steuerung der beiden Zytokine eine Rolle spielt. Es scheint jedoch eine hohe cAMP-Konzentration für eine merkliche Beeinflussung der Transkription erforderlich zu sein.

4.2.1.5 Inkubation mit Staurosporin

Staurosporin ist ein Inhibitor einer Vielzahl von Proteinkinasen, u.a. der PKA, PKC und PKG, wobei die Inhibition der PKC am ausgeprägtesten ist.

Desweiteren ist Staurosporin in der Lage, Apoptose zu induzieren. Bei intrazellulärem Streß, z.B. Schäden an der DNA, wird aus den Mitochondrien Cytochrom c freigesetzt, welches in der Zelle vorhandene Procaspasen aktiviert. Im weiteren Verlauf kommt es zur Aktivierung einer Caspasenkaskade, an der die Caspasen 3 und 9 beteiligt sind. Diese Proteine sind wiederum in der Lage die betreffende Zelle zu töten, indem sie z.B. wichtige Membranproteine (sogenannte Laminine) zerstören oder DNA-spaltende Enzyme (Nukleasen) freisetzen.

Für die Versuche wurde Staurosporin in einer Konzentration von 10 nM eingesetzt. Einerseits wurde in Vorarbeiten mit dieser Konzentration gearbeitet, andererseits hat sich bei eigenen Titrationsversuchen gezeigt, daß sich hier bereits ein deutlich positiver Effekt auf die IL-16-Transkription ergibt (s. Kapitel 3.4.1). Außerdem konnte davon ausgegangen werden, daß die Zellvitalität nicht durch eine eventuelle Apoptose-Induktion beeinträchtigt wurde, siehe Kapitel 3.7. Interessanterweise konnte durch diese Titrationsversuche aber nachgewiesen werden, daß es zu einer dosisabhängigen Induktion der IL-16-Transkription durch Staurosporin kommt. Bei höheren Staurosporin-Konzentration, v.a. bei 100 nM muß jedoch von einer Beteiligung apoptotischer Zellvorgänge ausgegangen werden, die eine Steuerung der IL-16-Transkription allein durch die Hemmung der Proteinkinase C eher unwahrscheinlich erscheinen lassen, siehe Kapitel 4.2.2. Auch in der Literatur ist beschrieben, daß 100 nmolares Staurosporin in der Lage ist, in Neuroblastomzellen Apoptose zu induzieren [65].

Mit Staurosporin wurden zwei verschiedene Experimente durchgeführt. Einige Kulturen wurden über 24 h parallel zu den anderen Pharmaka mit Staurosporin inkubiert. Ein anderer Ansatz sollte die Beobachtung der IL-16-Transkription über einen Zeitraum von maximal 48 h ermöglichen, wobei alle 6 h RNA isoliert wurde.

Bei der Inkubation über 24 h ließ sich die IL-16-Transkription in fast allen untersuchten Fällen unabhängig vom Zelltyp steigern, in einem Fall sogar sehr stark. Nur ein Patient zeigte keine Änderung der Transkriptmenge nach Inkubation mit Staurosporin, wobei dies sowohl für die dermalen als auch für die synovialen Fibroblasten zutraf. In Bezug auf Alter, Geschlecht und Erkrankung

(Coxarthrose) gab es jedoch im Vergleich mit den anderen Patienten keine gravierenden Unterschiede, so daß eher von einem generell verschiedenen Reaktionsmuster dieses Patienten ausgegangen werden sollte.

Die Zeitverläufe bestätigten diese Ergebnisse. Bei den nativen dermalen wie auch bei den neonatalen Fibroblasten wurde das IL-16-Signal zu jedem Zeitpunkt verstärkt. Anzumerken ist, daß die Patientenzellen bereits nach 12 h zur deutlichsten Induktion führten, die neonatalen Fibroblasten jedoch erst nach 48 h die maximale Transkriptionssteigerung erzielten.

Die Ergebnisse deuten darauf hin, daß in diesem Konzentrationsbereich die Hemmung der PKC, eventuell auch der anderen Proteinkinasen, einen positiven Einfluß auf die Interleukin 16-Transkription hat. Es könnte zum einen ein verminderter Abbau vorhandenen Interleukin 16s oder aber eine gesteigerte Synthese von IL-16m-RNA dafür verantwortlich sein. Die Tatsache, daß bei der Inkubation mit PMA, einem selektiven Aktivator der PKC die Transkription, von einer Ausnahme abgesehen stets reduziert wurde, unterstreicht die Schlußfolgerung, daß die Beeinflussung der PKC-Aktivität ein für die IL-16-Regulation wichtiger Signaltransduktionsweg zu sein scheint.

Ganz anders stellte sich dagegen der Einfluß von Staurosporin auf die IL-18-Transkription dar. Nach 24 h wurde das IL-18-Signal in allen Fällen reduziert und interessanterweise bei den Kulturen am stärksten, die für IL-16 mit der größten Steigerung des Signals reagierten. Auch die Beobachtung über den längeren Zeitraum zeigte stets eine deutliche Unterdrückung der IL-18-mRNA-Synthese nach Behandlung mit Staurosporin. Im Unterschied zu IL-16 ergab sich aber für IL-18 keine dosisabhängige Beeinflussung der Transkription, siehe Kapitel 3.4.2. Offensichtlich spielt also auch bei der Regulation von Interleukin 18 dieser Signaltransduktionsweg eine Rolle, allerdings mit entgegengesetzter Wirkung.

Die immensen Unterschiede in der Auswirkung von Staurosporin und H7, ebenfalls ein Proteinkinase-Inhibitor mit breitem Wirkungsspektrum lassen sich wahrscheinlich durch den Vitalitätsverlust der Zellen nach Behandlung mit H7 erklären. Die eingesetzte H7-Konzentration von 100 μM war wohl für die

Hemmung der Proteinkinasen nicht optimal und hat zudem die Vitalität der Zellen massiv beeinträchtigt.

Auch die grundsätzlich unterschiedlichen Molekülstrukturen könnten eine Erklärung für die Diskrepanz der Ergebnisse liefern, indem sie vielleicht über verschiedene Inhibitionsmechanismen wirken.

4.2.1.6 Inkubation mit H7 (Dihydrochlorid)

H7 ($C_{14}H_{17}N_3O_2Sx2HCl$) ist ein Proteinkinase-Inhibitor mit breitem Wirkungsspektrum. So werden u.a. die Proteinkinasen A, C und G sowie die Myosinleichtkettenkinase (MLCK) gehemmt.

H7 führte zu einer signifikanten Reduktion der IL-16- und einer ziemlich deutlichen Verringerung der IL-18-Transkription. Das Signal sank stets auf ca. 10 % des unbehandelten Kontrollsignals. Es fiel auf, daß die Zellen bereits lichtmikroskopisch ein verändertes Erscheinungsbild zeigten. Zwar wurde die Konfluenz der Kultur nicht sichtbar gestört, die einzelnen Zellen hatten jedoch ihr spindelförmiges Aussehen verloren und waren jetzt eher pathologisch flach und sternförmig, eine Form, die man ansonsten bei terminal differenzierten Fibroblasten beobachten kann. Einige Zellen, die nicht mehr adhärent waren, hatten eine kugelige Form angenommen. Desweiteren konnte bei gleicher Zellzahl stets weniger RNA isoliert werden als bei den mit anderen Pharmaka inkubierten Zellen. H7 bewirkte in der eingesetzten Konzentration von 100 μ M offensichtlich einen deutlichen Vitalitätsverlust der Zellen. Die Anfärbung mit Trypanblau ergab nach 24 h eine Reduktion der Vitalität auf ca. 70 %, unbehandelte Zellen zeigten einen Rückgang auf 90 %. Dies mag zum einen an einer zu hohen Arbeitskonzentration gelegen haben, andererseits ist bekannt, daß diese Substanz in einigen Zellen zu apoptotischer DNA-Fragmentierung bzw. zum Tod von Zellen führen kann [52, 76]. Lopez et al. zeigten, daß H7 in einer Konzentration von 100 μ M in SH-SY5Y Neuroblastomzellen Apoptose induziert [65].

Im Rahmen dieser Arbeit kann jedoch nicht sicher geklärt werden, ob die nachgewiesene Reduktion der Transkription beider Zytokine primär durch diese

Zellschädigung zustande kommt. Es könnte auch sein, daß sich die Hemmung der Proteinkinasen durch H7 in ihrem Mechanismus grundsätzlich von derjenigen durch Staurosporin unterscheidet und die Diskrepanz der Ergebnisse hierdurch erklärbar wäre. Die Tatsache, daß jedoch sowohl die Transkription von IL-16 als auch die Transkription von IL-18 so stark supprimiert wurde, spricht eher für die erstere Erklärung. Denn nach der PKC-Hemmung durch Staurosporin hat sich ein unterschiedliches Verhalten der beiden Zytokine im Hinblick auf die Beeinflussung der Transkription ergeben, siehe Kapitel 4.2.1.5.

Unabhängig davon schließen die zelltoxischen Wirkungen von H7 eine Anwendung am Patienten jedoch nahezu aus, so daß diese Substanz eher nicht für zukünftige Behandlungsstrategien zur Verfügung stehen wird.

4.2.1.7 Inkubation mit PMA (Phorbol-12-Myristat-13-Acetat)

PMA gehört zur Familie der Phorbolster und aktiviert in vivo und in vitro die inaktive Proteinkinase C (PKC). Aufgrund der chemischen Ähnlichkeit von PMA mit Diacylglycerin (DAG) ist der Aktivierungsmechanismus gleich wie bei diesem sekundären Botenstoff, die Wirkung bleibt jedoch länger bestehen, da PMA um einiges langsamer abgebaut wird. Die PKC wiederum reguliert Ca^{2+} -abhängig über Phosphorylierung die Aktivität bestimmter Zielproteine und wirkt über die Stimulation einiger Transkriptionsfaktoren an der Steuerung der Genexpression mit.

Laut Hersteller (Calbiochem) ist PMA bereits in nanomolaren Konzentrationen in der Lage, die PKC zu aktivieren, so daß bei der Arbeitskonzentration von 1 ng/ml mit einer ausreichenden Stimulierung gerechnet werden konnte.

Mit Ausnahme einer Synovia-Kultur führte PMA stets zu einer Reduktion des IL-16-Signals, bei den neonatalen Fibroblasten sogar sehr deutlich. Es ist daher anzunehmen, daß die aktivierte PKC über Phosphorylierung jene Proteine stimuliert, die entweder einen vermehrten Abbau oder eine verminderte Neusynthese der IL-16-mRNA bewirken.

Dagegen ließ sich ein einheitlicher Einfluß auf die IL-18-Regulation nicht beobachten. Die neonatalen Fibroblasten reagierten mit einer starken Zunahme, die synovialen Zellen reduzierten das Signal und die Hautfibroblasten zeigten unterschiedliche Veränderungen.

Die Interpretation dieser Ergebnisse unter Berücksichtigung der Resultate aus der Inkubation mit Staurosporin (siehe 4.2.1.5) legt den Schluß nahe, daß die Beeinflussung der PKC-Aktivität ein gangbarer Signaltransduktionsweg für die Regulierung der beiden Zytokine, insbesondere des Interleukin 16s darstellt.

Für einen möglichen therapeutischen Einsatz scheint PMA jedoch eher ungeeignet zu sein, da es zur T-Zell-Aktivierung führt [87]. Dies könnte sich im Rahmen der rheumatoiden Arthritis nachteilig auswirken, da hier bereits eine massive Infiltration durch T-Lymphozyten in synovialen Gewebe vorliegt. Es sollte daher auf andere Substanzen, die die Proteinkinase C aktivieren zurückgegriffen werden.

4.2.1.8 Inkubation mit Ocadaic Acid

Ocadaic Acid, OA ($C_{44}H_{68}O_{13}$) ist ein starker Inhibitor der Serin-/Threonin-spezifischen Proteinphosphatasen 1 (PP1) und 2A (PP2A) [53]. Die Hemmung der Ca^{2+} /Calmodulin-abhängigen Proteinphosphatase 2B (PP2B) dagegen ist nur gering ausgeprägt, die PP2C bleibt gänzlich unbeeinflusst.

Proteinphosphatasen (PPasen) wirken den von Proteinkinasen hervorgerufenen Veränderungen der enzymatischen Aktivität entgegen, indem sie die Hydrolyse bestimmter Phosphatgruppen von Proteinkinasen und anderen Proteinen katalysieren. Es kann also angenommen werden, daß die Hemmung der PPasen durch OA letztlich zu einer ähnlichen Wirkung führt, wie die Stimulation von Proteinkinasen, z.B. durch den PKC-Aktivatoren PMA, siehe Kapitel 4.2.1.7.

Die 24 stündige Inkubation der nativen und neonatalen Hautfibroblasten mit OA zeigte insgesamt eine signifikante Reduktion des Interleukin 16-Signals verglichen mit dem Signal von unbehandelten Zellen. Auch die untersuchten synovialen Fibroblasten reagierten mit einem recht deutlichen, aber nicht signifikanten Rückgang der IL-16-mRNA-Menge.

Dieses Ergebnis bestätigt die obige Hypothese, daß die Wirkung von OA und PMA auf die Transkription von IL-16 vergleichbar sein müßten. Die Verringerung der IL-16-Transkriptmenge durch OA war jedoch wesentlich ausgeprägter. Ein Grund hierfür könnte ein mögliche Beeinträchtigung der Zellvitalität durch OA sein. Es ist nachgewiesen, daß OA in humanen Mammakarzinomzellen sowie in myeloischen Zellen Apoptose induziert [57], wohingegen es die glukokortikoid-induzierte Apoptose in T-Zell-Hybridomas verhindert [79]. Bei der Betrachtung der Zellen unter dem Lichtmikroskop konnte man sehen, daß sich viele Zellen vom Flaschenboden abgelöst und jetzt ein kugeliges Aussehen angenommen hatten, so wie die Zellen üblicherweise nach der Trypsinierung aussahen. Einen Anhalt für eine Schädigung der Fibroblasten gab es jedoch nicht, es konnte auch stets ausreichend mRNA isoliert werden. Eine Anfärbung mit Trypanblau, um tote Zellen farbig zu markieren wurde daher nicht durchgeführt.

Gegen eine merkliche Schädigung der Zellen durch OA und eine dadurch bedingte starke IL-16-Signalreduktion spricht auch die Tatsache, daß das IL-18-Signal nur schwach bzw. gar nicht verringert wurde. Denn bei der Inkubation mit H7 beispielsweise wurden die Zellen so sehr geschädigt, daß sowohl die IL-16- als auch die IL-18-Transkription massiv reduziert war, siehe Kapitel 4.2.1.6. Wahrscheinlich war die eingesetzte OA-Konzentration von 10 nM (entspricht für die PP1 der IC_{50} , d.h. der Konzentration, die 50 % der maximalen Inhibierung bewirkt) schlicht so gewählt, daß ein optimaler Effekt erzielt wurde.

Im Hinblick auf einen therapeutischen Einsatz in der Behandlung von Rheumapatienten mit einem erhöhten IL-16-Spiegel scheint OA aufgrund der bekannten apoptoseinduzierenden Wirkung jedoch eher nicht in Frage zu kommen.

4.2.1.9 Inkubation mit Ionomycin

Ionomycin ($C_{41}H_{72}O_9$) gehört zur Molekülgruppe der Ionophore und ist hochselektiv für das Ca^{2+} -Ion. Durch den hydrophoben Außenbereich sind Ionophore in der Lage, die Lipiddoppelschicht von Zellmembranen zu

durchdringen, und somit eignen sie sich bestens, um durch Einschleusung von Ca^{2+} den normalerweise niedrigen zytosolischen Ca^{2+} -Spiegel kurzfristig deutlich anzuheben.

Intrazellulär wirkt Calcium als second messenger, indem es an eine Vielzahl von Proteinen bindet und dadurch deren Aktivitätsniveau beeinflusst. Auch für die Kontraktion glatter Muskelzellen ist ein Anstieg der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration erforderlich. Allerdings werden viele Ca^{2+} -vermittelte Prozesse nicht durch das Calciumion selbst, sondern durch das Ca^{2+} -bindende Protein Calmodulin ausgelöst. So werden u.a. einige Proteinkinasen durch diesen Ca^{2+} -Calmodulin-Komplex gesteuert, die sogenannten Ca^{2+} -abhängigen Calmodulin-kinasen (CamK) [50]. In Fibroblasten wird wahrscheinlich die CamK III aktiviert [104]. Mehrere Arbeitsgruppen haben in den letzten Jahren herausgefunden, daß diese Calmodulinkinasen auch an der Steuerung des bereits erwähnten Transkriptionsfaktors CREB beteiligt sind [50, 92, 108, 111].

Die erhöhte intrazelluläre Calcium-Konzentration durch Ionomycin führte in der Mehrzahl der Fälle zu keiner nennenswerten Änderung des IL-16-Signals, vereinzelt zeigte sich eine leichte Reduktion der Transkriptmenge. Etwas anders dagegen stellte sich das Ergebnis bei der Untersuchung von IL-18 dar. Hier konnte von einer Ausnahme abgesehen stets eine Steigerung der IL-18-mRNA-Menge, z.T. sogar um bis zu 60 %, verglichen mit der unbehandelten Kontrolle beobachtet werden. Lediglich eine dermale Fibroblastenkultur zeigte keine Änderung des Signals.

Man kann also davon ausgehen, daß ein erhöhter intrazellulärer Calcium-Spiegel keine entscheidende Rolle bei der Regulation der IL-16-Transkription spielt. Die Tatsache, daß das Ionomycin auf die Transkription von IL-18 jedoch eine deutliche Wirkung ausübte belegt auch, daß die eingesetzte Ionomycin-Konzentration von 200 ng/ml durchaus nicht zu gering gewählt war. Auf die Transkription von IL-18 hat eine höhere zytosolische Ca^{2+} -Konzentration offensichtlich einen positiven Einfluß.

4.2.1.10 Inkubation mit MAS-7

Das Mastoparan-Analogon MAS-7 ($C_{67}H_{124}N_{18}O_{15}$) aktiviert direkt guanylnukleotidbindende Proteine (G-Proteine). G-Proteine sind ein Zwischenprodukt bei einigen Signaltransduktionsprozessen, u.a. bei der hormonabhängigen cAMP-Kaskade. Nach der Bildung eines Hormon-Rezeptor-Komplexes aktiviert dieser das membranständige G-Protein, welches dann wiederum die Stimulierung der Adenylatzyklase bewirkt. Ein einziger Hormon-Rezeptor-Komplex katalysiert dabei die Bildung vieler aktivierter G-Proteine, was zu einer beträchtlichen Signalverstärkung führt. Die Stimulierung der Adenylatzyklase verursacht die Formation von cAMP aus ATP, das über die Aktivierung der Proteinkinase A an der Steuerung verschiedener Proteine beteiligt ist, siehe Kapitel 4.2.1.3.

MAS-7 wurde in einer Konzentration von 10 μ M für die Experimente eingesetzt. Zum einen sollte damit ein Vergleich mit Ergebnissen aus Vorarbeiten ermöglicht werden, zum anderen hat sich bei Titrationsversuchen gezeigt, daß bei dieser Konzentration nach 24 Stunden ein positiver Effekt auf die IL-16-Transkription vorhanden ist, ohne daß die Zellen in ihrer Vitalität beeinträchtigt werden, siehe Kapitel 3.3. Ab einer MAS-7-Konzentration von 30 μ M hat sich die Morphologie der Fibroblasten verändert, es ließen sich lichtmikroskopisch zunehmend geschädigte Zellen erkennen und das IL-16-Signal nach 24 h war im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle auf ca. 50 % reduziert. Bei der höchsten Konzentration von 100 μ M waren schließlich nur noch vereinzelt vitale Fibroblasten in der Kultur sichtbar. Bereits ab einer MAS-7-Konzentration von 50 μ M ließen sich nicht mehr genügend intakte Zellen für die RNA-Extraktion gewinnen.

Wie bei der Inkubation mit Staurosporin wurden auch hier zwei verschiedene Versuchsansätze durchgeführt. Einerseits sollte die Auswirkung von MAS-7 auf Interleukin 16 und 18 nach 24 h im Vergleich mit den anderen Pharmaka getestet werden. Andererseits war die Beobachtung über einen 48 stündigen Zeitraum mit RNA-Extraktionen im Abstand von jeweils 6 h von Interesse. Letzteres Experiment diente v.a. der Überprüfung, ob sich die deutliche

Verstärkung des IL-16-Signals durch MAS-7 in dermalen Fibroblasten, wie sie sich in Vorarbeiten einmal gezeigt hatte, bestätigen ließe. Der Wirkstoff Mastoparan ist nämlich ein Bestandteil des Wespen- bzw. Bienengiftes und eine zuverlässige Hochregulierung der IL-16-Transkription in Hautfibroblasten durch MAS-7 würde den Schluß nahe legen, daß IL-16 an der allergischen Reaktion auf Insektenstiche beteiligt ist.

Nach 24 h Inkubation zeigten die untersuchten Hautfibroblasten mehrheitlich keine nennenswerte Änderung der IL-16-mRNA-Menge, lediglich ein Patient reagierte mit einer geringen Signalsteigerung. Beide synovialen Fibroblasten-Kulturen zeigten eine leichte Verstärkung des IL-16-Signals.

Bei der Beobachtung über den längeren Zeitraum ergab sich auch kein einheitliches Reaktionsmuster.

Es muß also davon ausgegangen werden, daß MAS-7 keinen entscheidenden Einfluß auf die IL-16-Transkription hat, auf gar keinen Fall jedoch eine deutliche Steigerung des Signals bewirkt, wie es in einem Vorversuch nachgewiesen wurde. Möglicherweise sind diese Unterschiede darauf zurückzuführen, daß der damalige Versuch mit Hautfibroblasten eines Rheumapatienten durchgeführt wurde, in meinen Experimenten jedoch mit Zellen von Osteoarthrose-Patienten bzw. „gesunden“ Patienten (mit beispielsweise Knochenbrüchen oder Bänderverletzungen) gearbeitet wurde.

Dieses Ergebnis legt den Schluß nahe, daß die Aktivierung von G-Proteinen durch MAS-7 nicht an der Regulation der IL-16-Transkription in Hautfibroblasten beteiligt ist. Eventuell war aber auch, ähnlich wie bei der Inkubation mit cAMP, die Konzentration nicht ausreichend, um eine optimale Stimulierung des Adenylatzyklase-Pfades zu erreichen. Denn nach den Ergebnissen aus der Forskolin-Behandlung zu urteilen, kommt ein cAMP-abhängiger Signaltransduktionsweg ja durchaus in Frage.

In Übereinstimmung mit den Resultaten aus der Inkubation mit dem Wespengift, siehe Kapitel 4.2.1.11 stellt sich die Hypothese einer Beteiligung von IL-16 an der allergischen Reaktion auf Wespen- und/oder Bienenstiche daher als unhaltbar dar.

Auch auf die Regulation von IL-18 scheint MAS-7 in dieser Konzentration kaum eine Auswirkung zu haben. Sowohl die dermalen als auch die synovialen Fibroblasten reagierten unverändert bzw. mit einer geringen Signalreduktion. Es ergeben sich auch hier gewisse Parallelitäten zur Inkubation mit cAMP, die ebenfalls keine bzw. nur eine leichte Verringerung des IL-18-Signals bewirkt hat. Erst die Inkubation mit Forskolin erbrachte eine eindeutige Signalreduktion und nährte die Vermutung, daß ein cAMP-abhängiger Übertragungsweg an der Regulation des Zytokins beteiligt ist.

4.2.1.11 Inkubation mit Wespengift

Für die Versuche kam Wespengift (*Vespula* spp.) der Fa. Alk-Scherax zum Einsatz. In der Regel werden mit dieser Substanz Patienten mit ausgeprägter bzw. ansonsten therapieresistenter IgE-vermittelter Allergie gegen Wespengift behandelt.

Mit den jetzigen Experimenten sollte getestet werden, ob die Zugabe des Wespengiftes eine Steigerung der Interleukin 16-Transkription in Hautfibroblasten bewirkt. Dies wiederum würde für eine Beteiligung von IL-16 am allergischen Geschehen nach Insektenstichen sprechen würde, was durchaus denkbar wäre, da auch bei anderen allergischen Reaktionen, wie z.B. beim Asthma bronchiale ein Einfluß von IL-16 diskutiert wird [12]. Wie im vorigen Kapitel bereits erwähnt, hatte sich nämlich in einem Vorversuch durch Behandlung mit dem Mastoparan-Analogen MAS-7, welches homolog zu den Peptiden in Wespen- bzw. Bienengift ist, eine starke Induktion der Interleukin 16-Transkription nachweisen lassen.

Für die Behandlung der Fibroblasten (5 dermale und 2 synoviale Kulturen) wurde das Wespengift in einer Konzentration von 10 µM eingesetzt. Die gleiche Konzentration wurde auch bei der Inkubation mit MAS-7 verwendet, um so einen besseren Vergleich der Ergebnisse herstellen zu können.

Nach 24 h zeigte sich jedoch in der Mehrzahl der untersuchten Kulturen eine leichte Reduktion des IL-16-Signals. Darüberhinaus ließen sich keine Parallelen zwischen MAS-7 und Wespengift, ihren Einfluß auf die IL-16-mRNA-Menge

betreffend erkennen. Es waren jeweils Fibroblasten verschiedener Patienten, die sich anders verhielten als der Rest der untersuchten Zellen. Ein Grund hierfür könnte auch sein, daß sowohl die Wespengift- als auch die MAS-7-Konzentration nicht optimal gewählt waren und daher keine eindeutigen Ergebnisse erzielt wurden.

Die Resultate sprechen trotz allem, wie in Kapitel 4.2.1.10 bereits angedeutet, gegen ein Mitwirken von Interleukin 16 an der Pathogenese der allergischen Reaktion auf Wespen- bzw. Bienengift.

4.2.2 Cell Death Detection ELISA

Es ist bekannt, daß Staurosporin in der Lage ist, in Zellen Apoptose zu induzieren. Da die Inkubation mit Staurosporin von besonderer Bedeutung war, weil sich in Vorversuchen mit synovialen Fibroblasten ein deutlich positiver Effekt auf die IL-16-Transkription nachweisen ließ, sollte abgeklärt werden, ob die bisher eingesetzte Staurosporin-Konzentration von 10 nM bereits zur Apoptose führt bzw. ab welcher Konzentration damit gerechnet werden muß. Von Interesse war v.a. die Frage, ob für die Regulation der IL-16-Transkription hauptsächlich die PKC-Hemmung, wie in Kapitel 4.2.1.5 beschrieben verantwortlich ist, oder ob eventuell auftretende Apoptosevorgänge ebenfalls eine Rolle spielen.

Staurosporin induziert Apoptose über den mitochondrialen Weg, an dem u.a. Cytochrom c sowie die Caspasen 3 und 9 beteiligt sind [Wesselborg, pers. Mitteilung]. Da nachgewiesen werden konnte, daß in CD8⁺ T-Zellen Caspasen, insbesondere die Caspase 3 in das processing des IL-16-Vorläuferproteins involviert sind, kam die Vermutung auf, daß eventuell ein Zusammenhang zwischen der erhöhten Staurosporin-induzierten IL-16-Expression und vermehrter Apoptose über die Caspase 3 bestehen könnte. Denkbar wäre z.B., daß Staurosporin über den o.a. Mechanismus zu einer Aktivierung der Caspase 3 führt und diese wiederum eine gesteigerte Synthese von reifem bioaktivem IL-16 bewirkt. Die vermehrte IL-16-Expression könnte dann als physiologisches

Signal zur Infiltration von Makrophagen und Monozyten, die für die Beseitigung der entstandenen apoptotischen Zellreste zuständig wären, angesehen werden. Ein erster Versuch, bei dem die Zellen über 24 h mit Staurosporin in Konzentration von 10 nM bis maximal 100 nM behandelt wurden, zeigte erst bei der höchsten Konzentration eine leichte Steigerung der Extinktion um ca. 60 % gegenüber der unbehandelten Kontrolle. Ab einer Konzentration von 100 nM ist für Staurosporin nachgewiesen, daß es in Neuroblastomzellen Apoptose induziert [65]. Es ist also durchaus möglich, daß auch bei den untersuchten Fibroblasten durch die Zugabe von 100 nmolarem Staurosporin in geringem Umfang Apoptose ausgelöst wurde. Anzumerken ist jedoch, daß die gemessenen Extinktionen im Vergleich zur Positivkontrolle minimal waren, das Ergebnis sollte daher mit Vorsicht interpretiert werden.

Ein weiteres Experiment, bei dem zusätzlich eine Kultur mit 1000 nmolarem Staurosporin behandelt wurde, bestätigte das obige Ergebnis und zeigte außerdem, daß die Substanz in dieser Konzentration die Zellen in hohem Maße apoptotisch werden läßt. Der gemessene 1000 nM-Extinktionswert lag im Bereich der Positivkontrolle.

Ergänzend wurden die gleichen Kulturen auf Nekrose untersucht, einfach um sicherzugehen, daß die erhaltenen Ergebnisse auch tatsächlich auf apoptotische Vorgänge zurückzuführen waren. Dabei ließ sich nach 24 h beobachten, daß bei 10, 50 und 100 nmolarem Staurosporin sowie bei der Negativkontrolle ein konstanter geringer Anteil der Zellen nekrotisch geworden war. Dieser Anteil entspricht sicherlich am ehesten dem permanenten physiologischen Zellumsatz. Bei 1000 nmolarem Staurosporin jedoch konnte eine starke Zunahme der Nekrose nachgewiesen werden. Es ist daher nur schwer möglich, bei dieser hohen Konzentration eine exakte Differenzierung zwischen Apoptose und Nekrose vorzunehmen, da offensichtlich beide Vorgänge in starkem Maße induziert werden.

Zusammenfassend läßt sich festhalten, daß in Konzentrationsbereichen bis ca. 100 nM eine mäßige Steigerung der apoptotischen Zellvorgänge anzunehmen ist. Bei der für die Experimente eingesetzten Stauro-Konzentration von 10 nM kann aber ziemlich sicher davon ausgegangen werden, daß keine Apoptose

induziert wird. Im Hinblick auf die Regulation der IL-16-Transkription in diesem Konzentrationsbereich scheint daher die Hemmung der Proteinkinase C der entscheidende Faktor zu sein. Für die Zunahme der Transkription bei Konzentrationen von 50 bis 100 nM (s. Kapitel 3.4.1) ist jedoch möglicherweise neben der PKC-Inhibition auch zunehmend eine Beteiligung apoptotischer Vorgänge über den o.a. Caspase 3-abhängigen Pfad in Erwägung zu ziehen.

4.2.3 ApopDetect Plus Peroxidase Assay

Diese Färbung von Apoptosekörperchen wurde ergänzend zum obigen ELISA durchgeführt, um die Zuverlässigkeit der erhaltenen Ergebnisse zu überprüfen. Die Fibroblasten wurden ebenfalls über 24 h mit Staurosporin inkubiert. Es kam 100, 500 und 1000 nmolares Staurosporin zum Einsatz. Wie aus den Fotos in Kapitel 3.8 ersichtlich, konnte das Ergebnis des ELISAS bestätigt werden. Schon bei der niedrigen Konzentration ließen sich im Vergleich zur Negativkontrolle mehr Apoptosekörperchen anfärben und bei 500 nmolarem Staurosporin konnte eine deutliche Apoptose-Induktion nachgewiesen werden. Die mit 1000 nmolarem Staurosporin behandelten Zellen waren jedoch bereits lichtmikroskopisch erkennbar so stark geschädigt, daß hier die Fixierung eines zusammenhängenden Zellrasens unmöglich war und daher keine Färbung vorgenommen werden konnte. Bei dieser hohen Konzentration muß man, den Resultaten des ELISAS zufolge, davon ausgehen, daß sowohl apoptotische als auch nekrotische Prozesse ablaufen, die letztendlich die Vitalität der Kultur massiv beeinträchtigen.

Auch dieser Test unterstreicht also die Erkenntnis, daß Staurosporin in Konzentrationen ab ca. 100 nM Apoptose induziert.

4.2.4 Human-Interleukin 16 ELISA

1998 gelang es Franz et al. Interleukin 16-Protein in synovialer Flüssigkeit (SF) nachzuweisen. Sie fanden heraus, daß die IL-16-Konzentration in der SF von Rheuma-Patienten höher ist als diejenige von Osteoarthrose-Patienten. Die

synovialen Fibroblasten in der Wachstumsfront (lining layer) wurden mittels In-situ-Hybridisierung als die Hauptproduzenten des IL-16s identifiziert [42].

Die Frage war nun, ob auch in vitro eine spontane IL-16-Sekretion durch Fibroblasten vorhanden ist, bzw. ob diese sich durch Stimulation induzieren läßt. In Vorversuchen hatte sich lediglich durch Serumreduktion eine meßbare Sekretion des Zytokins induzieren lassen.

Bei einem ersten Experiment wurde mit den Überständen aus der 24 h-Pharmakoninduktion nativer dermaler sowie neonataler Fibroblasten gearbeitet. Es ließ sich jedoch weder eine spontane IL-16-Sekretion nachweisen, noch führte die Inkubation mit IL-16-transkriptionsstimulierenden Substanzen zu einer meßbaren Proteinsekretion. Die gemessenen Extinktionen lagen alle unter der Sensitivitätsgrenze des Verfahrens, so daß eine Auswertung unmöglich war. Ein Versagen des Testes kann aber sehr sicher ausgeschlossen werden, da sich aus den mitgeführten Standards aus rekombinantem humanem IL-16 eine klassische Standardkurve erstellen ließ und die untersuchte Positivkontrolle im vorgegebenen Konzentrationsbereich gemessen wurde.

Bei einem zweiten Ansatz wurden die Zellen über 24 h mit Staurosporin in verschiedenen Konzentrationen (10 nM bis max. 100 nM) und Forskolin (5 µM) behandelt. Durch diese Substanzen hatte sich in den vorangegangenen Versuchen die IL-16-Transkription am stärksten steigern lassen. Außerdem wurden die Fibroblasten ausgehungert, indem mit serumreduziertem 0,5 % FCS-haltigem Medium (ansonsten 10 % FCS) inkubiert wurde. Anschließend wurde für weitere 24 h IL-1β zu den Zellen gegeben, ebenfalls in serumreduziertem Medium. Es ist erwiesen, daß IL-1β zur Induktion von IL-16 führt [16, 29], ein möglicher Mechanismus hierfür könnte z.B. folgender sein: IL-1β ist ein Substrat der Caspase 3 aus der IL-1-Konversionsenzym-Familie [34]. Diese Caspase ist auch für die Synthese von bioaktivem IL-16-Protein aus dem Vorläufermolekül Pro-IL-16 zuständig [110, 113]. Bei erhöhtem IL-1β-Spiegel, wie z.B. in der synovialen Flüssigkeit von Patienten mit rheumatoider Arthritis wäre anzunehmen, daß das Überangebot an IL-1β zu einem vermehrten Abbau des Moleküls führt. Hierzu wird aktivierte Caspase 3 benötigt. Die erhöhte Konzentration an aktivierter Caspase 3 könnte dann für eine vermehrte Bildung

reifen Interleukin 16s verantwortlich sein. In Vorversuchen konnte jedoch keine Steigerung, sondern im Gegenteil eine geringe Reduktion der IL-16-Sekretion nach Zugabe von IL-1 β , verglichen mit der unbehandelten Kontrolle nachgewiesen werden.

Serumreduktion hatte in früheren Experimenten bei nativen Primärkulturen zu einer Sekretion von IL-16-Protein geführt. Das Aushungern löste bei den Zellen z.T. pathologische bzw. terminale Differenzierungsprozesse aus [88, 89]. Denkbar wäre also, daß bei der RA vermehrt terminal differenzierte Zellen vorliegen, die an der Produktion von IL-16 beteiligt sind.

Leider konnte auch bei diesem Versuch keine meßbare IL-16-Sekretion beobachtet werden. Sowohl bei den mit IL-1 β -behandelten Fibroblasten als auch bei den nur über 24 h inkubierten Zellen lagen die gemessenen Extinktionen außerhalb des quantifizierbaren Bereiches. Es kann jedoch auch hier von einem Funktionieren des ELISAs ausgegangen werden. D.h. weder das Aushungern der Zellen, noch die Zugabe von IL-1 β wie auch die relativ hohe Staurosporin-Konzentration von 100 nM reichten aus, um eine meßbare Proteinsekretion zu induzieren. Möglicherweise ist die geringe Kopienanzahl des IL-16-Gens, die im LightCycler zwar noch quantifizierbar ist, doch zu gering, um eine im ELISA detektierbare Sekretion des Proteins zu bewirken

4.3 Schlußfolgerungen

Die durchgeführten Experimente haben gezeigt, daß dermale bzw. synoviale Fibroblasten von Patienten mit Osteoarthrose bzw. von Traumapatienten spontan IL-16- bzw. IL-18-kodierende mRNA in geringem Ausmaß transkribieren.

Eine Beeinflussung der IL-16-Transkription ließ sich beobachten nach Inkubation mit Pharmaka, die entweder in einen cAMP-abhängigen Pfad eingreifen (z.B. Forskolin), oder aber die Aktivität von Proteinkinasen, in besonderem Maße der PKC regulieren (z.B. Staurosporin oder PMA) bzw. Proteinphosphatasen hemmen (z.B. Ocadaic Acid). Es hat sich jedoch gezeigt, daß lediglich die Inkubation mit OA bzw. H7 eine signifikante Veränderung

(Reduktion) der IL-16-Transkription bewirkte. Um für die übrigen Pharmaka eine exaktere statistische Aussage treffen zu können, müßten noch weitere Kulturen gleichermaßen untersucht werden. Dies war im Rahmen dieser Arbeit nicht möglich, da innerhalb des vorgesehenen zeitlichen Rahmens nicht mehr als die eingesetzten Kulturen zur Verfügung standen.

Auch auf die Transkription von IL-18 hatten diese Substanzen den stärksten Einfluß. Das Signifikanzniveau von 5 % wurde allerdings in keinem Fall erreicht. Auch hier wurden meist zu wenige Kulturen getestet, um eine belastbare Aussage bezüglich der Signifikanz machen zu können.

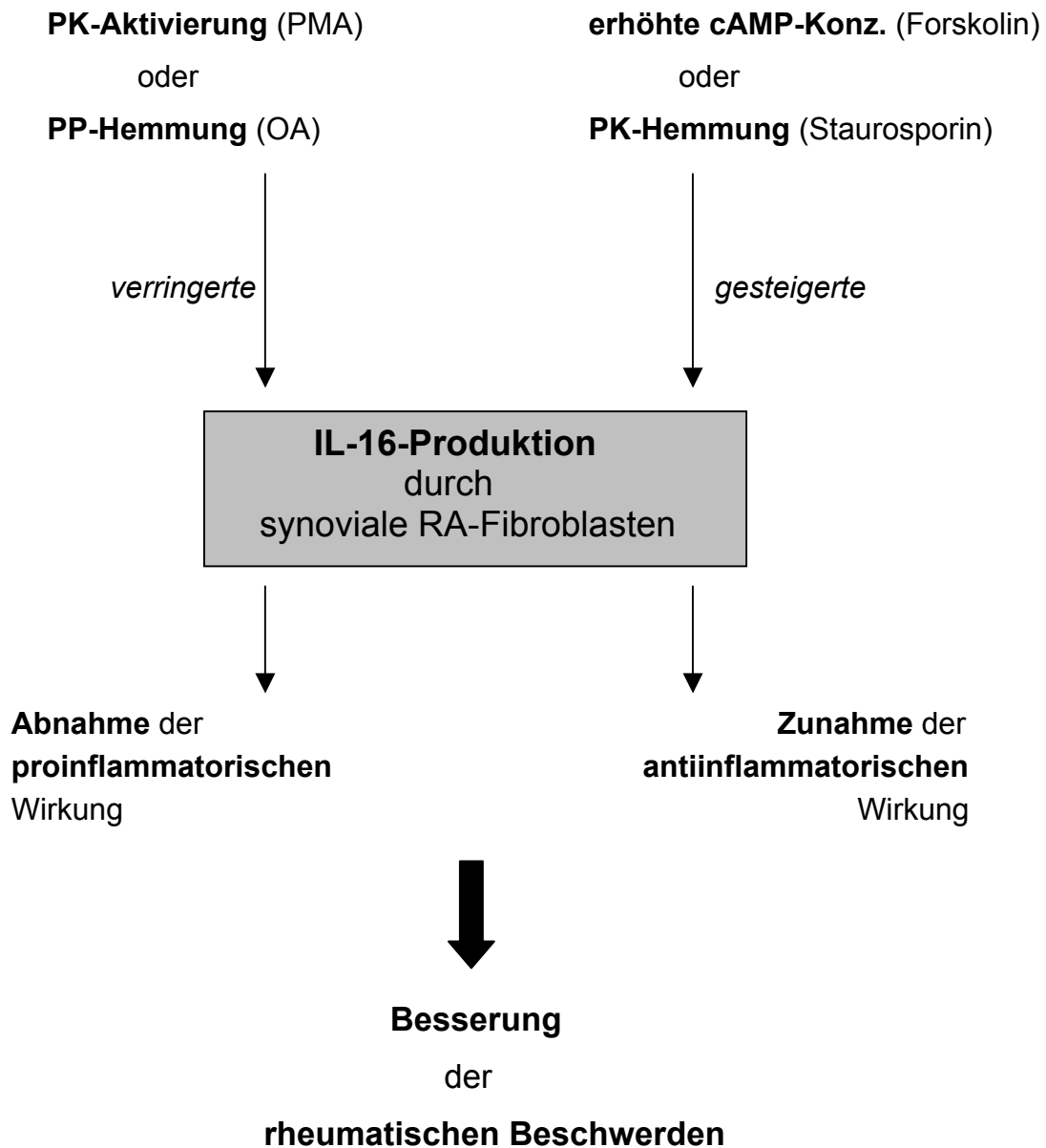
Interessanterweise wurden die beiden Zytokine jedoch jeweils entgegengesetzt reguliert.

Dem Interleukin 16 werden bei der Pathogenese der rheumatoiden Arthritis verschiedene Funktionen zugeschrieben. Durch seine starke chemotaktische Wirkung auf CD4⁺ T-Helferzellen und weniger stark auch auf weitere Zellen, die in das entzündliche Geschehen involviert sind, vermutet man eine proinflammatorische Rolle von IL-16. Andererseits konnte durch die Behandlung von SCID-Mäusen mit rekombinantem humanem IL-16 eine verminderte Transkription und Sekretion proinflammatorischer Zytokine, u.a. IFN- γ , IL-1 β oder TNF- α nachgewiesen werden, so daß auch eine antiinflammatorische Komponente diskutiert wird.

In beiden Fällen sind die im Rahmen dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse über die Regulationsmöglichkeiten der IL-16-Transkription in humanen Fibroblasten wichtig, um zukünftig durch gezielte Steuerung des IL-16-Titers eine Besserung der Beschwerden von Rheumapatienten herbeiführen zu können. Für die jetzigen Experimente konnten leider keine Fibroblasten von RA-Patienten gewonnen werden, es muß jedoch davon ausgegangen werden, daß RA-Fibroblasten den gleichen Regulationsmechanismen unterliegen wie die untersuchten Fibroblasten.

Die folgende Abbildung stellt die Möglichkeiten des therapeutischen Einsatzes der o.a. Substanzen bei der rheumatoiden Arthritis schematisch dar.

Abb. 35: Therapeutische Steuerungsmöglichkeiten der IL-16-Transkription



Ergänzend wäre eine Steuerung des IL-16-Spiegels durch Beeinflussung der Konzentration bzw. Aktivität der Caspase 3 vorstellbar. Dieses Enzym ist am processing des IL-16-Vorläufermoleküls in das reife bioaktive IL-16-Protein beteiligt, so daß über diesen Weg eine Manipulation der IL-16-Produktion möglich erscheint.

Auch die Verabreichung von IL-16 selbst stellt wahrscheinlich eine Möglichkeit zur therapeutischen Intervention dar.

Ein therapeutischer Einsatz von IL-18-regulierenden Pharmaka würde, nach heutigem Stand der Forschung, vermutlich primär auf eine Senkung des IL-18-Titers ausgerichtet sein. Dieses Zytokin übernimmt eine proinflammatorische Rolle bei der Pathogenese der rheumatoiden Arthritis, indem es an der Produktion einiger wichtiger Entzündungsmediatoren, wie z.B. IFN- γ , IL-1 β oder TNF- α maßgeblich beteiligt ist. In Frage kommen würden daher v.a. Substanzen, die eine Erhöhung der cAMP-Konzentration oder eine Inhibition von Proteinkinasen, insbesondere der PKC bewirken, also z.B. Forskolin oder Staurosporin.

Eine klinische Anwendung dieser beiden Substanzen hätte aller Voraussicht nach also eine Auswirkung auf beide Zytokine, und bei der Annahme einer antiinflammatorischen Funktion für IL-16 und einer proinflammatorischen für IL-18 könnte von einer positiven Beeinflussung des Krankheitsverlaufes der RA ausgegangen werden.

Eine Sekretion des IL-16-Proteins konnte weder spontan noch nach Pharmaka-Stimulation bzw. nach Inkubation mit IL-1 β nachgewiesen werden. Eine Aussage über eine pharmakologische Regulation der IL-16-Sekretion kann daher nicht getroffen werden.

5 Zusammenfassung

Das Hauptinteresse dieser Arbeit galt dem Interleukin 16. Dieses Zytokin wurde in erhöhter Konzentration in synovialen Gewebe von Patienten mit rheumatoider Arthritis vorgefunden. Da IL-16 stark chemotaktisch auf CD4⁺ T-Zellen wirkt, wird vermutet, daß die massive Infiltration CD4⁺ T-Zellen in das Synovium von RA-Patienten maßgeblich durch dieses Zytokin bestimmt wird. Als Hauptquelle für das IL-16 konnten neben CD8⁺ T-Zellen aktivierte synoviale Fibroblasten identifiziert werden. Neben einer proinflammatorischen Funktion wird dem IL-16 auch eine antiinflammatorische Wirkung bei der Pathogenese der rheumatoiden Arthritis zugeschrieben.

Im Hinblick auf eine eventuelle therapeutische Anwendung IL-16-regulierender Substanzen in der Zukunft, sollten im Rahmen dieser Arbeit die Regulationsmechanismen der IL-16-Transkription bzw., falls möglich, auch der IL-16-Sekretion in vitro an humanen Fibroblasten untersucht werden.

Zusätzlich wurde an einigen Kulturen die Transkriptions-Regulation von Interleukin 18 ausgetestet. Dieses Zytokin ist ebenfalls in erhöhter Konzentration im Synovium von RA-Patienten nachzuweisen. Über die Produktion einiger proinflammatorischer Chemokine, u.a. IFN- γ und TNF- α scheint es an der Pathogenese der rheumatoiden Arthritis beteiligt zu sein. Auch hier sollte geprüft werden, welche Substanzklassen für eine mögliche therapeutische Anwendung geeignet wären.

Für die Experimente wurden sowohl dermale als auch synoviale Fibroblasten eingesetzt. Ergänzend wurden Hautfibroblasten einer neonatalen und einer adulten Zelllinie gesunder Spender untersucht. Zum Zeitpunkt der Versuchsdurchführung war es leider nicht möglich Gewebe von Rheumapatienten zu erhalten, so daß die Fibroblasten mehrheitlich von Patienten mit Osteoarthrose bzw. von einigen Traumapatienten abstammten. Da aber wahrscheinlich die Regulation der IL-16- wie auch der IL-18-Transkription in humanen Fibroblasten von Rheuma- und Osteoarthrose- bzw. Traumapatienten den gleichen Mechanismen unterliegen, erscheint eine Übertragung der Ergebnisse auf Rheumafibroblasten zulässig.

Bei allen untersuchten Kulturen ließ sich, wenn auch in geringer Menge spontan IL-16- und IL-18-mRNA nachweisen.

Durch Inkubation mit cAMP bzw. Forskolin, einem Aktivator der Adenylatzyklase ergab sich eine Zunahme der IL-16-Transkription, die durch Forskolin sogar sehr ausgeprägt war. Bei der Untersuchung der IL-18-Transkription zeigte sich hingegen eine starke Reduktion durch Forskolin. Dies deutet auf die Beteiligung eines cAMP-abhängigen Signaltransduktionsweges an der Steuerung dieser beiden Zytokine hin.

Darüberhinaus ließ sich nur noch nach Zugabe des PKC-Inhibitors Staurosporin eine zuverlässige Steigerung der IL-16-Transkription beobachten. Es zeigte sich eine dosisabhängige Induktion der IL-16-Expression, wobei vermutlich bei niedrigen Stauro-Konzentrationen (z.B. 10 nM) allein die Hemmung der PKC entscheidend ist. Erst ab höheren Konzentrationen (ca. 100 nM) scheint zunehmend auch die apoptose-induzierende Wirkung dieser Substanz eine Rolle zu spielen. Bei der Induktion der Apoptose durch Staurosporin entsteht aktivierte Caspase 3. Dieses Enzym katalysiert auch die Umwandlung des IL-16-Vorläufermoleküls in das bioaktive IL-16, so daß hierdurch eine gesteigerte IL-16-mRNA-Menge erklärt werden könnte.

Auf die Transkription von IL-18 hatte Staurosporin eine entgegengesetzte Wirkung. Es erfolgte eine deutliche konzentrationsunabhängige Reduktion.

Die Regulation der IL-16-Transkription durch Beeinflussung der PKC-Aktivität konnte durch die Inkubation der Fibroblasten mit PMA bestätigt werden. PMA, ein PKC-Aktivator führte zu einer geringen Reduktion des IL-16-Signals.

Ansonsten konnte eine deutliche Veränderung der Transkription lediglich noch durch Zugabe von Ocadaic Acid bzw. H7 nachgewiesen werden. Das IL-16-Signal wurde durch beide Pharmaka signifikant reduziert. Die Proteinphosphatase-Hemmung durch Ocadaic Acid unterstreicht damit die Vermutung, daß in humanen Fibroblasten kinase- bzw. phosphataseabhängige Pfade von Bedeutung sind. Die starke Signalreduktion durch den Breitspektrum-PKC-Inhibitor H7 lag wahrscheinlich v.a. daran, daß die Zellen durch die eingesetzte H7-Konzentration massiv geschädigt worden waren.

Die Vermutung, daß IL-16 am allergischen Geschehen nach Insektenstichen beteiligt sein könnte, ließ sich nicht bestätigen. Weder die Inkubation mit MAS-7, welches homolog zu den Peptiden im Wespengift ist, noch diejenige mit Wespengift bewirkte eine konstante Zunahme des IL-16-Transkriptes.

Der Nachweis von IL-16-Protein in Zellkulturüberständen gelang nicht. Es konnte weder eine spontane noch eine Pharmakon- bzw. IL-1 β -stimulierte Sekretion in meßbarem Ausmaß beobachtet werden. Es ist daher anzunehmen, daß die ohnehin nur geringe IL-16-Transkription, die im LightCycler zwar noch detektierbar war, für eine merkliche Translation und Sekretion des Proteins nicht ausreichend war.

Für einen therapeutischen Einsatz bei der rheumatoiden Arthritis, der eine Manipulation des IL-16- (bzw. IL-18-) Spiegels zum Ziel hat, scheinen also v.a. Substanzen in Frage zu kommen, die entweder cAMP-abhängige Signaltransduktionswege beeinflussen oder aber in kinase-(v.a. PKC-) bzw. phosphataseabhängige Wege eingreifen.

6 Literaturverzeichnis

Folgende Referenzen wurden zur Erstellung der Dissertation herangezogen:

1. **Althoff J, Quint J, Richter KD, Jones DB** (1988): Osteoblasten- und Knochenorgankulturen unter in vivo Bedingungen. *Z Zahnärztl Impl* 4: 282-285.
2. **Aho K, Koskenvuo M, Tuominen J, Kaprio J** (1986): Occurrence of rheumatoid arthritis in a nationwide series of twins. *J Rheumatol* 13: 899-902.
3. **Aicher WK, Peter HH, Eibel H** (1996): Human synovial fibroblasts are resistant to anti-CD95 (Fas) induced apoptosis (abstract). *Arthritis Rheum* 39 Suppl 9: 75.
4. **Akira S** (2000): The role of IL-18 in innate immunity. *Curr Opin Immunol* 12: 59-63.
5. **Akita K, Ohtsuki T, Nukuda Y, Tanimoto T, Namba M, Okura T, Takakura-Yamamoto R, Torigoe K, Gu Y, Su MS-S, Fujii M, Satoh-Itoh M, Yamamoto K, Kohno K, Ikeda M, Kurimoto M** (1997): Involvement of caspase-1 and caspase-3 in the production and processing of mature human interleukin 18 in monocytic THP.1 cells. *J Biol Chem* 272: 26595-26603.
6. **Amiel C, Darcissac E, Truong MJ, Dewulf J, Loyens M, Mouton Y, Capron N, Bahr GM** (1999): Interleukin 16 (IL-16) inhibits human immunodeficiency virus replication in cells from infected subjects, and serum IL-16 levels drop with disease progression. *J Infect Dis* 179: 83-91.
7. **Arnett FC, Edworthy SM, Bloch DA, McShane DJ, Fries JF, Cooper NS, Healey LA, Kaplan SR, Lian MH, Luthra HS, Medsger TA Jr, Mitchell DM, Neustadt DH, Pinals RS, Schaller JG, Sharp JT, Wilder RL, Hunder GG** (1988): The American Rheumatism Association 1987 revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 31: 315-324.
8. **Baier M, Werner A, Bannert N, Metzner K, Kurth R** (1995): HIV suppression by interleukin 16. *Nature* 381: 29-30.
9. **Baier M, Bannert N, Werner A, Lang K, Kurth R** (1997): Molecular cloning, sequence, expression and processing of the interleukin 16 precursor. *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 5273-5277.
10. **Bannert N, Avots A, Baier M, Serfling E, Kurth R** (1999): GA-binding protein factors, in concert with the coactivator CREB binding protein/p300, control the induction of the interleukin 16 promoter in T lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 1541-1546.
11. **Bellini A, Yoshimura H, Vitori E, Marini M, Mattoli S** (1993): Bronchial epithelial cells of patients with asthma release chemoattractant factors for T lymphocytes. *J Allergy Clin Immunol* 92: 412.

12. **Bertherat J** (1997): Nuclear effects of the cAMP pathway activation in somatotrophs. *Horm Res* 47: 245-250.
13. **Blaschke S, Schulz H, Schwarz G, Blaschke V, Müller GA, Reuss-Borst M** (2001): Interleukin 16 expression in relation to disease activity in rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 28: 12-21.
14. **Bohn E, Sing A, Zumbihl R, Bielfeldt C, Okamura H, Murimoto M, Heesemann J, Autenrieth IB** (1998): IL-18 (IFN- γ inducing factor) regulates early cytokine production in, and promotes resolution of, bacterial infection in mice. *J Immunol* 160: 299-307.
15. **Brindle PK, Montminy MR** (1991): The CREB family of transcription activators. *Curr Opin Genet Develop* 2: 199-204.
16. **Burmester GR, Stuhlmüller B, Keyszer GM, Kinne R** (1997): Mononuclear phagocytes and rheumatoid synovitis: Mastermind or workhorse in arthritis? *Arthritis Rheum* 40: 5-18.
17. **Cao R** (1999): Interleukin 18 acts as an angiogenesis and tumor suppressor. *FASEB J* 13: 2195-2202.
18. **Carson WE, Dierksheide JE, Jabbour S, Anghelina M, Bouchard P, Ku G, Yu H, Baumann H, Shah MH, Cooper MA, Durbin J, Caligiuri MA** (2000): Coadministration of Interleukin 18 and interleukin-12 induces a fatal inflammatory response in mice: critical role of natural killer cell interferon- γ production and STAT-mediated signal transduction. *Blood* 96: 1465-1473.
19. **Center DM, Cruikshank WW** (1982): Modulation of lymphocyte migration by human lymphokines: identification and characterization of chemoattractant activity for lymphocytes from mitogen-stimulated mononuclear cells. *J Immunol* 128: 2562-2568.
20. **Center DM, Berman JS, Kornfeld H, Theodore AC, Cruikshank WW** (1995): The lymphocyte chemoattractant factor. *J Lab Clin Med* 125: 167-172.
21. **Center DM, Kornfeld H, Cruikshank WW** (1996): Interleukin 16 and its function as a CD4 ligand. *Immunol Today* 17: 476-481.
22. **Center DM, Kornfeld H, Ryan TC, Cruikshank WW** (2000): Interleukin 16: implications for CD4 functions and HIV-1 progression. *Immunol Today* 21: 273-280.
23. **Chang JT, Segal BM, Nakanishi K, Okamura H, Shevach EM** (2000): The costimulatory effect of IL-18 on the induction of antigen-specific IFN- γ production by resting T cells is IL-12 dependent and is mediated by up-regulation of the IL-12-receptor β 2 subunit. *Eur J Immunol* 30: 1113-1119.
24. **Chrivia JC, Kwok RP, Lamb N, Hagiwara M, Montminy MR, Goddman RH** (1993): Phosphorylated CREB binds specifically to the nuclear protein CBP. *Nature* 365: 855-859.

25. **Cooper AM, Dalton DK, Stewart TA, Griffin JP, Russel DG, Orme IM** (1993): Disseminated tuberculosis in interferon- γ -gene-disrupted mice. *J Exp Med* 178: 2243-2247.
26. **Coughlin CM, Salhany KE, Wysocka M, Aruga E, Kurzawa H, Chang AE, Hunter CA, Fox JC, Trinchieri G, Lee WMF** (1998): Interleukin-12 and Interleukin 18 synergistically induce murine tumor regression which involves inhibition of angiogenesis. *J Clin Invest* 101: 1441-1452.
27. **Cruikshank WW, Center DM** (1982): I. Modulation of lymphocyte migration by human lymphokines. II. Purification of a lymphotactic factor (lymphocyte chemoattractant factor). *J Immunol* 128: 2569-2574.
28. **Cruikshank WW, Berman JS, Theodore AC, Bernardo J, Center DM** (1987): Lymphokine activation of T4+ T lymphocytes and monocytes. *J Immunol* 138: 3817-3825.
29. **Cruikshank WW, Greenstein JL, Theodore AC, Center DM** (1991): Lymphocyte chemoattractant factor induces CD4-dependent intracytoplasmic signal in lymphocytes. *J Immunol* 146: 2829-2934.
30. **Cruikshank WW, Center DM, Nisar N, Wu M, Natke B, Theodore A, Kornfeld H** (1994): Molecular and functional analysis of a lymphocyte chemoattractant factor: association of biologic function with CD4 expression. *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 5109-5113.
31. **Cruikshank WW, Lim K, Theodore AC et al.** (1996): IL-16 inhibition of CD3-dependent lymphocyte activation and proliferation *J Immunol* 157: 5240-5248.
32. **Dayer JM** (1999): Interleukin 18, rheumatoid arthritis and tissue destruction. *J Clin Invest* 104: 1337-1339.
33. **Deisseroth K, Heist EK, Tsien RW** (1998): Translocation of calmodulin to the nucleus supports CREB phosphorylation in hippocampal neurons. *Nature* 392: 198-202.
34. **Dinarello CA** (1992): Role of interleukin-1 in infectious diseases. *Immunol Rev* 127: 119-146.
35. **Dinarello CA** (1999): Interleukin 18. *Methods* 19: 121-132.
36. **Distler O, Müller-Ladner U, Schölmerich J, Gay RE, Gay S** (1999): Rheumatoide Arthritis: Neue molekulare und zelluläre Aspekte. *Medizinische Klinik* 94: 673-680.
37. **Fantuzzi G, Puren AJ, Harding MW, Livingston DJ, Dinarello CA** (1998): Interleukin 18 regulation of interferon- γ production and cell proliferation as shown in interleukin-1 β converting enzyme (caspase-1)-deficient mice. *Blood* 91: 2118-2125.
38. **Fantuzzi G, Dinarello CA** (1999): Interleukin 18 and interleukin-1 β : two cytokine substrates for ICE (caspase-1). *J Clin Immunol* 19: 1-11.
39. **Fassbender HG** (1983): Histomorphological basis of articular cartilage destruction in rheumatoid arthritis. *Coll Relat Res* 3: 141-155.

40. **Firestein GS, Zvaifler NJ** (1990): How important are T cells in chronic rheumatoid arthritis? *Arthritis Rheum* 33: 768-773.
41. **Flynn JL, Chan J, Triebold KJ, Dalton DK, Stewart TA, Bloom BR** (1993): An essential role for interferon- γ in resistance to *Mycobacterium tuberculosis* infection. *J Exp Med* 178: 2249-2254.
42. **Franz JK, Kolb SA, Hummel KM, Lahrz F, Neidhart M, Aicher WK, Pap T, Gay RE, Fontana A, Gay S** (1998): Interleukin 16, produced by synovial fibroblasts, mediates chemoattraction for CD4⁺ T lymphocytes in rheumatoid arthritis. *Eur J Immunol* 28: 2661-2671.
43. **Franz JK, Hummel KM, Aicher WK** (1997): Sentrin – a novel anti-apoptotic molecule is strongly expressed in synovium of patients with rheumatoid arthritis (RA). *Arthritis Rheum* 40: 116.
44. **Franz JK, Pap T, Hummel KM, Nawrath M, Aicher WK, Shigeyama Y, Müller-Ladner U, Gay RE, Gay S** (2000): Expression of Sentrin, a novel anti-apoptotic molecule at sites of synovial invasion in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 43: 599-607.
45. **Gay S, Gay RE, Koopman WJ** (1993): Molecular and cellular mechanisms of joint destruction in rheumatoid arthritis: two cellular mechanisms explain joint destruction? *Ann Rheum Dis* 52: 39-47.
46. **Gonzalez GA, Montminy MR** (1989): Cyclic AMP stimulates somatostatin gene transcription by phosphorylation of CREB at serine 133. *Cell* 59: 675-680.
47. **Gracie JA, Forsey RJ, Chan WL, Gilmour A, Leung BP, Greer MR, Kennedy K, Carter R, Wei XQ, Xu D, Field M, Foulis A, Liew FY, McInnes IB** (1999): A proinflammatory role for IL-18 in rheumatoid arthritis. *J Clin Invest* 104: 1393-1401.
48. **Gu Y, Kuida K, Tsutsui H, Ku G, Hsiao K, Fleming MA, Hayashi N, Higashino K, Okamura H, Nakanishi K, Kurimoto M, Tanimoto T, Flavell RA, Sato V, Harding MW, Livingston DJ, Su MSS** (1997): Activation of interferon- γ inducing factor mediated by interleukin-1 β converting enzyme. *Science* 275: 206-209.
49. **Hagiwara M, Brindle P, Harootunian A, Armstrong R, Rivier J, Vale W, Tsien R, Montminy MR** (1993): Coupling of hormonal stimulation and transcription via the cyclic AMP-responsive factor CREB is rate limited by nuclear entry of protein kinase A. *Mol Cell Biol* 13: 4852-4859.
50. **Hanson PI, Schulman H** (1992): Neuronal Ca²⁺/Calmodulin-dependent protein kinases. *Ann Rev Biochem* 61: 559-601.
51. **Harding CV, Unanue E** (1990): Quantification of antigen-presenting cell MHC class II/peptide complexes necessary for T-cell stimulation. *Nature* 346: 574-576.

52. **Hayakawa A, Yokoyama I, Tajiri H, Okamoto T, Nakashima I** (1999): Protein kinase C-dependent anti-apoptotic mechanism that is associated with high sensitivity to anti-Fas antibody in ovarian cancer cell lines. *Cancer Lett* 140: 113-119.
53. **Haystead TA, Sim AT, Carling D, Honnor RC, Tsukitani Y, Cohen P, Hardie DG** (1989): Effects of the tumour promoter okadaic Acid on intracellular protein phosphorylation and metabolism. *Nature* 337: 78-81.
54. **Henderson B, Revell P, Edwards JCW** (1988): Synovial lining cell hyperplasia in rheumatoid arthritis: dogma and fact. *Ann Rheum Dis* 47: 348-349.
55. **Hoshino T, Kawase Y, Okamoto M, Yokota K, Yoshino K, Yamamura K, Miyazaki J, Young HA, Oizumi K** (2001): Cutting Edge: IL-18-Transgenic Mice: In vivo evidence of a broad role for IL-18 in modulating immune function. *J Immunol* 166: 7014-7018.
56. **Kawakami K, Qureshi MH, Zhang TT, Okamura H, Murimoto M, Saito A** (1997): IL-18 protects mice against pulmonary and disseminated infection with *Cryptococcus neoformans* by inducing IFN- γ production. *J Immunol* 159: 5528-5534.
57. **Kiguchi K, Glesne D, Chubb CH, Fujiki H, Huberman E** (1994): Different induction of apoptosis in human breast tumor cells by Okadaic Acid and related inhibitors of protein phosphatases 1 and 2A. *Cell Growth Differ* 5: 995-1004.
58. **Kim SH, Eisenstein M, Reznikov L, Fantuzzi G, Novick D, Rubinstein M, Dinarello CA** (2000): Structural requirements of six naturally occurring isoforms of the IL-18 binding protein to inhibit IL-18. *Proc Natl Acad Sci USA* 97: 1190-1195.
59. **Klimiuk PA, Goronzy JJ, Weyand CM** (1999): IL-16 as an anti-inflammatory cytokine in rheumatoid synovitis. *J Immunol* 162: 4293-4299.
60. **Laberge S, Cruikshank WW, Beer DJ, Center DM** (1996): Secretion of IL-16 (lymphocyte chemoattractant factor) from serotonin-stimulated CD8⁺ T-cells in vitro. *J Immunol* 156: 310-315.
61. **Laberge S, Cruikshank WW, Kornfeld H, Center DM** (1995): Histamine-induced secretion of lymphocyte chemoattractant factor from CD8⁺ T-cells is independent of transcription and translation: evidence for constitutive protein synthesis and storage. *J Immunol* 155: 2902-2910.
62. **Laberge S, Ernst P, Ghaffar O, Cruikshank WW, Kornfeld H, Center DM, Hamid Q** (1997): Increased expression of Interleukin-16 in bronchial mucosa of subjects with atopic asthma. *Am J Resp Cell Mol Biol* 17: 193-202.

63. **Lahrtz F, Piali L, Nadal D, Pfister HW, Spanaus KS, Baggiolini M, Fontana A** (1997): Chemotactic activity on mononuclear cells in the cerebrospinal fluid of patients with viral meningitis is mediated by interferon- γ -inducible protein-10 and monocyte chemotactic protein-1. *Eur J Immunol* 12: 2484-2489.
64. **Leung PB, McInnes IB, Esfandiari E, Wei XQ, Liew FY** (2000): Combined effects of IL-18 and IL-12 in collagen induced arthritis. *J Immunol* 164: 6495-6502.
65. **Lopez E, Ferrer I** (2000): Staurosporine- and H-7-induced cell death in SH-SY5Y neuroblastoma cells is associated with caspase-2 and caspase-3 activation, but not with activation of the FAS/FAS-L-caspase-8 signaling pathway. *Brain Res Mol Brain Res* 85: 61-67.
66. **Maini RN, Zvaivler NJ**: Rheumatoid arthritis and other synovial disorders. In: Klippel JH, Dieppe PA, eds. *Rheumatology*. Mosby Int., London, 1998.
67. **Matsumoto S, Müller-Ladner U, Gay RE** (1996): Ultrastructural demonstration of apoptosis, Fas and Bcl-2 expression of rheumatoid synovial fibroblasts. *J Rheumatol* 23: 1345-1352.
68. **McInnes, Leung BP, Sturrock RD, Field M, Liew FY** (1997): Interleukin-15 mediates T cell-dependent regulation of tumor necrosis factor- α production in rheumatoid arthritis. *Nat Med* 3: 189-195.
69. **McInnes IB, Gracie A, Leung BP, Wei XQ, Liew FY** (2000): Interleukin 18: a pleiotropic participant in chronic inflammation. *Immunol Today* 21:312-315.
70. **McNiff PA, Stewart C, Sullivan J, Showell HJ, Gabel CA** (1995): Synovial fluid from rheumatoid arthritis patients contains sufficient levels of IL-1 beta and IL-6 to promote production of serum amyloid A by Hep3B cells. *Cytokine* 7: 209-219.
71. **Micallef MJ et al.** (1997): In vivo antitumour effects of murine interferon- γ inducing factor/Interleukin 18 in mice bearing syngeneic Meth A sarcoma malignant ascites. *Cancer Immunol Immunother* 43: 361-367.
72. **Mohr W, Hummler N, Pelster B, Wessinghage D** (1986): Proliferation of pannus tissue cells in rheumatoid arthritis. *Rheumatol Int* 6: 127-132.
73. **Monteleone G, Parello T, Monteleone I, Tammara S, Luzzza F, Pallone F** (1999): Bioactive IL-18 expression is up-regulated in Crohn`s disease. *J Immunol* 163: 143-147.
74. **Montminy MM** (1997): Transcriptional regulation by cyclic AMP. *Annu Rev Biochem* 66: 807-822.
75. **Müller-Ladner U, Gay RE, Gay S** (1997): Cellular pathways of joint destruction. *Curr Opin Rheumatol* 9: 213-220.
76. **Nagano M, Suzuki H, Ui-Tei K, Sato S, Miyata Y** (1998): H-7-induced apoptosis in the cells of a drosophila neuronal cell line through affecting unidentified H-7-sensitive substance(s). *Neurosci Res* 31: 113-121.

77. **Nepom GT, Byers P, Seyfried C, Healay LA, Wilske KR, Stage D, Nepom BS** (1989): HLA genes associated with rheumatoid arthritis: identification of susceptibility alleles using specific oligonucleotide probes. *Arthritis Rheum* 32: 15-21.
78. **Nykanen P, Bergroth V, Raunio P, Nordstrom D, Kottinen YT** (1986): Phenotypic characterization of ³H-thymidine incorporating cells in rheumatoid arthritis synovial membrane. *Rheumatol Int* 6: 269-271.
79. **Ohoka Y, Nakai Y, Mukai M, Iwata M** (1993): Ocadaic Acid inhibits glucocorticoid-induced apoptosis in T cell hybridomas at its late stage. *Biochem Biophys Res Commun* 197: 916-921.
80. **Okura T, Gong L, Kamitani T** (1996): Protection against Fas/Apo-1- and tumour necrosis factor-mediated cell death by a novel protein, sentrin. *J Immunol* 157: 4277-4281.
81. **Olee T, Hashimoto S, Quack J, Lotz M** (1999): IL-18 is produced by articular chondrocytes and induces proinflammatory and catabolic responses. *J Immunol* 162: 1096-1100.
82. **Osaki T et al.** (1998): IFN- γ inducing factor/Interleukin 18 administration mediates IFN- γ and IL-12 independent anti-tumour effects. *J Immunol* 160: 1742-1749.
83. **Osaki T, Hashimoto W, Gambotto A, Okamura H, Robbins PD, Kurimoto M, Lotze MT, Tahara H** (1999): Potent antitumor effects mediated by local expression of the mature form of the interferon- γ inducing factor, Interleukin 18 (IL-18). *Gene Therapy* 6: 808-815.
84. **Petrow PK, Theis B, Eckard A, Karbowski A, Eysel P, Salzmann G** (1997): Determination of proliferating cells at the sites of cartilage invasion in patients with rheumatoid arthritis (abstract). *Arthritis Rheum* 40 Suppl 9: 251.
85. **Pizzaro TT, Michie MH, Bentz M, Woraratanadharm J, Smith MF, Foley E, Moskaluk CA, Bickston SJ, Cominelli F** (1999): IL-18, a novel immunoregulatory cytokine, is up-regulated in Crohn's disease: expression and localization in intestinal mucosal cells. *J Immunol* 162: 6829-6835.
86. **Rand TH, Cruikshank WW, Center DM, Weller PF** (1991): CD4-mediated stimulation of human eosinophils: lymphocyte chemoattractant factor and other CD4-binding ligands elicit eosinophil migration. *J Exp Med* 173: 1521-1528.
87. **Richie ER, McEntire B, Phillips J, Allison JP** (1988): Altered expression of lymphocyte differentiation antigens on phorbol-ester-activated CD4⁺8⁺ T cells. *J Immunol* 140: 4115-4122.
88. **Rodemann HP, Bayreuther K, Francz PI, Albiez M** (1989): The differentiation of normal and transformed human fibroblasts in vitro is influenced by electromagnetic fields. *Exp Cell Res* 180: 84-93.

89. **Rodemann HP, Peterson HP, Schwenke K, Wangenheim KH v.** (1991): Terminal differentiation of human fibroblasts is induced by radiation. *Scanning Microscopy* 5: 1135-1143.
90. **Ronningen KS, Spurkland A, Eegeland T, Iwe T, Vartdal F, Thorsby E** (1990): Rheumatoid arthritis may be primarily associated with HLA-DR4 molecules sharing a particular sequence at residues 67-74. *Tissue Antigens* 36: 235-240.
91. **Seamon KB, Padgett W, Daly JW** (1981): Forskolin: Unique diterpene activator of adenylate cyclase in membranes and in intact cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 78: 3363-3367.
92. **Sheng M, Thompson MA, Greenberg ME** (1991): CREB: A Ca²⁺-regulated transcription factor phosphorylated by Calmodulin-dependent kinases. *Science* 252: 1427-1430.
93. **Shoda LKM, Zarlenga DS, Hirano A, Brown WC** (1999): Cloning of a cDNA encoding bovine Interleukin 18 and analysis of IL-18 expression in macrophages and its IFN- γ inducing activity. *J Interferon Cytokine Res* 19: 1169-1177.
94. **Silman AJ, MacGregor AJ, Thomson W, Holligan S, Carthy D, Farhan A, Ollier WE** (1993): Twin concordance rates for rheumatoid arthritis: results from nationwide study. *Br J Rheumatol* 32: 903-907.
95. **Smellie FW, Davis CW, Daly JW, Wells JN** (1979): Alkylxanthines: inhibition of adenosine-elicited accumulation of cyclic AMP in brain slices and of brain phosphodiesterase activity. *Life Sci* 24: 2475-2481.
96. **Stastny P** (1978): Association of the B-cell alloantigen DRw4 with rheumatoid arthritis. *N Engl J Med* 298: 869-871.
97. **Sugawara I, Yamada H, Kaneko H, Mizuno S, Takeda K, Akira S** (1999): Role of Interleukin 18 (IL-18) in mycobacterial infection in IL-18-gene-disrupted mice. *Infection and Immunity* 67: 2585-2589.
98. **Sugiyama M, Tsukazaki T, Yonekura A** (1996): Localisation of apoptosis and gene expression of apoptosis related proteins in the synovium of patients with rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 55: 442-449.
99. **Takeda K, Tsutsui H, Yoshimoto T, Adachi O, Yoshida N, Kishimoto T, Okamura H, Nakanishi K, Akira S** (1998): defective NK cell activity and Th1 responses in IL-18-deficient mice. *Immunity* 8: 383-390.
100. **Trabandt A, Aicher WK, Gay RE** (1990): Expression of the collagenolytic and ras-induced cysteine protease cathepsin L and proliferation-associated oncogenes in synovial cells of MRL/1 mice and patients with rheumatoid arthritis. *Matrix* 10: 349-361.
101. **Trabandt A, Gay RE, Gay S** (1992): Oncogene activation in rheumatoid synovium. *APMIS* 100: 861-875.

102. **Tsuboi M, Eguchi K, Kawakami A** (1996): Fas antigen expression on synovial cells was down-regulated by interleukin-1 β . *Biochem Biophys Res Commun* 218: 280-285.
103. **Ushio S, Namba M, Okura T, Hattori K, Nukada Y, Akita K, Tanabe F, Konishi K, Micallef M, Fujii M, Torigoe K, Tanimoto T, Fukuda S, Ikeda M, Okamura H, Kurimoto M** (1996): Cloning of the cDNA for human interferon- γ -inducing factor, expression in *Escherichia coli*, and studies on the biologic activities of the protein. *J Immunol* 156: 4274-4279.
104. **Vanhoutte P, Barnier JV, Guibert B, Pages C, Besson MJ, Hipkind RA, Caboche J** (1999): Glutamate induces phosphorylation of Elk-1 and CREB, along with c-fos activation, via an extracellular signal-regulated kinase-dependent pathway in brain slices. *Mol Cell Biol* 19: 136-146.
105. **Walker CM, Moody DJ, Stites DP, Levy JA** (1986): CD8⁺ lymphocytes can control HIV infection in vitro by suppressing virus replication. *Science* 234: 1563-1566.
106. **Wei XQ, Leung BP, Niedbala W, Piedrafita D, Feng GJ, Sweet M, Dobbie L, Smith AJH, Liew FY** (1999): Altered immune responses and susceptibility to *Leishmania major* and *Staphylococcus aureus* infection in IL-18-deficient mice. *J Immunol* 163: 2821-2828.
107. **Weyand CM, Goronzy JJ** (1997): Pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Med Clin North Am* 81: 29-55.
108. **Wöfl S, Martinez C, Majzoub JA** (1999): Inducible binding of cyclic adenosine 3',5'-monophosphate (cAMP)-response element binding protein (CREB) to a cAMP-responsive promoter in vivo. *Mol endocrinol* 13: 659-696.
109. **Wordsworth BP, Lanchbury JSS, Sakkas LI, Welsh KI, Panayi GS, Bell JI** (1989): HLA-DR4 subtype frequencies in rheumatoid arthritis indicate that DRB1 is the major susceptibility locus within the HLA class II region. *Proc Natl Acad Sci USA* 86: 10049-10053.
110. **Wu DM, Zhang Y, Parada NA, Kornfeld H, Nicoll J, Center DM, Cruikshank WW** (1999): Processing and release of IL-16 from CD4⁺ but not CD8⁺ T cells is activation dependent. *J Immunol* 162: 1287-1293.
111. **Wu X, McMurray CT** (2001): Calmodulin kinase II attenuation of gene transcription by preventing cAMP response element-binding protein (CREB) dimerization and binding of the CREB-binding protein. *J Biol Chem* 276: 1735-1741.
112. **Zeben D v, Hazes JMW, Zwinderman AH, Cats A, Voort EA v.d., Breedveld FC** (1992): Clinical significance of rheumatoid factors in early rheumatoid arthritis: results of a follow-up study. *Ann Rheum Dis* 51: 1029-1035.
113. **Zhang Y, Center DM, Wu DM, Cruikshank WW, Yuan JY, Andrews DW, Kornfeld H** (1998): Processing and activation of pro-Interleukin 16 by caspase-3. *J Biol Chem* 273: 1144-1149.

7 Anhang

7.1 Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
Abb.	Abbildung
ABTS	Substrat beim Cell Death Detection ELISA
ACR	American College of Rheumatology
AK	Antikörper
AS02	anti-Fibroblasten-Antikörper
B-(Lymphozyten) Lymphozyten	aus dem Knochenmark (bone marrow) stammende Lymphozyten
bcl	ein die Apoptose hemmendes Molekül
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
BSG	Blutkörperchensenkungsgeschwindigkeit
bzw.	beziehungsweise
CII	Collagen Typ II
ca.	circa
Ca ²⁺	Calcium
CamK	Calmodulinkinase
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
CD(n)	cluster of differentiation, aus n Immunglobulinomänen
cDNA	copy-Desoxiribonukleinsäure
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
cP	chronische Polyarthrit
CREB	cAMP Response Element Binding Protein
DAB	Diaminobenzidin
DEPC	Diethylpyrocarbonat
dest.	destilliert
d.h.	das heißt
DMEM	Dulbeccos modifiziertes Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxiribonukleinsäure
E	Extinktion
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
et al.	et alteri, und andere
EtBr	Ethidiumbromid
Fa.	Firma
FACS	fluorescence-activated cell sorter, Durchflußzytometrie
Fas/Apo-1	Apoptose-Rezeptor CD95
Fc	kristallisationsfähiges Fragment eines Antikörpers
FCS	fötales Kälberserum
Fors.	Forskolin
FRA	Patientenkürzel

g, mg, µg, ng, pg	Gramm, Milli-, Mikro-, Nano-, Pikogramm
G0, G1	Phasen des Zellzyklus
GABP	GA Binding Protein
G-Protein	guanylnukleotidbindendes Protein
GAPDH	Glycerinaldehydphosphatdehydrogenase
GITC	Guanidiniumthiocyanat
GM-CSF	granulocyte-macrophage colony-stimulating factor
h	Stunde(n)
hIL	humanes Interleukin
H ₂ O	Wasserstoffdioxid, Wasser
H7	H7-Dihydrochlorid
HIV	humanes Immunschwäche-Virus
HLA	humanes Lymphozyten-Antigen
HRP	Anti-hIL-16-Peroxidase (human IL-16 ELISA)
HTF	Patientenkürzel
HTP	Hüfttotalendoprothese
ICE	Interleukin-Konversionsenzym
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IGIF	Interferon-γ inducing factor
IL-x	Interleukin-(Nummer x)
IL-18R	Interleukin 18-Rezeptor
IL18BP	IL-18 bindendes Protein
iNOS	nitric oxide synthase
Iono	Ionomycin
IP ₃	Inositol-1,4,5-triphosphat
ITS	Insulin-Transferrin-Selen-Supplement
K.	Kontrolle
kDa	kiloDalton
Ki-M6	Antikörper gegen CD68
KNH	Patientenkürzel
Kontr.	Kontrolle/n
l, ml, µl	Liter, Milli-, Mikroliter
LC	LightCycler
LCF	lymphocyte chemoattractant factor
M.	Mykobakterium
M, mM, µM, nM	Mol, molar, Milli-, Mikro-, Nanomolar
MAS-7	Mastoparan-Analogon MAS-7
Mg ²⁺	Magnesium
MHC	major histocompatibility complex
MLCK	Myosinleichtkettenkinase
MMP	Matrixmetalloproteasen
mRNA	messenger RNA, Mittler-Ribonukleinsäure
MTP	Mikrotiterplatte
<i>myc</i>	ein Protoonkogen
n	Anzahl
Na ⁺	Natrium
Neg.	Negativ(kontrolle)

NHDF	Normal Human Dermal Fibroblasts
NK	natürliche Killerzellen
NTP	Nukleotidtriphosphat(e)
NO	Stickstoffmonoxid
O ₂	Sauerstoff
OA	Oxalacetic Acid
OD	optische Dichte
OTA	Patientenkürzel
p53	Suppressorgen
PBS ⁻	phosphatgepufferte Kochsalzlösung ohne Ca ²⁺ und Mg ²⁺
PCR	Polymerasekettenreaktion
pH	pH-Wert, negativer dekadischer Logarithmus der H ⁺ -Ionen-Konzentration
PK	Proteinkinase
PMA	Phorbolmyristataacetat
POD	Peroxidase
Pos.	Positiv(kontrolle)
PP1, 2A,..	Proteinphosphatase 1, 2A,..
PPasen	Proteinphosphatasen
RA	rheumatoide Arthritis
<i>ras</i>	ein Protoonkogen
RF	Rheumafaktor(en)
RNA	Ribonukleinsäure
RPE/ RW1	Puffer bei der RNA-Aufbereitung
RT	reverse Transkriptase
SCID	severe combined immune deficiency
SK	Subkultur
SLF	Patientenkürzel
SRF	Patientenkürzel
Stabwn	Standardabweichung
Stauro	Staurosporin
s.u.	siehe unten
Syn	synoviale Fibroblasten
T-	thymusabhängig
TAE	Trisaminomethan-Ethylendiamintetraacetat
TBE	Trisaminomethan-Borsäure-Ethylendiamintetraacetat
TdT	terminale Deoxynucleotidyl-Transferase
TGF	transforming growth factor
TMB	Tetramethylbenzidin
TNF	Tumornekrosefaktor
u.a.	unter anderem
UV	ultraviolett(es Licht betreffend)
V, kV	Volt, kiloVolt
v.a.	vor allem
Wesp.	Wespen Gift
z.B.	zum Beispiel
Z.n.	Zustand nach
z.T.	zum Teil

7.2 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1	Pathophysiologie der Fibroblasten bei rheumatoider Arthritis	5
Abb. 2a	Positivkontrolle der Färbung mit dem fibroblastenspezifischen Antikörper AS02	47
Abb. 2b	Negativkontrolle, d.h. Färbung ohne spezifischen Erstantikörper	47
Abb. 3a	Lichtmikroskopie von unbehandelten Hautfibroblasten	48
Abb. 3b	Lichtmikroskopie nach 24 h Inkubation mit MAS-7, 10 μ M	48
Abb. 3c	Lichtmikroskopie nach 24 h Inkubation mit MAS-7, 30 μ M	48
Abb. 3d	Lichtmikroskopie nach 24 h Inkubation mit MAS-7, 70 μ M	48
Abb. 4	Graphik der IL-16-Induktion nach Titration mit MAS-7	49
Abb. 5	Graphik der IL-16-Induktion nach Titration mit Staurosporin	51
Abb. 6	Graphik der IL-18-Induktion nach Titration mit Staurosporin	52
Abb. 7	Hautfibroblasten: Graphik der IL-16-Induktion nach 24 h Inkubation mit MAS-7	54
Abb. 8	Hautfibroblasten: Graphik der IL-16-Induktion nach 24 h Inkubation mit Wespengift	55
Abb. 9a	Hautfibroblasten: Lichtmikroskopie nach 24 h Inkubation mit OA	56
Abb. 9b	Hautfibroblasten: Graphik der IL-16-Induktion nach 24 h Inkubation mit OA	56
Abb. 10	Hautfibroblasten: Graphik der IL-16-Induktion nach 24 h Inkubation mit Ionomycin	57
Abb. 11	Hautfibroblasten: Graphik der IL-16-Induktion nach 24 h Inkubation mit cAMP	58
Abb. 12	Hautfibroblasten: Graphik der IL-16-Induktion nach 24 h Inkubation mit Forskolin	59
Abb. 13	Hautfibroblasten: Graphik der IL-16-Induktion nach 24 h Inkubation mit Stauro	60
Abb. 14	Hautfibroblasten: Graphik der IL-16-Induktion nach 24 h Inkubation mit PMA	61
Abb. 15a	Hautfibroblasten: Lichtmikroskopie nach 24 h Inkubation mit H7	62
Abb. 15b	Hautfibroblasten: Graphik der IL-16-Induktion nach 24 h Inkubation mit H7	63
Abb. 16	Hautfibroblasten: Geldarstellung nach 24 h Inkubation mit diversen Chemikalien (IL-16)	64
Abb. 17	Neonatale Hautfibroblasten: Graphik der IL-16-Induktion nach 24 h Inkubation mit diversen Chemikalien	65

Fortsetzung Abbildungsverzeichnis:

Abb. 18	Synoviale Fibroblasten: Graphik der IL-16-Induktion nach 24 h Inkubation mit diversen Chemikalien	68
Abb. 19	Hautfibroblasten: Graphik der IL-16-Induktion nach Inkubation mit Stauro über maximal 48 h	70
Abb. 20	Hautfibroblasten: Geldarstellung nach Inkubation mit Stauro über maximal 48 h (IL-16)	71
Abb. 21	Neonatale Hautfibroblasten: Graphik der IL-16-Induktion nach Inkubation mit Stauro über maximal 48 h	73
Abb. 22	Hautfibroblasten: Graphik der IL-16-Induktion nach Inkubation mit MAS-7 über maximal 48 h	75
Abb. 23	Hautfibroblasten: Geldarstellung nach Inkubation mit MAS-7 über maximal 48 h (IL-16)	76
Abb. 24	Adulte Hautfibroblasten: Graphik der IL-16-Induktion nach Inkubation mit MAS-7 über maximal 48 h	77
Abb. 25	Synoviale Fibroblasten: Graphik der IL-16-Induktion nach Inkubation mit Stauro über maximal 48 h	79
Abb. 26	Hautfibroblasten: Graphik der IL-18-Induktion nach 24 h Inkubation mit diversen Chemikalien	81
Abb. 27	Hautfibroblasten: Geldarstellung nach 24 h Inkubation mit diversen Chemikalien (IL-18)	82
Abb. 28	Neonatale Hautfibroblasten: Graphik der IL-18-Induktion nach 24 h Inkubation mit diversen Chemikalien	83
Abb. 29	Synoviale Fibroblasten: Graphik der IL-18-Induktion nach 24 h Inkubation mit diversen Chemikalien	85
Abb. 30	Neonatale Hautfibroblasten: Graphik der IL-18-Induktion nach Inkubation mit Stauro über maximal 48 h	87
Abb. 31	Neonatale Hautfibroblasten: Geldarstellung nach Inkubation mit Stauro über maximal 48 h (IL-18)	88
Abb. 32	Hautfibroblasten: Graphik der IL-18-Induktion nach Inkubation mit MAS-7 über maximal 48 h	90
Abb. 33a	Graphik der Staurosporin-induzierten Apoptose an Hautfibroblasten	92
Abb. 33b	Graphik der Staurosporin-induzierten Nekrose an Hautfibroblasten	93
Abb. 34a	ApopDetect Plus Peroxidase Assay: Negativkontrolle	94
Abb. 34b	ApopDetect Plus Peroxidase Assay: Stauro 100 nM	95
Abb. 34c	ApopDetect Plus Peroxidase Assay: Stauro 500 nM	95
Abb. 35	Therapeutische Steuerungsmöglichkeiten der Interleukin 16-Transkription	131

7.3 Tabellenverzeichnis

Tab. 1	Mittelwerte und Standardabweichungen der „crossing points“ bei der Titration mit MAS-7 (IL-16)	49
Tab. 2	Mittelwerte und Standardabweichungen der „crossing points“ bei der Titration mit Staurosporin (IL-16)	51
Tab. 3	Mittelwerte und Standardabweichungen der „crossing points“ nach 24 h Inkubation mit Wespengift bei Hautfibroblasten (IL-16)	55
Tab. 4	Mittelwerte und Standardabweichungen der „crossing points“ nach 24 h Inkubation mit Ocadaic Acid bei Hautfibroblasten (IL-16)	57
Tab. 5	Mittelwerte und Standardabweichungen der „crossing points“ nach 24 h Inkubation mit Forskolin bei Hautfibroblasten (IL-16)	59
Tab. 6	Mittelwerte und Standardabweichungen der „crossing points“ nach 24 h Inkubation mit Staurosporin bei Hautfibroblasten (IL-16)	60
Tab. 7	Mittelwerte und Standardabweichungen der „crossing points“ nach 24 h Inkubation mit PMA bei Hautfibroblasten (IL-16)	61
Tab. 8	Mittelwerte und Standardabweichungen der „crossing points“ nach 24 h Inkubation mit H7 bei Hautfibroblasten (IL-16)	63
Tab. 9	Mittelwerte und Standardabweichungen der „crossing points“ nach 24 h Inkubation mit diversen Chemikalien bei neonatalen Hautfibroblasten (IL-16)	66
Tab. 10	Mittelwerte und Standardabweichungen der „crossing points“ nach 24 h Inkubation mit diversen Chemikalien bei synovialen Fibroblasten (IL-16)	69
Tab. 11	Mittelwerte und Standardabweichungen der „crossing points“ nach Inkubation mit Staurosporin über maximal 48 h bei Hautfibroblasten (IL-16)	71
Tab. 12	Mittelwerte und Standardabweichungen der „crossing points“ nach Inkubation mit Stauro über maximal 48 h bei neonatalen Hautfibroblasten (IL-16)	73
Tab. 13	Mittelwerte und Standardabweichungen der „crossing points“ nach Inkubation mit MAS-7 über maximal 48 h bei Hautfibroblasten (IL-16)	75
Tab. 14	Mittelwerte und Standardabweichungen der „crossing points“ nach Inkubation mit MAS-7 über maximal 48 h bei adulten Hautfibroblasten (IL-16)	77
Tab. 15	Mittelwerte und Standardabweichungen der „crossing points“ nach Inkubation mit MAS-7 über maximal 48 h bei synovialen Fibroblasten (IL-16)	79

Fortsetzung Tabellenverzeichnis:

Tab. 16	Mittelwerte u. Standardabweichungen der „crossing points“ nach 24 h Inkubation mit diversen Chemikalien bei Hautfibroblasten (IL-18)	81
Tab. 17	Mittelwerte und Standardabweichungen der „crossing points“ nach 24 h Inkubation mit diversen Chemikalien bei synovialen Fibroblasten (IL-18)	85
Tab. 18	Mittelwerte und Standardabweichungen der „crossing points“ nach Inkubation mit Stauro über maximal 48 h bei neonatalen Hautfibroblasten (IL-18)	87
Tab. 19	Zusammenfassung der Ergebnisse nach 24 h Inkubation mit diversen Chemikalien für IL-16 und IL-18	109
Tab. 20a	Zusammenfassung der Ergebnisse nach Inkubation mit Stauro über maximal 48 h für IL-16 und IL-18	110
Tab. 20b	Zusammenfassung der Ergebnisse nach Inkubation mit MAS-7 über maximal 48 h für IL-16 und IL-18	110
Tab. 21a	Statistische Auswertung: Mehrfachinduktion der nativen dermalen Fibroblasten	152
Tab. 21b	Statistische Auswertung: Mehrfachinduktion neonataler dermalen Fibroblasten	153
Tab. 21c	Statistische Auswertung: Mehrfachinduktion der synovialen Fibroblasten	154
Tab. 22	Statistische Auswertung: Staurosporin-Zeitverläufe	155
Tab. 23	Statistische Auswertung: MAS-7-Zeitverläufe	156

7.4. Ergebnistabellen der statistischen Auswertung

Tabelle 21a.: Mehrfachinduktion der nativen Hautfibroblasten

Patientenkürzel	eingesetzte Pharmaka												
	Kontrolle	MAS-7	OA	Iono	cAMP	Forskolin	Stauro	PMA	H7	Wespengift			
SRF													
<u>GAPDH</u>													
Mittelwerte:	14,537	14,507	14,183	14,633	14,147	14,033	14,237	14,130	13,943	14,870			
Stabwn:	0,719	0,713	0,685	0,868	0,811	0,760	0,785	0,732	0,778	0,769			
IL-16													
Mittelwerte:	28,450	27,870	31,163	28,447	28,410	28,207	27,443	29,530	30,953	29,440			
Stabwn:	0,559	0,559	1,143	0,488	0,601	0,538	0,539	0,552	0,601	0,545			
FRAU													
Kontrolle	Kontrolle	MAS-7	OA	Iono	cAMP	Forskolin	Stauro	PMA	H7	Wespengift			
GAPDH													
Mittelwerte:	13,330	13,155	13,470	13,510	13,230	13,185	13,180	13,295	13,175	13,595			
Stabwn:	0,330	0,295	0,350	0,320	0,340	0,155	0,270	0,265	0,255	0,265			
IL-16													
Mittelwerte:	28,265	28,330	30,970	28,755	27,995	27,395	27,870	28,830	32,010	29,290			
Stabwn:	0,205	0,100	0,330	0,035	0,015	0,145	0,270	0,180	0,380	0,140			
IL-18													
(nur 1 Lauf)	29,900	29,980	31,220	29,930	30,940	32,050	30,620	30,120	31,520	30,380			
KNH													
Kontrolle	Kontrolle	MAS-7	OA	Iono	cAMP	Forskolin	Stauro	PMA	H7	Wespengift			
GAPDH													
Mittelwerte:	13,498	13,478	13,480	13,813	13,410	13,778	13,355	13,648	13,508	13,703			
Stabwn:	0,961	0,962	0,830	1,033	0,933	0,853	0,954	0,873	0,912	0,877			
IL-16													
Mittelwerte:	28,62	28,64	30,285	29,18	28,005	26,465	27,17	29,37	32,95	28,365			
Stabwn:	0,320	0,520	0,355	0,280	0,315	0,375	0,430	0,330	0,040	0,385			
IL-18													
Mittelwerte:	27,990	28,245	28,260	27,750	28,245	30,125	29,870	27,970	32,615	28,025			
Stabwn:	0,060	0,065	0,170	0,030	0,145	0,235	0,370	0,080	0,295	0,045			

Fortsetzung Tabelle 21a.:

Patientenkürzel	eingesetzte Pharmaka											
	Kontrolle	MAS-7	OA	Iono	cAMP	Forskolin	Stauro	PMA	H7	Wespengift		
<u>GAPDH</u>												
Mittelwerte:	13,720	13,730	13,990	13,783	13,027	13,557	13,480	13,777	13,787	13,670		
Stabwn:	0,435	0,373	0,299	0,316	0,331	0,298	0,324	0,332	0,316	0,321		
<u>IL-16</u>												
Mittelwerte:	27,387	27,367	30,493	27,607	26,380	25,683	27,047	28,167	31,683	27,853		
Stabwn:	0,271	0,229	0,573	0,265	0,151	0,258	0,249	0,297	0,885	0,371		

Tabelle 21b.: Mehrfachinduktion neonataler Fibroblasten

Patientenkürzel	eingesetzte Pharmaka											
	Kontrolle	MAS-7	OA	Iono	cAMP	Forskolin	Stauro	PMA	H7	Wespengift		
<u>NHDF 6499</u>												
<u>GAPDH</u>												
Mittelwerte:	14,796	15,110	14,712	15,030	14,404	14,640	14,666	14,704	Ø	14,768		
Stabwn:	0,899	0,945	0,841	0,903	0,835	0,653	0,813	0,747		0,713		
<u>IL-16</u>												
Mittelwerte:	28,223	28,617	30,007	28,907	27,900	28,570	27,673	30,550	Ø	29,220		
Stabwn:	0,872	0,897	0,949	0,865	0,880	0,882	0,947	0,832		0,987		
<u>IL-18</u>												
Mittelwerte:	26,525	26,845	26,230	26,515	25,970	27,820	26,690	25,060	Ø	25,595		
Stabwn:	0,435	0,395	0,410	0,395	0,520	0,390	0,380	0,460		0,485		

Tabelle 21c: Mehrfachinduktion der synovialen Fibroblasten

Patientenkürzel	eingesetzte Pharmaka												
	Kontrolle	MAS-7	OA	Iono	cAMP	Forskolin	Stauro	PMA	H7	Wespengift			
SRF syn													
<u>GAPDH</u>													
Mittelwerte:	14,408	14,188	14,270	14,306	14,214	14,398	14,228	14,234	14,854	14,722			
Stabwn:	0,407	0,388	0,428	0,421	0,402	0,428	0,317	0,351	0,359	0,372			
<u>IL-16</u>													
Mittelwerte:	28,167	27,750	29,547	28,113	27,367	25,980	27,160	27,253	31,700	28,877			
Stabwn:	0,690	0,653	0,787	0,587	0,649	0,616	0,629	0,511	0,551	0,560			
<u>IL-18</u>													
Mittelwerte:	24,975	25,085	25,020	24,580	25,455	26,640	26,525	25,290	29,010	25,420			
Stabwn:	0,105	0,085	0,080	0,100	0,015	0,160	0,085	0,190	0,050	0,180			
SLF syn	Kontrolle	MAS-7	OA	Iono	cAMP	Forskolin	Stauro	PMA	H7	Wespengift			
<u>GAPDH</u>													
Mittelwerte:	14,763	14,925	Ø *	15,313	14,490	14,515	14,303	14,455	14,383	14,955			
Stabwn:	0,767	0,909		0,877	0,778	0,804	0,854	0,713	0,865	0,867			
<u>IL-16</u>													
Mittelwerte:	29,260	28,937	Ø	29,407	28,930	26,620	28,820	29,753	31,383	28,253			
Stabwn:	0,217	0,473		0,243	0,366	0,287	0,226	0,443	0,439	0,210			
<u>IL-18</u>													
(nur 1 Lauf)	29,900	29,740	Ø	29,550	29,690	31,690	30,700	30,790	32,890	29,370			

Tabella 22: Staurosporin-Zeitverläufe

Patientenkürzel	6 h Kontrolle	6 h Stauro	12 h Kontrolle	12 h Stauro	24 h Kontrolle	24 h Stauro	48 h Kontrolle	48 h Stauro
OTA								
GAPDH								
Mittelwerte:	14,150	14,730	14,620	14,675	14,435	14,815	15,255	15,190
Stabwn:	0,060	0,020	0,080	0,025	0,005	0,085	0,025	0,040
IL-16								
Mittelwerte:	29,455	29,860	29,515	27,915	28,900	28,105	27,890	26,165
Stabwn:	0,095	0	0,215	0,125	0,040	0,035	0	0,125
KNH	6 h Kontrolle	6 h Stauro	12 h Kontrolle	12 h Stauro	24 h Kontrolle	24 h Stauro	48 h Kontrolle	48 h Stauro
GAPDH								
Mittelwerte:	14,627	14,640	14,413	14,397	14,590	14,483	15,577	15,377
Stabwn:	0,332	0,366	0,374	0,338	0,319	0,257	0,236	0,330
IL-16								
Mittelwerte:	29,700	28,945	30,180	28,295	29,525	27,845	29,275	27,855
Stabwn:	0,200	0,115	0,040	0,105	0,125	0,235	0,405	0,075
IL-18								
(nur 1 Lauf)	28,660	30,010	29,300	29,540	28,350	30,530	28,140	31,520
NHDF 6381	6 h Kontrolle	6 h Stauro	12 h Kontrolle	12 h Stauro	24 h Kontrolle	24 h Stauro	48 h Kontrolle	48 h Stauro
GAPDH								
Mittelwerte:	15,097	14,700	14,743	14,827	14,990	14,550	15,357	15,050
Stabwn:	0,411	0,318	0,474	0,349	0,324	0,304	0,381	0,492
IL-16								
Mittelwerte:	32,110	31,455	31,220	30,665	31,335	29,920	30,270	27,995
Stabwn:	0,550	0,695	0,690	0,575	0,455	0,680	0,730	0,615
IL-18								
(nur 1 Lauf)	23,650	23,880	23,210	24,790	23,300	24,290	24,160	25,670

Fortsetzung Tabelle 22:

Patientenkürzel	6 h Kontrolle	6 h Stauro	12 h Kontrolle	12 h Stauro	24 h Kontrolle	24 h Stauro	48 h Kontrolle	48 h Stauro
NHDF 6455								
<u>GAPDH</u>								
Mittelwerte:	14,120	13,980	14,207	14,243	14,593	14,420	15,320	14,633
Stabwn:	0,527	0,545	0,522	0,622	0,660	0,507	0,602	0,669
<u>IL-16</u>								
Mittelwerte:	30,847	28,847	29,513	28,643	30,297	28,757	30,333	28,387
Stabwn:	1,480	1,169	1,243	1,004	1,278	0,967	1,267	1,067
<u>IL-18</u> (nur 1 Lauf)	25,440	26,200	25,220	26,760	24,420	26,790	25,100	27,160

Tabelle 23: MAS-7-Zeitverläufe

Patientenkürzel	6 h Kontrolle	6 h MAS-7	12 h Kontrolle	12 h MAS-7	24 h Kontrolle	24 h MAS-7	48 h Kontrolle	48 h MAS-7
OTA								
<u>GAPDH</u>								
Mittelwerte:	14,157	14,643	14,403	14,290	14,483	14,590	15,283	14,867
Stabwn:	0,425	0,419	0,408	0,411	0,367	0,397	0,486	0,464
<u>IL-16</u>								
Mittelwerte:	29,360	29,080	28,940	29,505	28,795	29,425	27,800	28,080
Stabwn:	0,310	0,310	0,200	0,245	0,235	0,315	0,340	0,250
<u>IL-18</u> (nur 1 Lauf)	31,940	32,190	31,300	31,660	30,790	30,530	30,890	31,380

Fortsetzung Tabelle 23:

Patientenkürzel	6 h Kontrolle	6 h MAS-7	12 h Kontrolle	12 h MAS-7	24 h Kontrolle	24 h MAS-7	48 h Kontrolle	48 h MAS-7
KNH								
<u>GAPDH</u>								
Mittelwerte:	14,393	14,423	14,407	14,297	14,770	14,437	15,535	15,340
Stabwn:	0,323	0,371	0,249	0,491	0,176	0,386	0,304	0,307
<u>IL-16</u>								
Mittelwerte:	29,985	30,535	30,005	30,160	29,780	29,810	29,480	29,130
Stabwn:	0,025	0,355	0,085	0,270	0,020	0,180	0,130	0,130
<u>IL-18</u> (nur 1 Lauf)	28,000	28,260	28,220	27,880	27,220	27,290	27,190	27,240
HTF	6 h Kontrolle	6 h MAS-7	12 h Kontrolle	12 h MAS-7	24 h Kontrolle	24 h MAS-7	48 h Kontrolle	48 h MAS-7
<u>GAPDH</u>								
Mittelwerte:	14,615	14,630	14,885	14,920	14,528	14,878	14,903	14,553
Stabwn:	0,211	0,218	0,129	0,163	0,373	0,138	0,255	0,206
<u>IL-16</u>								
Mittelwerte:	30,280	29,790	29,640	30,465	29,155	30,415	28,845	29,680
Stabwn:	0,310	0,370	0,230	0,225	0,035	0,305	0,115	0,270
<u>IL-18</u>								
Mittelwerte:	27,425	27,540	27,650	27,675	26,370	27,400	26,795	27,355
Stabwn:	0,435	0,380	0,640	0,345	0,520	0,360	0,405	0,525
NHDF adult	6 h Kontrolle	6 h MAS-7	12 h Kontrolle	12 h MAS-7	24 h Kontrolle	24 h MAS-7	48 h Kontrolle	48 h MAS-7
<u>GAPDH</u>								
Mittelwerte:	15,173	15,390	14,483	14,697	14,280	14,480	14,467	14,480
Stabwn:	0,158	0,326	0,379	0,313	0,289	0,373	0,318	0,283
<u>IL-16</u>								
Mittelwerte:	28,265	28,085	30,090	29,720	29,245	27,815	27,545	26,970
Stabwn:	0,275	0,255	0,280	0,200	0,365	0,135	0,275	0,210
<u>IL-18</u> (nur 1 Lauf)	30,150	30,080	30,970	31,830	30,170	31,260	30,960	31,600

Fortsetzung Tabelle 23:

Patientenkürzel	6 h Kontrolle	6 h MAS-7	12 h Kontrolle	12 h MAS-7	24 h Kontrolle	24 h MAS-7	48 h Kontrolle	48 h MAS-7
NHDF 6381								
<u>GAPDH</u>								
Mittelwerte:	14,750	14,373	14,350	14,440	14,528	14,278	14,915	14,700
Stabwn:	0,812	0,790	0,674	0,741	0,648	0,666	0,654	0,787
<u>IL-16</u>								
Mittelwerte:	32,187	32,167	30,860	31,853	31,317	31,230	30,247	30,360
Stabwn:	0,547	0,314	0,216	0,215	0,314	0,224	0,040	0,173
<u>IL-18</u> (nur 1 Lauf)								
	25,630	25,540	25,100	25,740	25,030	25,090	26,210	26,370
NHDF 6455	6 h Kontrolle	6 h MAS-7	12 h Kontrolle	12 h MAS-7	24 h Kontrolle	24 h MAS-7	48 h Kontrolle	48 h MAS-7
<u>GAPDH</u>								
Mittelwerte:	13,085	13,175	12,895	12,955	13,150	13,050	13,630	13,360
Stabwn:	0,005	0,095	0,035	0,095	0,120	0,050	0,040	0,050
<u>IL-16</u>								
Mittelwerte:	31,385	30,905	31,040	31,040	31,445	31,515	31,255	31,370
Stabwn:	0,735	0,735	0,730	0,480	0,775	0,485	0,595	0,630
HTF syn	6 h Kontrolle	6 h MAS-7	12 h Kontrolle	12 h MAS-7	24 h Kontrolle	24 h MAS-7	48 h Kontrolle	48 h MAS-7
<u>GAPDH</u>								
Mittelwerte:	13,995	14,000	13,630	13,825	13,660	13,920	13,975	13,840
Stabwn:	0,335	0,340	0,340	0,315	0,450	0,410	0,365	0,360
<u>IL-16</u>								
Mittelwerte:	29,070	28,605	27,935	27,465	29,090	28,065	29,870	28,330
Stabwn:	0,110	0,405	0,145	0,245	0,100	0,195	0,270	0,290

* nicht untersucht

Legende:

Mittelwerte: angegeben sind die Mittelwerte der Crossing Points aus den jeweils 2 – 3 LightCycler-Läufen
 Stabwn: berechnet ist die Standardabweichung aus den 2 – 3 LightCycler-Läufen

7.5 Publikationsliste

Teile meiner Arbeit sind oder werden unter folgenden Titeln veröffentlicht:

Abstracts und Posters:

Schützle H, Weis-Klemm M, Gay RE, Gay S, Aicher WK (2001): Protein kinase inhibition enhances steady state mRNA levels encoding IL-16 but reduces IL-18 encoding message levels in fibroblasts.

Annual European Congress of Rheumatology EULAR 2001 in Prag

Weis-Klemm M, Alexander D, Schützle H, Gay S, Aicher WK (2002): Rheumatoid arthritis synovial fibroblasts (RA-SF) differ in the IL-16 induction pathway when compared to control fibroblasts.

Annual European Congress of Rheumatology EULAR 2002 in Stockholm

Weis-Klemm M, Alexander D, Schützle H, Aicher WK (2002): Signals regulating IL-16 and IL-18 transcript amounts in synovial fibroblasts from rheumatoid arthritis patients.

FOCIS Congress 2002 in San Francisco

Originalarbeiten in referierten Journalen:

Schuler MK, Schützle H, Franz JK, Pap T, Weis-Klemm M, Sell S, Gay S, Aicher WK (2001): Staurosporine activates IL-16 encoding transcripts in synovial fibroblasts of rheumatoid arthritis patients.

Publikation in Vorbereitung.

7.6 Danksagung

Mein herzlicher Dank gilt Herrn Priv.Doiz. Dr. W.K. Aicher für die fachkundige und umfassende Betreuung meiner Doktorarbeit. Auch für die Beratung und Hilfestellung in inhaltlichen und organisatorischen Fragen sowie die Mithilfe bei der Ausarbeitung des Posters für den EULAR- Kongress 2001 in Prag danke ich Herrn Privatdozent Dr. Aicher.

Herrn Professor Dr. J. Giehl danke ich für die Realisierung des Projektes, indem die finanziellen Rahmenbedingungen sowie der Arbeitsplatz im Forschungslabor gewährleistet waren.

Frau M. Weis-Klemm und Frau D. Alexander danke ich für die hervorragende technische Einarbeitung und Betreuung sowie für die freundliche Aufnahme im Laborteam.

Mein Dank gilt auch allen operierenden Ärzten der Orthopädischen Universitätsklinik Tübingen für die Entnahme und Bereitstellung von Gewebeproben.

Danken möchte ich ebenso meinen Eltern, die stets Interesse an meiner Arbeit zeigten und mir zu jeder Zeit unterstützend zur Seite standen.

Auch meinem Bruder, meinen Freunden und Bekannten, die sich an der Diskussion rund um die Arbeit beteiligt haben möchte ich danken.

Mein Dank gilt in besonderem Maße Stephan und Jojo, die sich mit großer Geduld meiner computertechnischen Probleme angenommen haben.

7.7 Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name	Heike Schützle
Geburtsdatum	10. Oktober 1975
Geburtsort	Esslingen
Staatsangehörigkeit	deutsch
Familienstand	ledig
Eltern	Dr.-Ing. Rainer Schützle Gisela Schützle, geb. Hopfenzitz
Geschwister	Jörg Schützle geb. 25.03.1977

Schulbildung:

1982 – 1986	Ludwig-Uhland-Grundschule, Leinfelden-Echterdingen
1986 – 1995	Immanuel-Kant-Gymnasium, Leinfelden-Echterdingen Abitur Juni 1995

Studium:

ab April 1996	Studium der Humanmedizin, Eberhard-Karls-Universität, Tübingen
März 1998	Ärztliche Vorprüfung
März 1999	1. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
September 2000	Beginn der Dissertation in der Orthopädischen Klinik der Universität Tübingen unter Leitung von Herrn Privat- dozent Dr. Aicher
April 2002	2. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
April 02 – März 03	Praktisches Jahr
28. Mai 2003	3. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung