

Aus der Klinik für Innere Medizin mit Schwerpunkt
Nephrologie und Internistische Intensivmedizin
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Einfluss von C-reaktivem Protein und Pentraxin 3
auf die Kalzifikation glatter Muskelzellen und Zytokinproduktion
von Monozyten im Prozess der Arteriosklerose

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Daniel Zickler
aus Kiel

Gutachter/in: 1. Prof. Dr. med. R. Schindler
 2. Prof. Dr. med. M. van der Giet
 3. Prof. Dr. med. T.B. Drüeke

Datum der Promotion: 19.11.2010

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG	1
1.1	ERHÖHTE KARDIOVASKULÄRE MORTALITÄT BEI PATIENTEN MIT CHRONISCHER NIERENINSUFFIZIENZ...	1
1.2	URSACHEN DER ERHÖHTEN KARDIOVASKULÄREN MORTALITÄT IN CNI-PATIENTEN.....	2
1.3	VASKULÄRE KALZIFIKATION.....	3
1.3.1	<i>Pathogenese</i>	5
1.3.2	<i>Inhibitoren der vaskulären Kalzifikation</i>	6
1.3.3	<i>Induktion der vaskulären Kalzifikation</i>	9
1.3.4	<i>Diagnostik und Quantifizierung der vaskulären Kalzifikation</i>	13
1.4	INFLAMMATION	14
1.4.1	CRP	16
1.4.2	<i>Klinischer Gebrauch des CRP</i>	17
1.4.3	<i>Pentraxin 3 (PTX 3)</i>	17
1.4.4	<i>Rolle der Inflammation in Atherosklerose</i>	19
1.4.5	<i>Inflammation in CNI-Patienten</i>	21
1.5	INFLAMMATION UND VASKULÄRE VERKALKUNG	23
1.5.1	<i>Korrelation Inflammationsmarker und kardiovaskuläres Risiko</i>	23
1.6	CRP IM AKUTEN MYOKARDINFARKT.....	26
2	FRAGESTELLUNG	29
3	MATERIAL	30
3.1	GERÄTE	30
3.2	CHEMIKALIEN	30
3.3	MATERIALIEN.....	32
3.4	PUFFER UND LÖSUNGEN.....	33
4	METHODEN	34
4.1	ISOLATION DER GLATTEN MUSKELZELLEN	34
4.2	INKUBATION VSMC	35
4.2.1	<i>Anfertigung eines Kalzifikationsmediums</i>	35
4.3	KALZIUMMESSUNG.....	35
4.4	PROTEINMESSUNG	36
4.5	VON KOSSA FÄRBUNG	36
4.6	LDH-MESSUNG IN ÜBERSTÄNDEN.....	37
4.7	INKUBATION VSMC MIT PTX3 UND CRP ZUR RNA-MESSUNG	38
4.8	RNA-ISOLATION	38
4.9	REVERSE TRANSKRIPTION	39
4.10	PCR UND DETEKTION.....	40
4.11	AGAROSEGEL ELEKTROPHORESE.....	41
4.12	BLOTTEN.....	42

4.13	DETEKTION	42
4.14	MONOZYTENISOLATION.....	43
4.15	MONOZYTENSTIMULATION.....	44
4.16	ELISA.....	45
4.17	ENDOTOXINMESSUNG	46
4.18	STATISTIK	46
5	ERGEBNISSE	47
5.1	KALZIUMKONZENTRATIONEN.....	47
5.2	VON KOSSA FÄRBUNG	52
5.3	LDH	54
5.4	EXPRESSION MGP	56
5.5	MONOZYTENSTIMULATION MIT CRP.....	58
5.6	MONOZYTENSTIMULATION MIT PTX 3	61
5.7	MONOZYTENSTIMULATION MIT LPS	62
5.8	ENDOTOXINMESSUNG	62
6	DISKUSSION	64
6.1	CRP UND PTX 3 VERSTÄRKEN VASKULÄRE KALZIFIKATION.....	64
6.2	MECHANISMEN	66
6.3	INTERLEUKINPRODUKTION VON MONOZYTEN.....	68
6.4	DISKUSSION DER METHODIK:	71
7	ZUSAMMENFASSUNG	79
8	ABKÜRZUNGEN.....	82
9	LITERATURVERZEICHNIS.....	83
10	LEBENS LAUF.....	88
11	PUBLIKATIONEN.....	89
	EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG	90

1 Einleitung

1.1 Erhöhte kardiovaskuläre Mortalität bei Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz

Trotz einer rapiden Verbesserung der Dialysetechnologie in den letzten 20 Jahren ist die Mortalitätsrate von Patienten, die an chronischer Niereninsuffizienz (CNI) leiden, immer noch sehr hoch. Sie ist vergleichbar mit der Mortalitätsrate von Patienten, die an metastasierten Tumorerkrankungen leiden.

Der Hauptgrund dieser hohen Mortalität sind kardiovaskuläre Erkrankungen mit einer jährlichen Mortalität von 9%. Damit tragen CNI-Patienten ein gegenüber der Gesamtpopulation 10-20fach erhöhtes Risiko, selbst wenn Faktoren wie Alter, Geschlecht, Rasse und die Präsenz eines Diabetes mellitus berücksichtigt werden. [1] Kardiovaskuläre Ereignisse sind damit ursächlich für 40-50% der Todesfälle der CNI Patienten. [2] Diese hohe kardiovaskuläre Mortalitätsrate legt nahe, dass CNI-Patienten Faktoren und Risiken unterliegen, die in den Prozess der Gefäßsklerose eingreifen und sie aggravieren. Die daraus resultierenden kardiovaskulären Erkrankungen der Patienten entwickeln sich nicht plötzlich mit Beginn der Dialysepflichtigkeit, sondern beginnen schon in der frühen Phase der chronischen Nierenerkrankung bevor die Nierenersatztherapie überhaupt notwendig wird. Die kardiovaskulären Erkrankungen schreiten dann mit Zunahme der CNI voran. Daraus kann man schließen, dass die Dialyse nur als ein möglicher kausaler Faktor unter vielen für das erhöhte kardiovaskuläre Risiko in Frage kommt. Vielmehr ist die Gefäßsklerose als ein multifaktorielles Geschehen anzusehen, das in CNI-Patienten eine besonders starke Ausprägung zeigt.

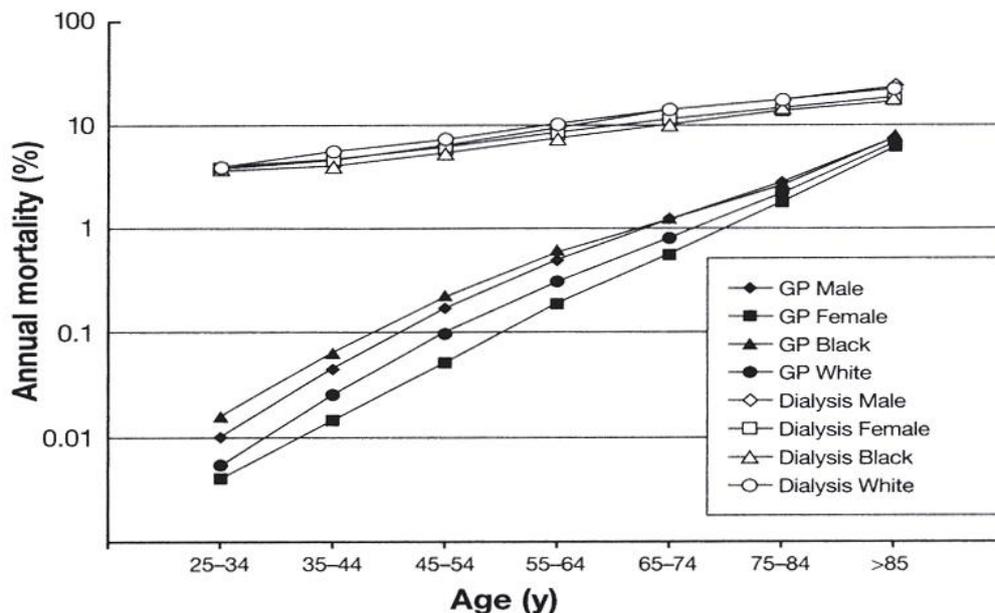


Abb. 1.1.: Mortalität von Dialysepatienten im Vergleich zur Normalbevölkerung, Foley et alera

1.2 Ursachen der erhöhten kardiovaskulären Mortalität in CNI-Patienten

Ursache der erhöhten kardiovaskulären Mortalität in CNI-Patienten ist die Gefäßsklerose. Hierbei müssen zwei verschiedene Entitäten unterschieden werden. Einerseits gibt es die Atherosklerose, unter der die gesamte Bevölkerung, und damit auch CNI-Patienten, mit zunehmendem Alter leidet. Diese wird insbesondere durch das Vorhandensein bestimmter Risikofaktoren (Alter, männliches Geschlecht, Diabetes, Dyslipidämie, Hypertonus, Adipositas und Nikotinabusus) begünstigt. Der Atherosklerose liegt als Hauptpathomechanismus der Prozess der Inflammation zugrunde. Er findet vor allem in der Gefäßintima innerhalb atherosklerotischer Plaques statt.

Als zweite Entität der Gefäßsklerose ist die Arteriosklerose zu nennen. Diese spielt sich hauptsächlich in der Media von Arterien ab. Entscheidender Pathomechanismus hierbei scheint die vaskuläre Kalzifikation zu sein. Die Arteriosklerose ist insbesondere in CNI-Patienten prävalent. So zeigten Moe und Mitarbeiter, dass in epigastrischen Arterien von Dialysepatienten, die zum Zeitpunkt der Nierentransplantation entnommen wurden, größtenteils Mediaverkalkungen ohne typische Phänomene atherosklerotischer Plaques gefunden wurden. [3] Auch die Autopsiestudie von Schwarz et al, die die Koronarien

von 27 Dialysepatienten mit 27 Kontrollpatienten verglichen, zeigte ähnliche Ergebnisse. Hier zeigte sich eine verdickte Media mit verstärkter Kalzifikation in den Koronarien der Dialysepatienten. [4] Eine weitere Arbeit zu dieser Fragestellung stammt von Gross et al, die jeweils 23 Proben von Koronarien von Dialysepatienten und Nierengesunden untersuchte. Hier zeigte sich ebenfalls eine deutlich verdickte Media in den Koronarien der Dialysepatienten, was die Annahme bestätigt, dass der Prozeß der Arteriosklerose in Dialysepatienten prävalenter ist und eine Hauptursache der kardiovaskulären Mortalität darstellt. Es zeigte sich jedoch auch, dass das Ausmaß atherosklerotischer Intimaplaques in beiden Gruppen gleich war, die Expression proinflammatorischer Proteine jedoch in den Dialysepatienten viel ausgeprägter war. [5]

Diese Untersuchungen lassen vermuten, dass die Gefäßsklerose in Dialysepatienten einerseits hauptsächlich durch Arteriosklerose, die die Media betrifft, gekennzeichnet ist. Andererseits bestehen aber auch Merkmale der Inflammation und der Atherosklerose.

Auf beide Vorgänge -Vaskuläre Kalzifikation und Inflammation- soll im Folgenden genauer eingegangen werden.

1.3 Vaskuläre Kalzifikation

Schon Mitte der 70er Jahre erkannte man, dass die vaskuläre Kalzifikation (VK) in CNI-Patienten eine große Rolle spielte. Radiologische Untersuchungen an CNI Patienten zeigten damals eine Inzidenz der vaskulären Verkalkung von 30% in der Altersgruppe von 15-30 Jahren und eine 50 %ige Inzidenz in der Gruppe von 40-50 Jahren. Die häufigsten Lokalisationen der Verkalkung waren in absteigender Reihenfolge die Knöchel gefolgt von der Aorta abdominalis, Füße, Becken und der Hände. Autopsieergebnisse verstorbener Hämodialysepatienten demonstrierten ebenfalls ausgedehnte Weichteil- und Gefäßverkalkung in 50-80% der Patienten.



Abb. 1.2.: Verkalkung der Aa. Interosseae [6]

Bei der vaskulären Kalzifikation handelt es sich um einen Prozess, der in CNI-Patienten prävalent ist und der manifesten kardiovaskulären Erkrankung vorangeht. Er ist im Laufe der Erkrankung progressiv und korreliert mit einer erhöhten Mortalität. So zeigten Pannier et al., dass die Präsenz von vaskulärer Kalzifikation in der abdominalen Aorta mit einer erhöhten kardiovaskulären Mortalität sowohl in CNI-Patienten als auch in der Normalbevölkerung assoziiert ist. [7, 8]

Histologie der normalen Gefäßwand

Die normale arterielle Gefäßwand ist dreischichtig aufgebaut und besteht von außen nach innen aus Adventitia, Media und Intima. Die Adventitia besteht aus extrazellulärer Matrix, Nervenendigungen, vereinzelt Leukozyten sowie wenigen glatten Muskelzellen. Sie ist von der Media durch eine bindegewebige Lamina elastica externa getrennt. Die Media enthält, je nach Lokalisation und Beanspruchung, mehrere Schichten glatter Muskelzellen, die von einer elastin- und lamininreichen Matrix umgeben sind. Die Intima, die von der Media durch die Lamina elastica interna getrennt ist, besteht aus einer dünnen Schicht Endothelzellen, die einer dünnen extrazellulären Matrix mit vereinzelt glatten Muskelzellen aufliegt.

Histopathologie der vaskulären Kalzifikation

In kalzifizierten Gefäßen hingegen sind kalkhaltige Plaques nachweisbar, die sich hauptsächlich in der Media der Gefäßwände befinden. Sie enthalten verkalkte glatte Muskelzellen, die große Ähnlichkeit mit Osteoblasten aufweisen. Diese sind in der Lage, kalzium- und phosphathaltige Matrixvesikel zu bilden und zu sezernieren. Extrazellulär sind dementsprechend große Mengen von Matrix vorhanden, die Kalzium- und Phosphatkonkreme, vor allem Hydroxyapatite enthalten. Weiterhin sind verkalkte Apoptosekörperchen, welche Residuen zugrundegegangener glatter Muskelzellen darstellen, nachweisbar. Ferner sind am Rande atherosklerotischer Plaques tartrat-resistente, saure-phosphatase-positive vielkernige Riesenzellen, die möglicherweise Osteoklasten entsprechen, vorhanden. Morphologisch hat dieser Prozess also große Ähnlichkeit mit dem Prozess der Knochenformation. Tatsächlich konnte knochenähnliches Gewebe in humanen Läsionen von Mönckebergsklerose und Atherosklerose identifiziert werden. [9]

1.3.1 Pathogenese

Lange Zeit ging man davon aus, dass die vaskuläre Kalzifikation ein rein passiver Prozess sei. Man dachte, dass die erhöhten Serumphosphat- und -kalziumkonzentrationen zur Präzipitation von unlöslichen basischen Kalzium-Phosphatkristallen führe, die sich dann in der Media der Arterien ablagerten und so die Gefäßverkalkung bis hin zur Gewebnekrose induzierten. Man sah die Vaskuläre Kalzifikation also als einen rein passiv ablaufenden Prozess an. Dieses Meinungsbild hat sich im Laufe der letzten Jahre stark gewandelt. So geht man nunmehr von einem aktiv regulierten Prozess aus, in dem vielerlei Faktoren, z.B. Enzyme, die Verkalkung hemmen, eine Rolle spielen. Im Bemühen, diesen vielseitigen Prozess zu verstehen, gibt es diverse Theorien, die sich zwar nicht widersprechen, aber jeweils andere Faktoren in den Mittelpunkt stellen, nämlich

- a) Faktoren, die Verkalkung inhibieren und
- b) Faktoren, die sie induzieren

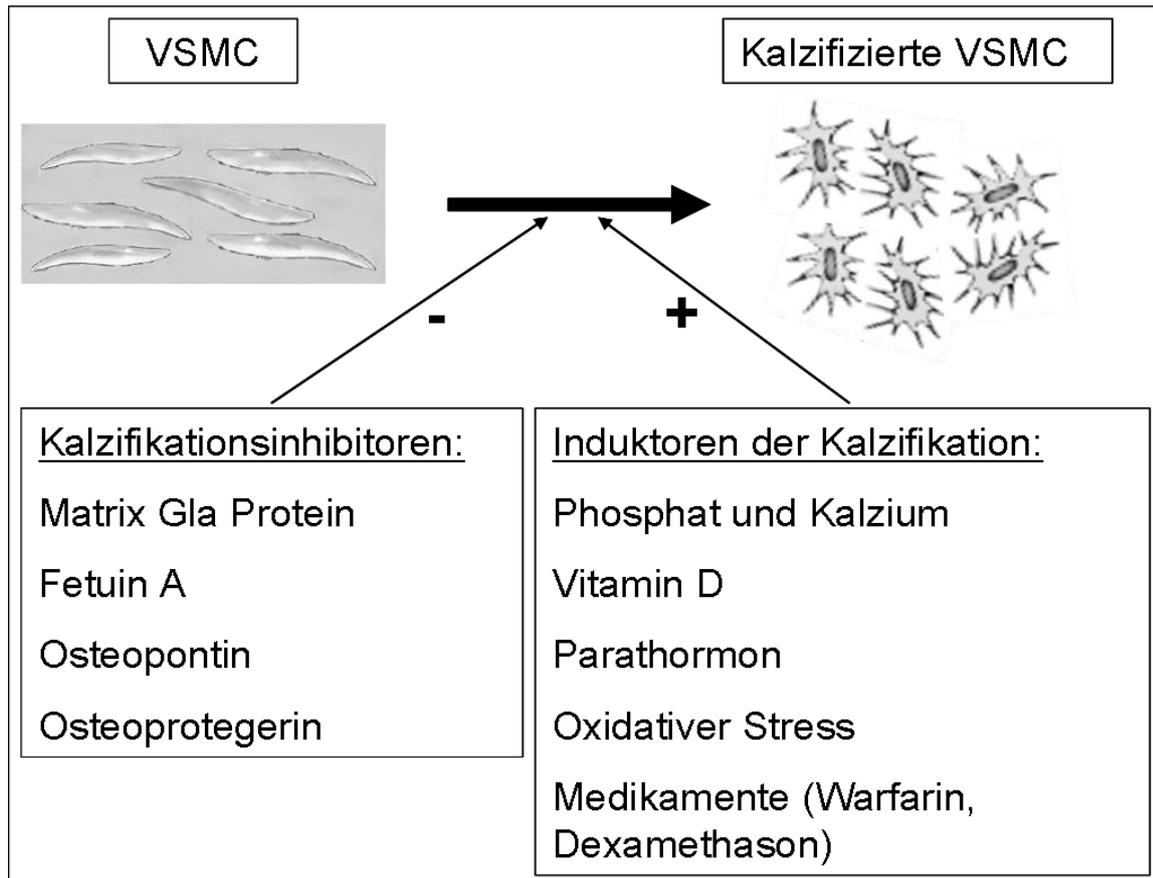


Abb. 1.3.: Pathogenese der Verkalkung glatter Muskelzellen

1.3.2 Inhibitoren der vaskulären Kalzifikation

In der letzten Dekade haben verschiedene Studien die Kalzifikation in atherosklerotischen Läsionen als aktiv regulierten Prozess beschrieben.

Vaskuläre Kalzifikation geschieht grundsätzlich spontan in Abwesenheit bekannter Verkalkungsinhibitoren. Die Serumkonzentrationen von Kalzium und Phosphat liegen um ein vielfaches höher als das Löslichkeitsprodukt, so dass Kalzifikation also auch ohne einen aus der Balance geratenen Kalzium- Phosphathaushalt und andere Risikofaktoren ständig unterdrückt werden muss. Dabei scheinen verschiedene Genprodukte den Prozess ektooper Kalzifikation zu inhibieren. Eine Reihe endogener, physiologisch vorhandener Inhibitoren der Kalzifikation wurden bereits identifiziert. Dazu zählen Matrix Gla-Protein, Fetuin A, Osteoprotegerin und Osteopontin, welche als Inhibitoren von Mineraldeposition im Gefäß eine wichtige Rolle spielen.

1.3.2.1 Matrix Gla Protein (MGP)

Das MGP ist ein 10 Kilodalton großes, matrix-assoziiertes Protein, welches sowohl von arteriellen glatten Muskelzellen als auch von Chondrozyten kontinuierlich sezerniert wird und einen inhibitorischen Effekt auf die Verkalkung zu haben scheint. So wurden die protektiven Effekte des MGP in Bezug auf vaskuläre Verkalkung in Experimenten mit Ratten eindrucksvoll belegt. Der Verlust der MGP-Funktion führte in MGP-knockout-Mäusen zur Verkalkung des gesamten arteriellen Systems und zur anschließenden Gefäßruptur.

Eine Mutation, die zum Funktionsverlust des MGP in Menschen führt, liegt beim Keutelsyndrom vor. Es ist gekennzeichnet durch eine Pulmonalstenose sowie extensive Verkalkung in der Media insbesondere arterieller Gefäße und im Knorpel.

Die Effektivität von MGP hängt von einer Reihe von Faktoren ab, die in verschiedenen Grundkrankheiten kompromittiert sein können. Dazu zählen beispielsweise die MGP-Konzentration sowie posttranslationale Modifikationen. Außerdem benötigt es Vitamin K zur regelrechten Funktion. Denn erst nach der Karboxylierung ist das MGP ein effektiver Inhibitor der Kalzifikation, seine unkarboxylierte Form ist dazu nicht imstande. Der Prozess der Karboxylierung ist ähnlich wie auch die Produktion einiger Gerinnungsproteine Vitamin K abhängig. Medikamente, die diesen Vorgang hemmen, wie z.B. Kumarine, interferieren somit auch mit der Hemmung der vaskulären Kalzifikation. In atherosklerotischen Plaques wurde von Shanahan et al. eine erhöhte MGP-Konzentration beschrieben, was als möglicher Gegenregulationsmechanismus diskutiert wird. [10]

1.3.2.2 Osteopontin

Osteopontin (OPN) ist ein Protein, das an der embryonalen Knochenformation und der skelettalen Knochenneuf ormation, dem Remodeling, beteiligt ist. Auch OPN wurde in atherosklerotischen kalzifizierten vaskulären Läsionen identifiziert, und genetische Experimente in Mäusen haben diesen Proteinen eine regulierende Rolle im Prozess der vaskulären Kalzifikation zugeschrieben. In OPN-knockout-Zellen, die unter normalen Kulturbedingungen als auch unter Bedingungen erhöhter Phosphatkonzentrationen inkubiert wurden, wurde anschließend die Kalziuminkorporation bestimmt. Unter normalen Bedingungen war diesbezüglich kein Unterschied festzustellen, allerdings lagerten OPN-knockout Zellen unter Bedingungen hoher Phosphatkonzentrationen

deutlich mehr Kalzium ein als die Kontrollzellen. Dies verstärkte sich bei Verlängerung der Inkubation und Erhöhung der Phosphatkonzentrationen. Das weist auf eine inhibitorische Funktion von Osteopontin auf die Kalziumeinlagerung im Prozess der vaskulären Kalzifikation hin. [11] Unterstrichen wird diese Theorie durch die Erkenntnis, dass Mäuse, die mit Phosphat behandelt werden, verstärkt Osteopontin exprimieren, was als Kompensationsmechanismus gedeutet werden kann. Diese Experimente stützen also die Annahme, dass Osteopontin ebenso wie MGP ein Inhibitor der vaskulären Kalzifikation ist.

1.3.2.3 Osteoprotegerin

Eine ähnliche Funktion kann dem Osteoprotegerin zugeschrieben werden. Dieser gilt als ein Rezeptorantagonist für RANK, einem intrazellulären Regulator der die Differenzierung von Osteoklasten reguliert. Osteoprotegerin hemmt diese Differenzierung also. Seine Wichtigkeit im Prozess des Remodelling zeigten Untersuchungen an OPG-knockout-Mäusen, welche in der Folge eine stark verminderte Knochendichte aufwiesen. Neuerdings wird Osteoprotegerin auch mit der arteriellen Kalzifikation in Verbindung gebracht. [12] So führte eine Inaktivierung des Osteoprotegerin in Mäusen zu einer deutlichen Progression atherosklerotischer Läsionen. [13] Außerdem korrelierten erhöhte OPG-Werte mit der Präsenz und dem Ausmaß von koronarer Herzkrankheit. Ähnlich wie Osteopontin und MGP inhibiert Osteoprotegerin also ektopische Kalzifikation und spielt somit eine entscheidende Rolle sowohl im physiologischen als auch im pathologischen Kalzifikationsprozess.

1.3.2.4 Fetuin A

Ein weiterer bekannter Inhibitor der extraskelettalen Kalzifikation ist das Fetuin-A. Dieses Plasmaglykoprotein wird in der Leber produziert und wird als negatives Akutphaseprotein angesehen. In inflammatorischen Zuständen ist seine Plasmakonzentration also vermindert. Fetuin A wird als einer der wichtigsten Kalzifikationsinhibitoren angesehen, ihm wird 50% der Präzipitationsinhibitionskapazität des Serums zugeschrieben. In vitro ist Fetuin A in der Lage, Hydroxyapatitbildung zu unterdrücken. [14]

In Dialysepatienten war eine verminderte Fetuin-A-Konzentration nachweisbar. Damit einhergehend haben sie eine verminderte Kapazität, Kalziumphosphatpräzipitation ex vivo zu hemmen. Dieser Effekt war nach Zusatz von Fetuin A nicht mehr nachweisbar.

Stenvinkel et al. fanden heraus, dass reduzierte Fetuin A-Werte mit Inflammation und Atherosklerose assoziiert sind. In der Folge war in der Patientengruppe mit niedrigen Fetuin A-Werten eine höhere kardiovaskuläre Letalität feststellbar. [15]

Dass es Inhibitoren im Prozess der Gefäßverkalkung gibt, ist also unstrittig. Bislang jedoch unbekannt ist, ob sie einer übergeordneten Kontrolle unterliegen, und wie genau sie miteinander interagieren.

1.3.3 Induktion der vaskulären Kalzifikation

Diesen inhibitorischen, protektiven Einflüssen stehen mehrere Faktoren gegenüber, die den Prozess der medialen Gefäßverkalkung induzieren können. Erhöhte Kalzium- und Phosphatwerte führen zur Ablagerung von basischen Kalziumphosphatkristallen in der Gefäßwand. Bis vor einigen Jahren ging man hierbei davon aus, dass eine Überschreitung des Löslichkeitsproduktes zur Ablagerung von Kristallen führt, dies also ein rein chemischer Prozess ist. Neuere Studien belegen aber, dass viele regulierende Einflüsse und Faktoren diesen Prozess modulieren und verstärken. Sie brachten Erkenntnisse, die dem Prozess der vaskulären Kalzifikation große Ähnlichkeit mit dem Prozess der embryonalen Knochenformation attestierten.

1.3.3.1 Phosphat

Das Phosphat ist einer der potentesten Induktoren der vaskulären Kalzifikation. In vitro Versuche mit VSMC zeigten, dass Inkubation mit erhöhten Phosphatkonzentrationen im Zellmedium vergleichbar mit Serumphosphatwerten niereninsuffizienter Patienten eine starke Kalzifikation in glatten Muskelzellen herbeiführen. [16] Konzentrationsabhängig steigt nicht nur die intrazelluläre Phosphatkonzentration, sondern auch die Kalziumkonzentration. Nach mehrtägiger Inkubation sind in der extrazellulären Matrix mineralisierte Phosphatkristalle in hoher Konzentration nachweisbar.

Das Phosphat scheint dabei einen regulierenden Einfluss auf das Genmilieu der glatten Muskelzelle zu haben. Behandlung glatter Muskelzellen mit anorganischem Phosphat führte zu erhöhter Expression von regulatorischen Proteinen, die in der Knochenbildung eine Rolle spielen, wie Cbfa-1 und Osteocalcin. Im Gegenzug dazu wurden VSMC spezifische Marker herunter reguliert.

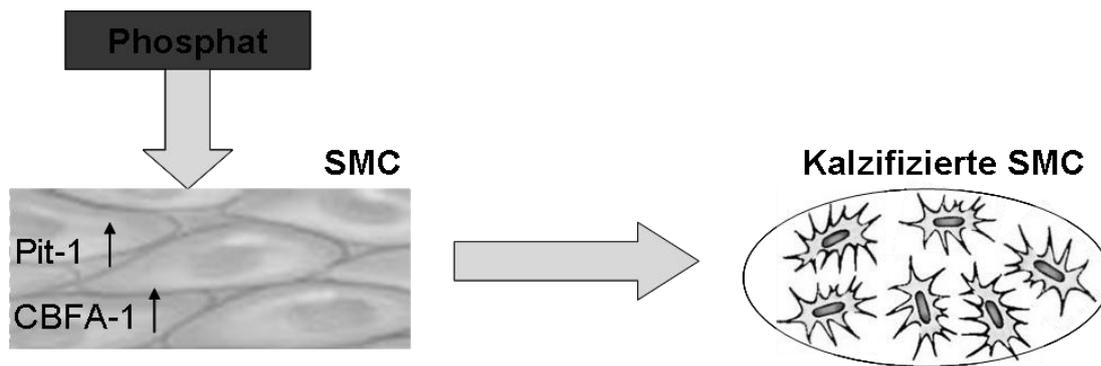


Abb. 1.4.: Einfluss des Phosphats auf den Prozess der vaskulären Kalzifikation

Pit-1

Die Aufnahme des Phosphats in die glatte Muskelzelle erfolgt über einen Natrium-abhängigen Kotransporter namens Pit-1. Dieser Phosphattransporter lässt sich nach Behandlung glatter Muskelzellen mit anorganischem Phosphat in erhöhter Konzentration in der Zellmembran der VSMC nachweisen. Das extrazelluläre Phosphat steuert also indirekt die Phosphateinlagerung in die glatte Muskelzelle. Die erhöhte intrazelluläre Phosphatkonzentration induziert dann weitere mineralisationsassoziierte Gene, wie z.B. den Core-binding factor alpha (Cbfa-1).

Cbfa-1

In VSMC, die mit Phosphat inkubiert wurden, werden die osteoblasten-spezifischen Gene *Osf2* und *Cbfa-1* in den glatten Muskelzellen induziert. [17]

Cbfa-1 ist ein wichtiger Transkriptionsfaktor in der Induktion der Knochenproduktion. Dieser Faktor dirigiert die Expression einiger für den Knochenbau wichtiger Gene, wie Osteocalcin, Bone Sialoprotein und alpha-1-Kollagen. Die zentrale Rolle, die *Cbfa-1* in der Kalzifikation glatter Muskelzellen offenbar einnimmt, konnte durch eine *Cbfa*-null Maus gezeigt werden, der jegliche mineralisierte Knochenstrukturen fehlten.

Das Genprodukt *Cbfa-1* wird in VSMC nach Inkubation mit Phosphat deutlich stärker exprimiert. Erhöhte Phosphatwerte führen also nicht nur zur passiven Ablagerung von Kalkkristallen, sondern verändern das Genmilieu von Gefäßmuskelzellen.

Herunterregulation von SMAGS

Weitere Versuche zeigten, dass die Inkubation nicht nur zu vermehrter Expression osteogener Proteine wie *cbfa-1* führt, sondern darüber hinaus die Zelllinienmarker der glatten Muskelzellen *SM22 α* und smooth muscle α -actin nicht mehr exprimiert werden.

Kalzifizierende glatte Muskelzellen verlieren also ihre genetischen Marker und nehmen den Phänotyp von Osteochondroprogenitorzellen an. In fortgeschrittenen atherosklerotischen Läsionen findet man dann gar Osteozyten und Knochen trabekulae. [18]

1.3.3.2 Kalzium

Auch die alleinige Erhöhung der Serumkalziumkonzentration scheint einen kalzifizierenden Effekt auf glatte Muskelzellen zu haben. [19] Dies war das Ergebnis von Experimenten, in denen glatte Muskelzellen durch Inkubation mit erhöhten Kalzium- und normalen Phosphatwerten mineralisierten. Auch hier konnte eine erhöhte Expression des Phosphattransporters Pit-1 nachgewiesen werden. Kalzium allein hat durch Hochregulation der membranständigen Phosphattransporter also denselben kalzifizierenden Effekt, der durch Blockade dieser Kanäle wirksam zu hemmen ist, was die Wichtigkeit dieses Transporters zeigt. Zusätzlich dazu kann erhöhtes Kalzium zu vermehrter Expression von Cbfa-1 und alkalischer Phosphatase führen. Phosphat und Kalzium wirken hinsichtlich der Verkalkung also synergistisch.

Andere Modulatoren und Einflüsse:

Weitere Urämie- assoziierte Faktoren werden als Induktoren der vaskulären Kalzifikation diskutiert.

1.3.3.3 Urämische Toxine

Auch phosphatunabhängige urämische Toxine stellen einen Faktor in der Pathogenese der vaskulären Kalzifikation in chronischer Niereninsuffizienz dar. [20] Nach Inkubation von VSMC mit Serum urämischer Patienten ist eine erhöhte Expression von Knochenproteinen nachweisbar. Dieser Effekt ist von der Phosphatkonzentration interessanterweise unabhängig.

1.3.3.4 Lipide

Im Blut vorkommende Lipide, hierbei insbesondere oxidiertes LDL, Cholesterol, 25-Hydrocholesterol, verstärken die vaskuläre Kalzifikation. Ihnen wird die Möglichkeit der intrazellulären osteogenen Genexpression, osteoblastischen Transformation und der Sekretion einiger Knochenmatrixproteine zugesprochen.

1.3.3.5 Advanced glycation end products (AGE)

AGE sind eine Gruppe von Molekülen, die als das Resultat mehrerer verketteter chemischer Reaktionen nach einer initialen Glykosylierung entstehen. Sie sind letztlich Ausdruck des Alterungsprozesses eines Organismus.

Auch diese Moleküle scheinen eine mögliche Rolle in der vaskulären Verkalkung zu spielen. So zeigten Devuyst et al. mit ihren Versuchen, dass das Ausmaß der Verkalkung von Koronargefäßen von Hämodialysepatienten mit dem Vorhandensein von AGE assoziiert war. [21]

1.3.3.6 Vitamin D3 und Parathormon

CNI-Patienten fehlt die Vitamin-D₃-Sekretion der Niere. Dies führt zu einer Hypokalzämie, was die Nebenschilddrüse zu einer überschießenden Parathormonsekretion veranlasst und in einem sekundären Hyperparathyreoidismus resultiert. Dadurch kommt es zu einer vermehrten Kalziumresorption aus dem Knochen mit anschließender Hyperkalzämie und den bereits diskutierten Folgen.

Durch die therapeutische Vitamin D Gabe erhofft man sich eine Unterbindung dieses Effektes. Allerdings wird durch aktuelle Studien, in denen in Ratten nach Vitamin D Applikation eine ausgeprägte Vaskuläre Kalzifikation feststellbar war, Vitamin D ebenfalls als Induktor der Gefäßverkalkung verdächtigt. Diese Therapieoption steht derzeit somit auf dem Prüfstand. [22, 23]

1.3.3.7 Apoptose

Ferner könnten Zelltod und Apoptose vaskuläre Verkalkung aktivieren. Reynolds et al. zeigten, dass ausgeprägte Kalzifikation in kleinen Knötchen initiiert wurde, welche aus apoptotischen Zellen bestehen. Diese bilden einen Nidus für sezernierte, verkalkte Apoptosekörperchen. Apoptosekörperchen sind kleine 0,3–1 µm durchmessende kalziumreiche Vesikel, die apoptotischen Zellen entstammen. [24]

Neben der Rolle in der Induktion der vaskulären Kalzifikation spielt die Apoptose glatter Muskelzellen eine wichtige Rolle in der Ruptur atherosklerotischer Plaques. Wie Clarke et al. zeigen konnten, führt in Plaques bereits die Apoptose weniger VSMC zur Ruptur. [25, 26]

1.3.3.8 Hypertonus

Weiterhin können auch hämodynamische Veränderungen und chronische vaskuläre Schädigungen durch Hypertonus, Hypervolämie und systemische Aktivierung des Renin-Angiotensin-Systems zur Proliferation glatter Muskelzellen, Mediahyperplasie und schließlich zur Rekrutierung osteoblastenähnlicher Zellen und somit zur Verstärkung der vaskulären Kalzifikation führen.

All diese Erkenntnisse legen die Annahme nahe, dass es sich bei der Vaskulären Kalzifikation um einen hochgradig regulierten Prozess mit vielen Protagonisten und Antagonisten handelt. Dieser Prozess ähnelt in Teilen der Knochenformation. Insbesondere der Zustand der Urämie und hierbei insbesondere die erhöhten Serumphosphat- und –kalziumwerte scheinen die vaskuläre Kalzifikation durch Modulation osteogener Proteine und andere Mechanismen entscheidend zu dirigieren.

1.3.4 Diagnostik und Quantifizierung der vaskulären Kalzifikation

Neue Methoden haben es in den neunziger Jahren ermöglicht, die vaskuläre Kalzifikation in vivo zu quantifizieren. Dabei spielen die electron beam computer tomography und das Spiral CT die größte Rolle. Mithilfe dieser Untersuchung kann ein Kalzifikationsscore nach Agatson, in den die Fläche des Plaques und ein Dichtekoeffizient mit einfließen, errechnet werden, und somit besteht die Möglichkeit, die vaskuläre Verkalkung in vivo zu objektivieren. Mit dieser Methode gelang es, Vaskuläre Kalzifikation in CNI-Patienten in vivo zu bestimmen. Er ist erwartungsgemäß höher als in der Normalbevölkerung. Er korreliert aber nicht nur mit der Progredienz der chronischen Nierenerkrankung sondern auch mit einigen Serummarkern, wie der aktiven Form des MGP. Auch das CRP, Akutphaseprotein und Marker der Inflammation, korrelieren mit der Vaskulären Kalzifikation. Die Höhe des CRP korreliert mit dem mit dem EBCT errechneten Kalzifikationsscore und ist somit ein unabhängiger Prädiktor der vaskulären Kalzifikation. [27] (s. auch Kapitel Inflammation und Vaskuläre Kalzifikation). Ishimura et altera bestätigten den Zusammenhang von vaskulärer Kalzifikation, festgestellt durch Röntgen der Hand sowie des Abdomens, und erhöhten CRP-Werten. [28]

1.4 Inflammation

Ein weiterer Faktor neben der vaskulären Verkalkung, der in der Progredienz der Gefäßsklerose eine große Rolle spielt, ist die Inflammation. Die Atherosklerose wird insgesamt als inflammatorische Erkrankung gesehen. Die Inflammation kann als eine Reaktion des Abwehrsystems auf verschiedene Bedrohungen definiert werden. Diese Bedrohungen können z.B. infektiologischer, toxischer oder metabolischer Genese sein. Das Immunsystem erkennt all diese Zustände als gefährlich und reagiert darauf auf zwei verschiedenen Ebenen: Dem spezifischen und unspezifischen Immunsystem.

Im Rahmen der spezifischen Abwehr können Antikörper beispielsweise gegen Krankheitserreger gerichtet sein und ihre Bekämpfung einleiten.

Das unspezifische Immunsystem

In chronischen Inflammationszuständen spielt aber das unspezifische Immunsystem die größere Rolle. Seine verschiedenen Elemente erkennen fremde Proteine, Toxine, Phospholipide als potentiell gefährlich und leiten eine allgemeine Entzündungsreaktion ein. Auf zellulärer Ebene detektieren Monozyten unspezifisch fremde Moleküle wie zum Beispiel Endotoxin, also Bakterienmembranbestandteile, und reagieren über verschiedene Zellsignalsysteme über beispielsweise NF- κ B zunächst mit einer allgemeinen Aktivierung und schließlich mit der Produktion verschiedener proinflammatorischer Interleukine. Diese leiten die Entzündungsreaktion weiter, indem sie weitere Monozyten und Granulozyten rekrutieren, die Ausprägung von Zelladhäsionsmolekülen auf Endothelzellen induzieren und die Produktion von Akutphaseproteinen in der Leber steigern. Auf humoraler Ebene gibt es diverse Akutphaseproteine und Komplementfaktoren, die fortwährend im Serum vorhanden sind und verschiedene als „gefährlich“ eingestufte Moleküle binden und somit opsonieren und deren Phagozytose einleiten können. Der wichtigste Vertreter dieser Proteine ist das C-reaktive Protein, welches zur Familie der Pentraxine gehört.

Pentraxine

Pentraxine sind Teil der angeborenen, unspezifischen Abwehr. Sie funktionieren als lösliche Rezeptoren, die fremde Molekularmuster erkennen können. Dies sind sogenannte soluble Pattern recognition receptors, zu denen beispielsweise auch das

Komplement gehört. Die Familie der Pentraxine ist charakterisiert durch eine pentamere Struktur. [29]



Abb.6.1: Molekülstruktur der Pentraxine [29]

Die Familie wird in zwei Gruppen, die kurzen und langen Pentraxine, eingeteilt. Beide haben eine Aminosäuresequenz von 203 Aminosäuren gemeinsam, die jeweils fast identisch ist. CRP und Serum Amyloid P component (SAP) sind die Prototypen der kurzen Pentraxine. Lange Pentraxine unterscheiden sich von kurzen Pentraxinen durch eine zusätzliche N-terminale Domäne zu der C-terminalen Domäne. Wichtigster Vertreter der langen Pentraxine ist das PTX 3. Das sezernierte PTX 3 hat ein Molekulargewicht von 40,165 Da und enthält 381 Aminosäuren. Es besteht aus einer C-terminalen 203 Aminosäuren langen, pentraxin-artigen Domäne, die an einen N-terminalen Rest von 178 Aminosäuren geknüpft ist, die von anderen Proteinen unabhängig ist.

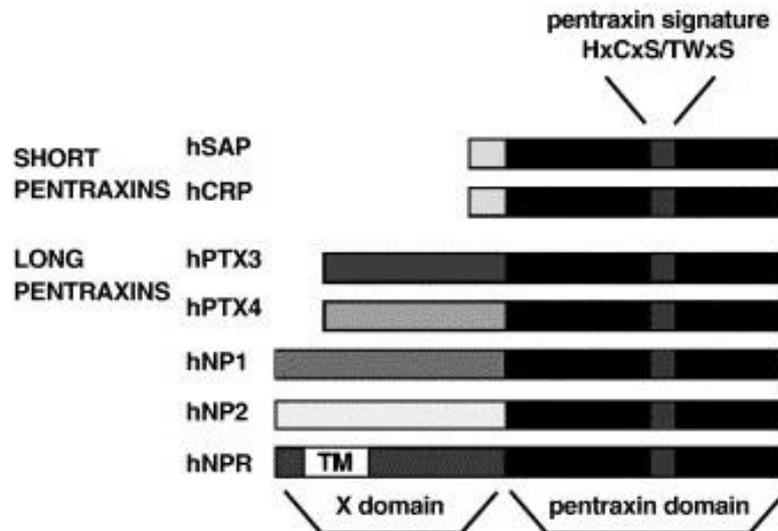


Abb. 6.2: Aufbau der Pentraxingene; [30]

Das PTX-3-Gen besteht aus drei Exons, getrennt von zwei Introns, wobei das dritte Exon bei allen Mitgliedern der Pentraxinfamilie identisch ist. [30] Phylogenetisch betrachtet sind lange Pentraxine also eine fortentwickelte Form der kurzen Pentraxine.

1.4.1 CRP

CRP ist der wichtigste Vertreter der kurzen Pentraxine. Als ein pentameres Protein besteht es aus fünf identischen Monomeren, die nichtkovalent verbunden sind. Jedes Monomer besteht aus 206 Aminosäuren und hat eine Molekularmasse von 21 kDa.

Die Bindung seiner Liganden erfolgt kalziumabhängig und wird durch freie Choline inhibiert. Es besitzt eine Bindungsmöglichkeit für Choline und zwei für Kalzium. Seinen Namen verdankt es seiner Fähigkeit, in vitro somatische C-Kohlenhydrate von der Polysaccharidkapsel der Pneumokokken zu präzipitieren.

1.4.1.1 Stimulus /Bildung

Die klassischen kurzen Pentraxine CRP und SAP sind Akutphaseproteine in Menschen und in Mäusen, die in der Leber als Antwort auf inflammatorische Stimuli, insbesondere IL-6 gebildet werden.

1.4.1.2 Liganden

Es gibt zahlreiche körpereigene CRP-Liganden wie beispielsweise Plasmalipoproteine, geschädigte Zellmembranen, Phospholipide, Ribonukleinsäurepartikel, und apoptotische Zellen. Zu den extrinsischen CRP-Liganden zählen Glykane, Phospholipide und andere

Bestandteile von Mikroorganismen. CRP ist imstande, nach der Komplexierung dieser Liganden, die Komplementkaskade bis hin zum „Attackkomplex“, welcher Bakterienmembranen lysiert, zu aktivieren und ist somit ein wichtiger Bestandteil der angeborenen Immunität.

1.4.2 Klinischer Gebrauch des CRP

Im klinischen Alltag findet CRP Verwendung, als Marker von inflammatorischen Prozessen im Rahmen von Infektionen, Neoplasmen, Traumata oder Bindegewebserkrankungen. Es ist beispielsweise gebräuchlich zur Erfolgsbewertung einer eingeleiteten antibiotischen Therapie. Seine Spezifität ist allerdings sehr gering. Neben der Möglichkeit, akute Krankheitsbilder wie Infektionen oder Traumata widerzuspiegeln, vermag es, die niedriggradige Aktivierung der angeborenen Immunität, beispielsweise durch atherogene oder diabetes-assoziierte Zustände, oder auch eine aktivierte Atherosklerose, anzuzeigen. Es reflektiert hierbei den Grad der Inflammation in einem hochsensitiven Rahmen. Die Bestimmung des CRP ermöglicht auch eine Einschätzung der Intensität der Mikroinflammation, welche eine langandauernde niedriggradige Entzündung bezeichnet. [31]

Proinflammatorische Wirkung des CRP allein?

Neben seiner physiologischen Wirkung im Immunsystem wird dem CRP auch eine proinflammatorische Wirkung zugeschrieben. Demnach könnten erhöhte CRP-Werte allein inflammatorische Prozesse auslösen und so für beispielsweise atherosklerotische Prozesse verantwortlich sein. In der Vergangenheit galt es als ausgemacht, dass CRP auch ohne Bindung an einen Liganden proinflammatorische Wirkung hat. So galt eine proinflammatorische Wirkung auf Endothelzellen wie auf Monozyten und VSMC lange Zeit als unumstritten. [32] Inzwischen mehren sich die Zweifel, ob die beobachteten Effekte tatsächlich dem CRP oder eher kontaminierendem Endotoxin geschuldet sind.

1.4.3 Pentraxin 3 (PTX 3)

Ein weiteres Akutphaseprotein, welches ebenfalls der Familie der Pentraxine zugehörig ist, ist das Pentraxin 3. PTX 3 zählt zu den langen Pentraxinen.

Im Gegensatz zum CRP, welches vornehmlich in der Leber produziert wird, wird das PTX 3 von vielerlei Zellen, wie glatten Muskelzellen, Endothelzellen, Fibroblasten und Monozyten produziert. Dies geschieht als Antwort auf verschiedene Stimuli, wie bakterielles Endotoxin sowie diverse Interleukine (IL-1 β , IL-6 und TNF α).

Doni et altera untersuchten die Umstände unter denen PTX 3 von dendritischen Zellen sezerniert wird. Dendritische Zellen stehen am Beginn der Antwort des unspezifischen Immunsystems. Doni et altera fanden heraus, dass adäquate Stimuli, wie TNF α , IL-1 β , IL-10 und toll-like-receptor-Aktivierung die PTX 3 Produktion hervorrufen. In dendritischen Zellen wird die PTX 3-Produktion nach Stimulation mit LPS durch Interferon ϕ (IFN ϕ) und IL-4 unterdrückt. [33]

Jaillon et altera hingegen befassten sich mit der PTX 3 Sekretion von neutrophilen Granulozyten. Sie fanden heraus, dass PTX 3 in Neutrophilen schon präformiert gespeichert und bei adäquatem Stimulus nur noch freigesetzt wird. Als adäquater Stimulus gilt hiernach die Inkubation mit S.aureus, E.coli oder LPS. Untersuchungen an dendritischen Zellen im Rahmen derselben Arbeit zeigten, dass hier keine präformierten PTX3-Granula vorhanden waren. Bei adäquatem Stimulus stieg hier zunächst, die PTX3 mRNA an. [34] In Gefäßendothel- und glatten Muskelzellen werden ebenfalls beträchtliche Mengen an PTX 3 gebildet. Breviario et altera[30] und Klouche et altera [35] machten hier unter anderem oxidiertes LDL als inflammatorischen Stimulus aus, der die Sekretion von PTX3 zur Folge hat. Dies suggeriert, dass das PTX 3 einen möglichen Link zwischen Inflammation und Atherosklerose darstellt. Tatsächlich wiesen Rolph et altera [42] PTX 3 produzierende Zellen in atherosklerotischen Plaques nach. Es ist ebenso wie CRP imstande, körpereigene Bestandteile wie apoptotische Zellen und verschiedene körperfremde Strukturen, zu opsonisieren und damit deren Degradation einzuleiten. Es bindet gleichermaßen Komplement und kann somit die Phagozytose dieser Strukturen einleiten.

1.4.3.1 Wirkung

PTX 3 wird also auf vielerlei Stimuli hin sezerniert, so dass sich die Frage ergibt, welche Aufgabe dem PTX 3 dann in der Folge zukommt, und an welche Liganden das PTX dann bindet. Ein Ligand des PTX 3 ist das Komplementprotein C1q. PTX 3 bindet C1q im Gegensatz zum CRP kalziumunabhängig. Nauta et altera [36] untersuchten, was

diese Bindung bewirkt. Diese unterscheidet sich, je nachdem ob das PTX 3 in gebundener oder ungebundener Form vorliegt. Gebundenes PTX 3 aktivierte die Komplementkaskade, wohingegen ungebundenes PTX 3 die Aktivierung inhibierte.

Weiterhin wiesen Nauta et al. nach, dass PTX3 die Bindung des C1q und C3 auf der Oberfläche apoptotischer Zellen verstärkte. Komplement erleichtert die Aufnahme apoptotischer Zellen durch Phagozyten. Eine Bindung von PTX3 an apoptotische Zellen führt zur Verhinderung der Erkennung durch dendritische Zellen, wie Rovere et al. [37] zeigten. Dies könnte beispielsweise die Verhinderung einer Autoimmunreaktion medieren. Die Bindung von PTX3 an Komplement und apoptotische Zellen deutet auf eine Funktion des PTX3 im Prozess der Phagozytose apoptotischer Zellen hin. Neben Komplement und apoptotische Zellen vermag PTX3 auch direkt pathogene Erreger zu erkennen und zu binden. Hierzu zählen *Aspergillus fumigatus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella* und Membranproteine verschiedener Enterobakterien, *Listeria monocytogenes* und *C. albicans*. [38, 39]

Zusammenfassend kann man sagen, dass PTX3 viele Eigenschaften eines Antikörpers hat. Seine Produktion wird getriggert durch die Erkennung pathogener Erreger, und es erkennt selbst mikrobielle Molekülmuster, aktiviert Komplement, und erleichtert die Erkennung apoptotischer Zellen sowie Mikroorganismen durch Phagozyten. Bislang unklar war bislang, ob PTX auch selbst eine proinflammatorische, inflammationsinduzierende Wirkung hat.

Inflammation ist also ein Prozess, der als Reaktion auf verschiedenen potentielle Gefahren aktiviert wird und viele Facetten beinhaltet. Während die Inflammation akut zu einer Beseitigung von Gefahren beiträgt, so ist die chronische Inflammation in der Lage aufgrund seiner vielfältigen Folgen, insbesondere der Aktivierung verschiedener Zellen, zu weiteren Krankheiten zu führen. In den letzten Jahren ist als Folge der Inflammation die Atherosklerose in den Fokus des Interesses gerückt, die Atherosklerose wird inzwischen gar als inflammatorische Erkrankung angesehen. Im folgenden Abschnitt soll deshalb die Rolle der Inflammation in der Atherosklerose erörtert werden.

1.4.4 Rolle der Inflammation in Atherosklerose

Inflammation und der Beginn der Atherosklerose

Am Anfang der Entstehung eines atherosklerotischen Plaques steht die Adhäsion von mononukleären Leukozyten an das Endothel. [40] Unter normalen Umständen

widersteht die innere Endothelschicht der Leukozytenadhäsion. Stattfinden kann dieser Prozess nur, wenn eine Aktivierung der Endothelzellen stattgefunden hat, die zu einer Expression von Adhäsionsmolekülen wie z.B. vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1), die die Interaktion von Endothel und Monozyten erlauben, führte. Monozyten und T-Zellen adhären über VCAM-1 an das Endothel und können schließlich die Gefäßwand penetrieren. Durch inflammatorische Zytokine wird die VCAM-1-Expression induziert. In der Intima vorhandene Bestandteile modifizierter Lipoproteine, wie oxidierte Phospholipide und kurzkettige Aldehyde, die der Lipoproteinoxidierung entstammen, stimulieren die Produktion proinflammatorischer Zytokine wie TNF- α , IL-1 β , welche dann die VCAM-1 Expression induzieren.

Monozytenmigration

Sobald Monozyten an die Gefäßwand gebunden haben, migrieren sie in die Intima. Die Migration der Monozyten wird dirigiert über einen Konzentrationsgradienten von Chemokinen, hier spielt insbesondere das MCP-1 eine Rolle, das die Monozyten über ihren CCR2 Rezeptor bindet und ihnen so den Weg weist. Auch Interleukin 8 wird hier eine regulative Rolle zugeschrieben.

Monozytenaktivierung

Sobald die Monozyten in der arteriellen Intima residieren, finden einige Prozesse statt, die schließlich zur Bildung der charakteristischen Schaumzellen führt. Zunächst wandeln sie sich in Gewebemakrophagen um, später exprimieren sie dann Rezeptoren, die sie zur Aufnahme der modifizierten Lipoproteine befähigt (Scavenger Receptor A und CD36). Weiterhin sezernieren sie eine Vielzahl von Interleukinen und Chemokinen, die sie selbst zur Zellteilung anregen und das Fortschreiten der atherosklerotischen Plaques fördern, dazu zählt beispielsweise das M-CSF (macrophage-colony-stimulating factor). Auch werden durch diese Interleukine die ebenfalls im Plaque angereicherten T-Zellen aktiviert und zur weiteren Interleukinproduktion stimuliert. Bis aus dem Prozess der Atheromformation durch die Einengung des arteriellen Lumens klinische Konsequenzen erwachsen, finden weitere Prozesse statt. Im weiteren Verlauf wird das atherosklerotische Plaque größer, wozu vor allem die Proliferation glatter Muskelzellen beiträgt. Auch sie wird gesteuert von Interleukinen, die von Makrophagen freigesetzt werden.

Plaqueruptur

Auch an der Plaqueruptur sind inflammatorische Prozesse beteiligt. Einerseits werden durch proinflammatorische Zytokine und zytotoxische T-Zellen Endothelzellen zur Apoptose gebracht. Andererseits aktivieren die proinflammatorischen Zytokine die Matrix Metalloproteinasen (MMP), die auf den Abbau der subendothelialen Basalmembran spezialisiert sind. Beide Wege führen zur Instabilität und schließlich zur Ruptur des Plaques. Die Kollagenfasern, die von glatten Muskelzellen im Fibrous cap, der fibrösen Kappe des atheromatösen Plaques, produziert werden, tragen einen großen Anteil zur Stabilität des Plaques bei. Untersuchungen zeigten, dass $\text{IFN}\gamma$, ein proinflammatorisches Zytokin, diese Kollagenproduktion hemmen. Auch dies könnte eine Plaqueinstabilität bedingen. Außerdem ist, wenn in der Intima inflammatorische Prozesse von statten gehen, die Kollagenschicht der fibrous cap deutlich dünner. Diese sind dann unter hämodynamisch instabilen Umständen deutlich rupturgefährdeter als kollagenreiche Plaques. Insgesamt sind inflammatorische Prozesse also letztlich auf allen Stufen des Atheroskleroseprozesses beteiligt.

1.4.5 Inflammation in CNI-Patienten

Da CNI-Patienten einem höheren kardiovaskulären Risiko unterliegen, liegt die Annahme nahe, dass der chronische Mikroinflammationszustand dabei eine ursächliche Rolle spielt. Inflammatorische Prozesse sind in CNI-Patienten ganz besonders prävalent. Abzulesen ist dies an erhöhten CRP- und Interleukinserumwerten in Dialysepatienten. [41] Bestätigt wurden diese Daten durch Stenvinkel et al., die zeigten, dass 30-50% der Prädialyse-, Hämö- bzw. Peritonealdialysepatienten serologische Zeichen einer aktivierten inflammatorischen Reaktion mit erhöhten Serumwerten des Entzündungsmarkers CRP (8-10 mg/l) aufweisen. [42] Auch das Pentraxin 3 ist im Serum von Hämodialysepatienten erhöht. [43] Die Ursachen für diesen chronischen Inflammationszustand dieser Patienten sind nicht geklärt. Hier stehen mehrere Faktoren, insbesondere die Urämie unter dem Verdacht, proinflammatorisch zu wirken.

1.4.5.1 Ursachen der Inflammation in CNI-Patienten

Die ursächlichen Pathomechanismen für die Mikroinflammation in CNI-Patienten sind weiterhin nicht eindeutig definiert, sie können aber grob in zwei Gruppen geteilt werden.

1. die unzureichende Ausscheidung dieser Zytokine durch die reduzierte Nierenfunktion und
2. die erhöhte Zytokinproduktion durch Akkumulation urämischer proinflammatorisch wirkender Toxine wie Advanced Glycation Products, die veränderte Phosphat/Kalzium balance, Hypervolämie, Infektionen und Dialyse-bezogene Inflammation.

Akkumulation inflammatorischer Zytokine bei reduzierter Kreatininclearance

An undialysierten Patienten konnte gezeigt werden, dass die Kreatininclearance sehr eng mit der Konzentration diverser Zytokine und ihrer löslichen Rezeptoren korreliert.

Bei einer eingeschränkten glomerulären Filtrationsrate (GFR) steigt konsekutiv auch die Zytokinkonzentration. Zu beachten ist allerdings die kurze Halbwertszeit der meisten Zytokine und der Umstand, dass die Degradierung der Zytokine hauptsächlich im lokalen Gewebe stattfindet. Ob eine reduzierte GFR also wirklich als Ursache erhöhter Zytokinkonzentrationen gelten, ist noch nicht abschließend zu bewerten.

Vermehrte Produktion inflammatorischer Zytokine

Neben den genannten Ursachen der Inflammation in der Normalbevölkerung sind in CNI-Patienten zusätzliche inflammationsinduzierende Phänomene vorhanden. Beispielsweise können verschiedene Urämietoxine von Monozyten als gefährlich erkannt und mit einer Aktivierung beantwortet werden. Die dafür verantwortlichen Urämietoxine sind allerdings noch unzureichend identifiziert.

Ein bekanntes Urämietoxin ist das Phosphat. So zeigten Yuen et al., dass auch erhöhte Phosphat- bzw. Kalziumwerte im Serum Monozyten zur IL-6-Produktion stimulieren können. [44] Dies ist eine mögliche Erklärung dafür, dass in CNI-Patienten ein Zustand anhaltender Inflammation auf niedrigem Niveau, der Mikroinflammation vorhanden ist. Die Beobachtung, dass Pentraxine und Zytokine vor allem in Dialysepatienten erhöht sind, legt außerdem nahe, dass der Dialyseprozeß an sich ebenfalls zur Inflammation beiträgt. Als mögliche Auslöser einer inflammatorischen Reaktion wurden in verschiedenen Studien dabei Rückfluß des Dialysates über die Dialysemembran, nichtsterile Dialysate und nichtbiokompatible Membranen diskutiert.

Allerdings sind auch in nicht-dialysepflichtigen Patienten die CRP-Werte deutlich über der Norm. Dies gibt Anlass zu der Annahme, dass die Dialyse für eine aktivierte inflammatorische Reaktion zumindest nicht allein verantwortlich zu machen ist.

1.5 Inflammation und Vaskuläre Verkalkung

Da sowohl die Inflammation als auch die vaskuläre Kalzifikation in CNI-Patienten prävalent und mit einer erhöhten kardiovaskulären Mortalität assoziiert sind, liegt die Annahme nahe, dass diese Prozesse an verschiedenen Stellen ineinander greifen. Ein möglicher Link zwischen der Inflammation und der vaskulären Verkalkung stellt die Reaktion glatter Muskelzellen auf die in vitro Inkubation mit dem inflammatorischen Zytokin TNF α dar. Auf diesen Stimulus hin erfolgt nämlich eine osteogene Differenzierung, einer der entscheidenden Prozesse in der vaskulären Kalzifikation. Die Ko-Inkubation der VSMC mit aktivierten, also interleukinproduzierenden Monozyten hatte denselben Einfluss. [45] [46]

Eine andere denkbare Verbindung könnte der Mangel an Fetuin-A sein. Dieses negative Akutphaseprotein ist in inflammatorischen Prozessen reduziert, so dass es als Verkalkungsinhibitor wegfällt. Sind diese Prozesse chronisch, könnte dies einer der entscheidenden Pathomechanismen sein, wodurch die Inflammation die vaskuläre Verkalkung verstärkt.

1.5.1 Korrelation Inflammationsmarker und kardiovaskuläres Risiko

1.5.1.1 CRP als prognostischer Marker kardiovaskulärer Ereignisse

Aus diesen pathophysiologischen Zusammenhängen zwischen der Atherosklerose und der Inflammation leitete man ab, dass die Höhe des CRP-Spiegels als Inflammationsindikator auch Aussagen über die Wahrscheinlichkeit zukünftiger kardiovaskulärer Ereignisse machen könne. Viele Untersuchungen bestätigten dies. So konnte in mehreren voneinander unabhängigen prospektiven Studien ein Zusammenhang zwischen hohem CRP und sowohl der Gesamtmortalität als auch kardiovaskulären Ereignissen festgestellt werden. [47] Weitere Studien legten auch eine Assoziation vom CRP mit peripherer arterieller Verschlusskrankheit und plötzlichem Herztod nahe. Danach zeigt das CRP eine von Risikofaktoren wie Alter, Gesamtcholesterol, HDL-Cholesterol, Rauchen, Hypertonus, BMI und Familienanamnese unabhängige Assoziation mit Koronarereignissen. [48] Andere Studien bestätigten zwar diesen Zusammenhang, schätzten ihn aber aufgrund einer niedrigeren odds ratio als deutlich moderater ein. [49] Weiterhin wird dem CRP die Fähigkeit zugesprochen, rezidivierende kardiovaskuläre Ereignisse und das Outcome

dieser Patienten zu prognostizieren. [50] So gilt die Präsenz des CRPs als ein Marker für eine schlechte Prognose für Patienten mit instabiler Angina, Myokardinfarkt und Apoplektischem Insult. Außerdem kann CRP in akuten Koronarsyndromen unabhängig von Troponin Folgeereignisse vorhersagen, was annehmen lässt, dass das CRP nicht nur den Myokardschaden sondern auch atherosklerotische Prozesse widerspiegelt. Erhöhte CRP Level können darüber hinaus die Prognose und Rezidivraten in Apoplex- und pAVK-Patienten prognostizieren. Weiterhin wurde erkannt, dass die Serumlevel dieser inflammatorischen Indizes, des C-reaktive Protein (CRP) und des IL-6, eng mit dem kardiovaskulären Risiko und dem Überleben korrelieren. Diese Daten schlagen also vor, dass CRP eine Rolle spielt bei der Risikoeinschätzung von Patienten mit kardiovaskulären Erkrankungen. [51] Der Zusammenhang zwischen dem CRP-Level und kardiovaskulären Ereignissen scheint bei CNI-Patienten ganz besonders stark ausgeprägt zu sein, was Menon und Zimmermann zeigen konnten. [52] [53]

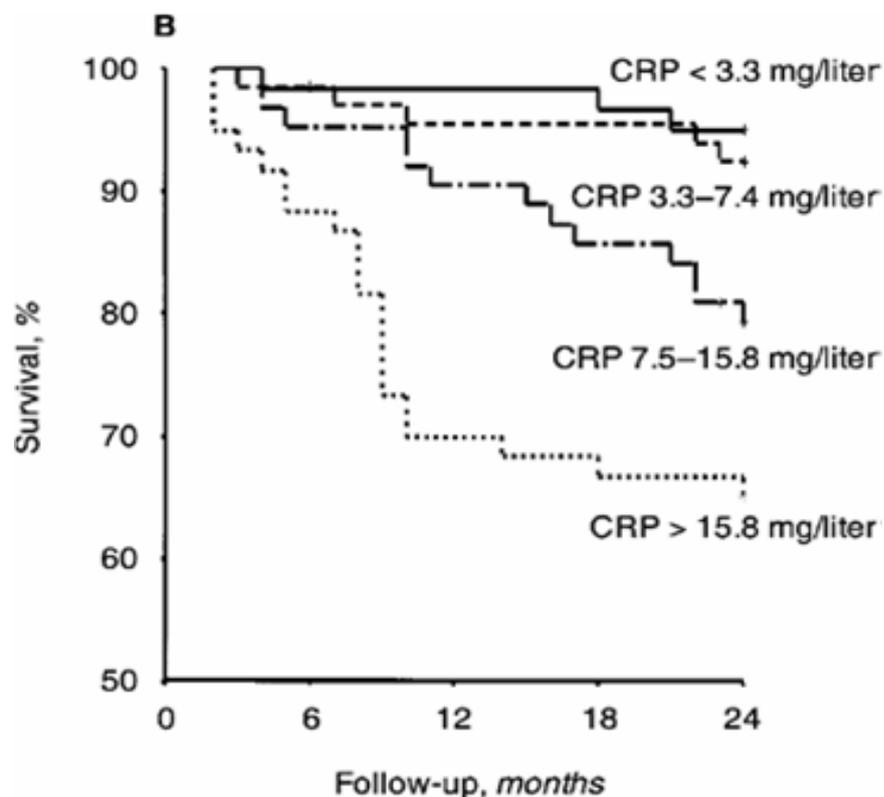


Abb. 1.6.: Korrelation von Überleben mit Serum-CRP-Spiegeln. Zimmermann et al. [53]

Auch bei dem PTX 3 zeichnet sich eine Assoziation mit atherosklerotischen Erkrankungen wie der Koronaren Herzkrankheit ab. Untersuchungen von Böhme et al. ergaben eine Erhöhung von PTX 3 in Dialysepatienten, welche mit kardiovaskulärem

Risiko assoziiert war. [43, 54-56] Ähnliche Ergebnisse erzielten Stenvinkel et al., die zeigten, dass das PTX3-Niveau mit der Nierenfunktion negativ und mit kardiovaskulären Erkrankungen und Mortalität positiv korreliert. In diesem Zusammenhang wurde postuliert, dass die Pentraxine den Grad der Inflammation in der Gefäßwand widerspiegeln und somit kardiovaskuläre Ereignisse vorhersagen kann.

1.5.1.2 Korrelation Inflammationsmarker und Vaskuläre Kalzifikation

Weiterhin wurde gezeigt, dass CRP auch mit dem Grad an Vaskulärer Kalzifikation korreliert. In einer Studie von Oh et al [27] wurde mittels Electron beam computed tomographie der Agatstonkalzifikationsscore ermittelt und mit den Serum-CRP-Werten verglichen. Hierbei zeigte sich ein eindeutiger Zusammenhang zwischen hohen CRP-Werten und ausgeprägter Gefäßverkalkung.

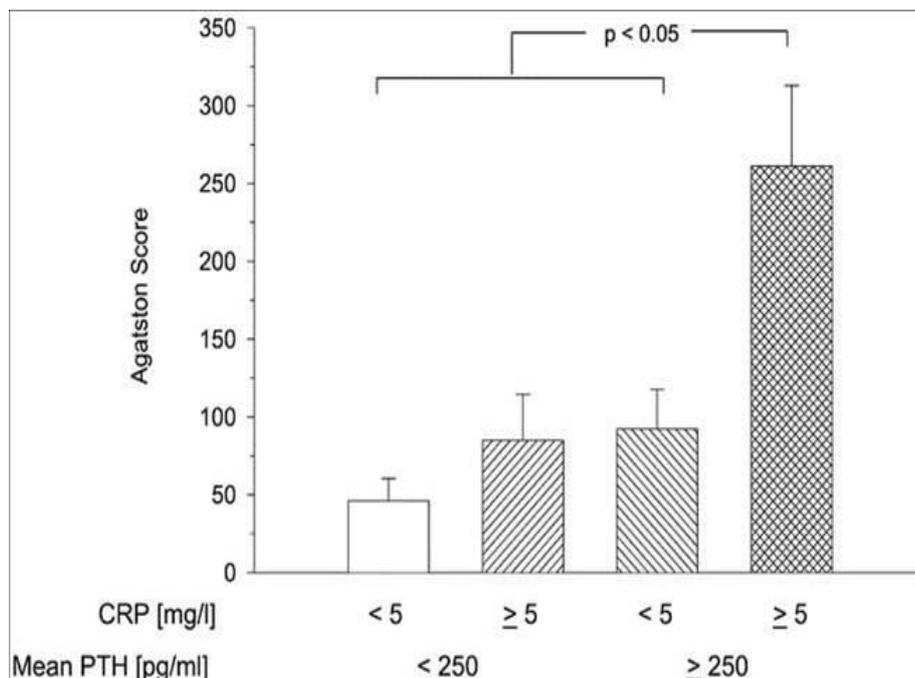


Abb. 1.7.: Korrelation des Serum CRP-Wertes mit der Kalzifikation [27]

Dies spiegelte sich auch in einer weiterführenden Arbeit von Haydar et al., in der die Pulswellengeschwindigkeit untersucht wurde. Es zeigte sich, dass in Relation zur CRP-Konzentration auch die Pulswellengeschwindigkeit stieg. Somit sind nicht nur das radiologisch ermittelte Ausmaß der vaskulären Kalzifikation, sondern auch die hämodynamischen Folgen der CRP-Konzentration proportional. [57] [58, 59]

1.6 CRP im akuten Myokardinfarkt

Neben der Möglichkeit, kardiovaskuläre Ereignisse vorherzusagen, können Pentraxine das Ausmaß und das Outcome von Patienten mit akutem Myokardinfarkt (AMI) vorhersagen. [50] Dies führte zu einer Diskussion darüber, ob sie tatsächlich nur als Epiphänomen zu betrachten, oder auch als ein aktiver Faktor wirksam sind. Zur Lösung dieser Frage trugen Pepys et al entscheidend bei. Sie zeigten zunächst, dass in Ratten mit akutem Myokardinfarkt die CRP-Gabe zu einer deutlichen Vergrößerung des Infarktareals mit sukzessiver Verschlechterung der kardialen Funktion führt. In weiteren Versuchen wurde eine effektive Antagonisierung des CRPs durch Phosphocholine erreicht. Hierdurch wurden auch die zuvor beobachteten Effekte, nämlich eine Vergrößerung des nekrotischen Gewebes und Verschlechterung der Pumpfunktion verhindert, was die eindeutige Zuordnung der beobachteten Effekte zum CRP erlaubt. [60] Erste Antworten auf die Frage, wie CRP zur Vergrößerung des Infarktareals führt, lieferten Yang et al. [61] In ihren Versuchen inkubierten sie kardiale Rattenmyozyten unter hypoxischen Bedingungen. Hierunter war zunächst eine Verschiebung von Cytochrom C aus den Mitochondrien in das Zytosol und eine Aktivierung verschiedener Kaspasen messbar. Weiterhin wurde eine erhöhte Konzentration an Bax sowie eine erniedrigte Konzentration an Bcl-2-mRNA festgestellt. Die Verschiebungen der Konzentrationen dieser intrazellulären Apoptoseregulatoren belegen eine erhöhte Apoptoserate der kardialen Myozyten.

In weiteren Versuchen wurde zu denselben Versuchsbedingungen CRP hinzugefügt. Im Ergebnis zeigte sich eine deutlich verstärkte Cytochrom c Translokation in das Zytosol, eine verstärkte Aktivierung der Kaspasen und ein erhöhter Bax / Bcl-2 Quotient. Unter normoxischen Bedingungen war hingegen keine erhöhte Apoptoserate messbar.

Aus diesen Ergebnissen kann also abgeleitet werden, dass unter Hypoxie in Gegenwart von CRP die Zahl der apoptotischen Zellen deutlich zunimmt. Unter normoxischen Bedingungen hat CRP keinen solchen Effekt.

1.6.1.1 CRP: Indikator oder Aktivator?

Diese starke Korrelation zwischen CRP-Level und Vaskulärer Kalzifikation und kardiovaskulären Ereignissen gibt Anlass zu Überlegungen darüber, ob das CRP tatsächlich nur ein guter Prädiktor ist, also lediglich als Epiphänomen der Inflammation

zu betrachten ist, oder ob es nicht doch einen kausalen Faktor darstellt und im Atheroskleroseprozesses eine aktive Rolle spielt. Sei es durch Aktivierung von Monozyten, sei es durch die Stimulation von glatten Muskelzellen. Erste Hinweise auf eine aktive Rolle hat es in in vitro Experimenten bereits gegeben.

1.6.1.2 Erste Hinweise auf direkte CRP-Effekte

So wurde in vitro ein direkter Effekt des CRP auf Monozyten bereits nachgewiesen. [32] Auf CRP reagieren diese nämlich mit einer Aktivierung und vermehrter Interleukinproduktion. Die Verwertbarkeit dieser Ergebnisse ist aber sehr umstritten, da die Interleukinproduktion möglicherweise durch kontaminierendes Endotoxin hervorgerufen wurde. Erste Hinweise auf eine direkte Wirkung des CRP auf glatte Muskelzellen zeigten auch Experimente, in denen die Expression verschiedener Gene, die für die Aktivierung zuständig sind. Dieser aktivierende Effekt wurde allerdings erst auf genetischer Ebene gezeigt. CRP aktiviert NF- κ B und diverse MAP-Kinasen, was zu einer Produktion von inflammatorischen Interleukinen führen könnte. [62]

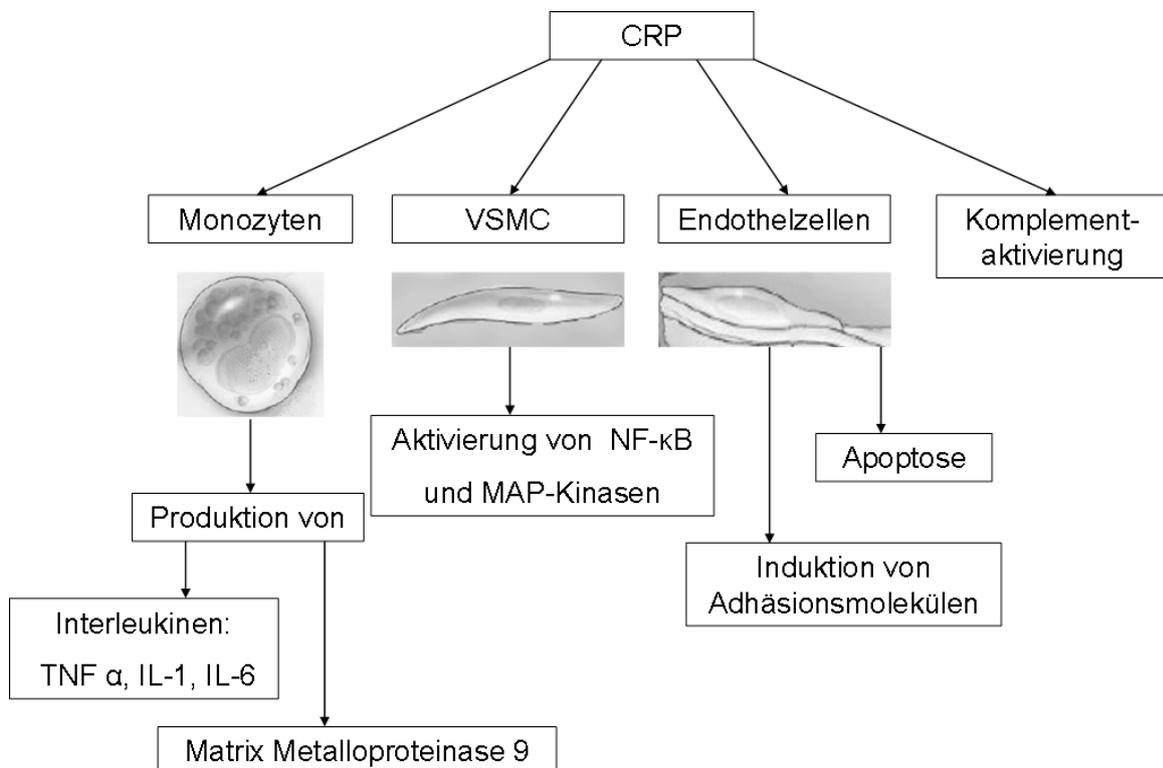


Abb. 1.9.: Effekte von CRP auf Monozyten, glatten Muskelzellen und Endothelzellen im Rahmen der Atherosklerose

Zwar sind dies erste Hinweise auf eine direkte Interaktion von CRP und VSMC. Allerdings steht der Nachweis eines tatsächlichen Effektes des CRP auf VSMC in Form von beispielsweise erhöhter Verkalkung oder Interleukinproduktion noch aus. Denn der Nachweis, dass bestimmte Gene angeschaltet oder Proteine produziert werden, birgt die Ungewissheit, dass diese Gene schnell wieder abgeschaltet werden, oder dass Transkriptionsfaktoren sofort wieder degradiert werden, bevor sie eine inflammatorische Wirkung überhaupt entfalten konnten. Auch mögliche Gegenregulationsmechanismen der Zelle bleiben hier unberücksichtigt. Ein tatsächlicher Nachweis, dass CRP Verkalkung induziert, steht also noch aus.

1.6.1.3 Endotoxin

In der Diskussion um die Rolle des CRP wird auch immer wieder das Endotoxin als kontaminierender Faktor erörtert. Im Zentrum der Kritik steht die Behauptung, dass nicht das CRP sondern tatsächlich kontaminierendes Endotoxin in unreinen Proben für die beobachteten vermeintlichen CRP-Effekte, wie SMC- und Monozytenaktivierung verantwortlich ist. Während die Fähigkeit des CRP als Prädiktor des kardiovaskulären Risikos gemeinhin akzeptiert wird, ist eine kausale Rolle des CRP höchst umstritten. In allen Experimenten, die CRP-Effekte untersuchen, ist also das Risiko einer Endotoxinkontamination unbedingt zu minimieren.

2 Fragestellung

Die enge Korrelation von CRP mit vaskulärer Kalzifikation, Inflammation und kardiovaskulären Ereignissen führte uns zu folgenden Fragen:

Induzieren CRP und PTX 3 die Kalziuminkorporation in glatte Muskelzellen und damit die Kalzifikation?

Haben sie einen regulierenden Einfluss auf die Expression des Kalzifikationsinhibitors MGP in glatten Muskelzellen?

Führen CRP und PTX 3 in Monozyten zur vermehrten Produktion proinflammatorischer Interleukine?

Sind die beobachteten Effekte unabhängig von eventuell kontaminierendem Endotoxin?

Um diese Fragen zu erörtern, etablierten wir ein in vitro Modell für vaskuläre Kalzifikation. Hierzu isolierten wir aus Nabelschnüren humane glatte Muskelzellen, in denen wir Verkalkung induzierten und CRP bzw. PTX 3 hinzugaben. Zur Kontrolle wurden die Zellkulturen auch mit Endotoxin inkubiert. Anschließend wurde mit mehreren Methoden das Ausmaß der Verkalkung untersucht.

Zur Untersuchung des Einflusses von Monozyten auf den Prozess der Atherosklerose isolierten wir Monozyten gesunder Probanden und stimulierten sie mit CRP oder PTX. Im Anschluss wurde die Produktion verschiedener Interleukine untersucht. Diese Versuche wurden mit Endotoxinantagonisten durchgeführt um Kontaminationseffekte zu vermeiden.

Ferner wurde die Konzentration an Lipopolysacchariden in CRP und Pentraxin 3 mehrfach bestimmt.

3 Material

3.1 Geräte

Agarosegel Elektrophoresekammern	Biorad, München
BGA-Gerät	Radiometer, Willich
Brutschrank	CO2 Brutschrank, Heraeus Instruments
Einbettautomat	Microm, Walldorf
Elektrophoresis PS 3500	Pharmacia Biotech, Freiburg
Entwicklermaschine 45 Compact	Protec, Oberstenfeld
GeneAmp PCR System 9700	PE Applied biosystems, Weiterstadt
Hypercenter XP	Shandon, Pittsburgh
Kryostat HM 500	Microm, Walldorf
Magnetrührer MR 3002 K	Heidolph, Radebeul
Mikroskop	Hund, Wetzlar
Mikrowelle	Bosch, Berlin
Minishaker MS1	IKA, Staufen
Photometer Ultrospec 2000	Pharmacia Biotech, Freiburg
Photometer MR 5000	MR 5000, Dynatech, Denkendorf
Speed Vac VR-I	Heto, Wettenberg
Sterilbank	Laminair HBB 248, Heraeus Instruments
Tiefkühltruhe C54285	New Brunswick Scientific, Edison
Ultrazentrifuge Ultra Pro 80	Sorvall, Berlin
Waage AE 260	Delta Range, Giessen
Zentrifuge	Eppendorf, Köln

3.2 Chemikalien

Agarose	Sigma, Taufkirchen
AMV Reverse Transcriptase	Promega, Mannheim
Boric Acid	Sigma, Taufkirchen
Bradfordkit	BioRad, München
CRP	R&D Systems, Wiesbaden
CRP	Calbiochem, Darmstadt

dATP, dCTP, dGTP, dTTP	Promega, Mannheim
Digoxigenin-11-dUTP	Boeringer Mannheim
DIG Luminescent Detection Kit	Boeringer Mannheim
Dulbecco's Medium ohne Glutamin	Biochrom AG, Berlin
Ethidiumbromid	Sigma, Taufkirchen
Fetales Kälberserum	Biochrom AG, Berlin
Ficoll	Sigma, Taufkirchen
Glutamin	Biochrom AG, Berlin
IL-1 β -ELISA Kit	Endgen, USA
IL-6-ELISA Kit	R&D Systems, Wiesbaden
Kalziumglukonat	Braun, Melsungen
Kalziumkit	Wako, Neuss
Kernechtrot	Roth, Karlsruhe
Limulus Amebocyte Lysate Test Kit	BioWhittaker, Maryland
LDH-Kit	Roche, Mannheim
LPS 055B5	Sigma, Taufkirchen
NaCl	Merck, Berlin
Natriumphosphat	Braun, Melsungen
Natriumthiosulfat	Laborchemie, Apolda
PBS	Gibco BRL, Paisley
Penicillin/Streptomycin	Biochrom AG, Berlin
Pentraxin 3	R&D Systems, Wiesbaden
Polymyxin B	Sigma, Taufkirchen
10x PCR Puffer	Gibco BRL, Paisley
Random Primers	Promega, Mannheim
Rneasy Mini Kit	Qiagen, Hilden
RPMI Medium	PAA Laboratories, Linz
Taq DNA Polymerase	Gibco BRL, Paisley
TNF α ELISA Kit	R&D Systems, Wiesbaden
Trizma Base	Sigma, Taufkirchen
Trizma HCl	Sigma, Taufkirchen
Trypsin	Roche, Mannheim
Tween 20	Sigma, Taufkirchen

Material

Silbernitrat	Merck, Darmstadt
Wasser	Ecotainer Melsungen
Primer	TIB Molbiol, Berlin

Primer	Basensequenz	Annealingtemperatur
MGP 5'	ATGAAGAGCCTGATCCTTCTT	55°C
MGP 3'	TCATTTGGTCCCTCGGCGCTT	55°C

3.3 Materialien

Chamber slides w. cover	Nunc, Rochester
Falconröhren	Becton Dickinson, Heidelberg
Falcon-Wellplatten	Becton Dickinson, Heidelberg
Falcon-Gewebekulturplatten,	Becton Dickinson, Heidelberg
Gel-blotting Papier 2/4 mm	Schleicher Schuell, Dassel
Filter	Nalgene, Rochester
Hybridization Transfer membrane	GeneScreen, Boston
Standardtips 10µl, 10µl, 1000µl	Eppendorf, Köln
Röntgenfilm X-OMAT AR	Kodak, Rochester
Pipetten Costar Stripettes	Sigma, Taufkirchen
PCR/ RT Reaction Tube	Perkin Elmer, Norwalk
Zellflaschen	Sarstedt, Nümbrecht

3.4 Puffer und Lösungen

Agarose-Gel	Nabelschnurpuffer
1,5 g Agarose 10 ml 10 x TBE 90 ml Aqua bidest	0,5 ml 40% Glucose 1 ml Penicillin/Streptomycin 98,5 ml PBS
Basenpaarstandard	20 x SCC
50 µl Marker bp 123 350 µl Aqua dest. 100 µl loading buffer	175,3 g NaCl 88,2 g Natriumcitrat 800 ml Aqua bidest
Ethidiumbromidlösung	Loading buffer
5 mg Ethidiumbromid 1 ml Aqua bidest	300 µl Typ IV Maniatis 100 ml Ethidiumbromidlösung
dNTP Mix für Reverse Transkription	dNTP Mix für PCR
10 µl ATP (100mM) 10 µl CTP (100mM) 10 µl GTP (100mM) 10 µl TTP (100mM) 960 µl Aqua dest	10 µl ATP (100mM) 10 µl CTP (100mM) 10 µl GTP (100mM) 10 µl TTP (100mM) 60 µl Aqua dest
Digoxigeninmarkierter dNTP Mix für PCR	10 x TBE
2 µl ATP (100 mM) 2 µl CTP (100 mM) 2 µl GTP (100 mM) 1 µl TTP (100 mM) 5 µl UTP (1 mM) 188 µl Aqua dest	108 g Tris-Base 55 g Boric Acid 40 ml 0,5 M EDTA pH 8 Aqua bidest ad 1000ml

4 Methoden

4.1 Isolation der glatten Muskelzellen

Die glatten Muskelzellen wurden aus frischen Nabelschnüren, die uns aus der Klinik für Geburtsmedizin des Virchowklinikums freundlicherweise zur Verfügung gestellt wurden, isoliert. Der Transport und die Aufbewahrung der Nabelschnüre erfolgten in Nabelschnurpuffer.

Die Isolation der glatten Muskelzellen erfolgte unter sterilen Kautelen unter einer Sterilbank. Nach sorgfältiger Säuberung der Nabelschnur mit Desinfektionsspray wird die großlumige Vene mit Hilfe einer Knopfkanüle dargestellt und im Verlauf disseziert, so dass die gesamte innere Gefäßwand sichtbar wird.

Das Gefäß wird auf einem Styroporblock mithilfe von Kanülen mit der luminalen Seite nach oben fixiert. Nun wischt man mit einer sterilen Kompresse über die Gefäßwand, so dass die dünne Endothelzellschicht entfernt wird und die glatten Muskelzellen nun oben auf liegen. Diese Zellschicht wird mit einem Skalpell inzidiert und in kleinen Quadraten abpräpariert. Diese kleinen Zellstücke werden mit der luminalen Seite nach unten in Zellkulturplatten (3-5 Zellstücke / Platte) gelegt, und mit Dulbecco's Medium mit 15% FKS, 1% Glutamin und 1% Penicillin/Streptomycin bei 37°C inkubiert.

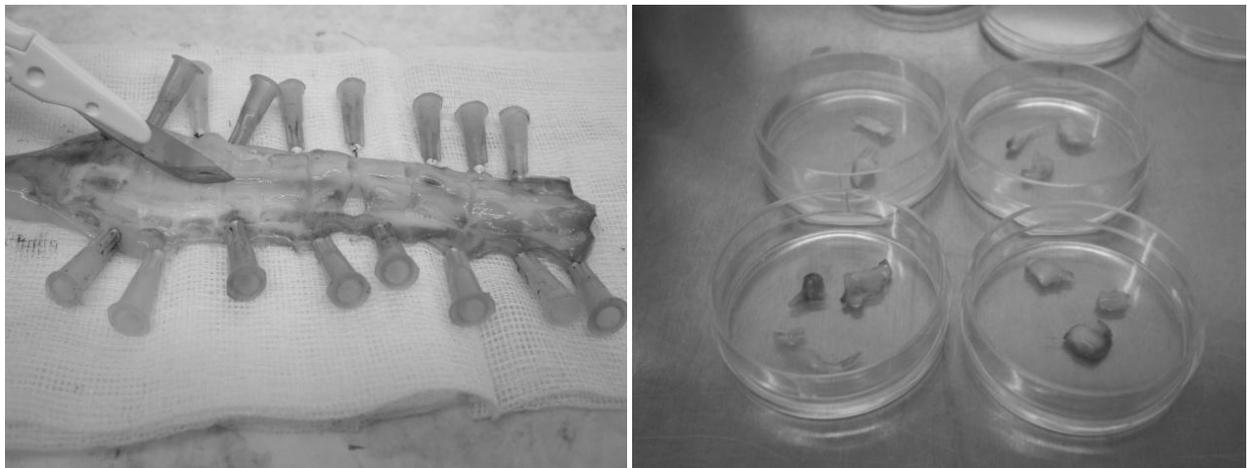


Abb. 4.1: Isolation glatter Muskelzellen aus Nabelschnüren

Nach einer Woche wird der erste Mediumwechsel durchgeführt, außerdem werden die Zellen unter dem Mikroskop inspiziert. Sobald von einem Gewebestück so viele glatte Muskelzellen ausgesprosst sind, dass es von Zellen umgeben ist, kann dieses Stück

entfernt werden. Ist eine Platte konfluent, so werden diese Zellen trypsinisiert. Hierzu wurden sie zunächst mehrfach mit PBS gespült und mit 1 ml Trypsin (10%) bei 37°C inkubiert, so dass sich die humanen glatten Gefäßmuskelzellen vom Untergrund der Zellkulturflaschen lösten. Nach 5 Minuten wurde die Reaktion durch Zugabe von 19 ml Medium gestoppt. Die Zellen befanden sich nun im Medium und konnten auf Wellplatten oder in Flaschen inkubieren, so dass nun Versuche damit gemacht werden können. Die Zellen wurden jeweils maximal bis zur 5. Passage verwendet.

4.2 Inkubation VSMC

Die trypsinisierten Zellen einer Flasche wurden in 6-Wellplatten verteilt (2ml/Well), und wiederum bis zur Konfluenz mit dem schon zuvor verwendeten Medium inkubiert.

4.2.1 Anfertigung eines Kalzifikationsmediums

Um in den VSMC Verkalkung zu induzieren, versetzten wir das übliche Medium mit 2 mmol/l Phosphat. Um in dem Medium eine Kalziumkonzentration von ebenfalls 2 mmol / l zu erreichen, wurde Kalziumglukonat in 500 µl - Schritten hinzutitriert und jeweils anschließend die Kalziumkonzentration in einem Blutgasanalyse-Gerät bestimmt. Das Medium wurde vor jedem Mediumwechsel neu angefertigt, um das Risiko pH-bedingter Kalziumwertschwankungen zu minimieren.

Sobald die Zellen in den 6-Wellplatten konfluent gewachsen waren, wurden fünf Wells mit dem Kalzium-Phosphatmedium versehen. Lediglich ein Well wurde mit Kontrollmedium ohne zusätzliches Kalzium oder Phosphat inkubiert. Anschließend wurden noch die verschiedenen Mengen CRP und PTX 3 in die einzelnen Wells hinzupipettiert.

Nach 48 Stunden wurde das Medium abgesaugt, die Zellen mit 500 µl 0,6 N HCl versehen und für 24 h bei 4°C dekalzifiziert. Anschließend wurden die HCl-Überstände in Eppendorfgefäße überführt, um die Kalziumkonzentration darin zu messen.

4.3 Kalziummessung

Die Messung der Kalziumkonzentration in den HCl-Überständen erfolgte mithilfe des Kalziumkits der Firma Wako. Die im Kit enthaltenen Reagenzien enthalten den o-

cresolphthalein-Komplex, der nach Bindung an Kalzium eine violette Farbe annimmt. Die durch das o-cresolphthalein produzierte Farbintensität ist dabei dem Kalziumgehalt der Probe proportional. Die Kalziumkonzentration kann durch Messung der Absorption bei 570 nm photometrisch bestimmt werden.

4.4 Proteinmessung

Um ein Maß dafür zu haben, wie viele Zellen in den Wells waren, wird zusätzlich der Proteingehalt pro Well bestimmt. Nach Abnahme der HCl-Überstände werden die Zellen mithilfe von 0,1 N NaOH mit 0,1 % SDS lysiert. In diesen NaOH-Überständen wird mithilfe der Bradfordmethode die Proteinkonzentration gemessen, um die gemessenen Kalziumwerte dazu in Bezug setzen zu können.

Hierzu wird zu jeder Probe das Bradfordreagenz hinzupipettiert, woraufhin sich die Probe bläulich verfärbt. Die Farbintensität ist auch hier der Konzentration proportional. Die Absorption der Proben wird bei 595 nm photometrisch bestimmt. Die gemessenen Werte werden mit den Absorptionswerten der standardisierten Proben verglichen. Anhand dessen errechnet das Photometer die Proteingehalte der verschiedenen Proben aus. Mit den Proteinwerten hat man nun einen Parameter für die Anzahl der in den Wells befindlichen Zellen, auf den man die Kalziumwerte nun beziehen kann. Damit sind die gemessenen Werte von Schwankungen, die durch unterschiedliche Zellzahlen bedingt sein könnten, unabhängig.

4.5 Von Kossa Färbung

Zum Nachweis der Kalzifikation der VSMC färbten wir die Zellen mit der Von Kossa-Methode. Diese Technik ist zur Demonstration von Kalziumablagerungen gut geeignet. Hierzu wurden die Zellen allerdings nicht auf Wellplatten, sondern auf Objektträgern mit „Zellkammern“ inkubiert. Ansonsten erfolgte die Inkubation auf die oben beschriebene Weise für zehn Tage. Anschließend wurde zunächst das Medium, dann die Kammern auf den Objektträgern entfernt, so dass lediglich die Zellen auf den Objektträgern blieben.

Anschließend wurden die Zellen mit der Von Kossa-Methode gefärbt. Das genaue Färbeprotokoll lautete wie folgt:

Objektträger in absteigende Alkoholreihe geben:

2 x 100 % Alkohol

1 x 96 % Alkohol

1 x 80 % Alkohol

1 x 70 % Alkohol,

jeweils 2 min

3. In Aqua dest. kurz spülen

4. Färben in 3%iger wässrigen Silbernitratlösung im Dunkeln *5 min*

5. 3 x Spülen in Aqua dest.

6. Reduzieren in Natrium- Formaldehydlösung *2 min*

7. Wässern in Leitungswasser *10 min*

8. Fixieren in 5% Natriumthiosulfatlösung *5 min*

9. Wässern in Leitungswasser *10 min*

10. Spülen in Aqua dest. *kurz*

11. Färben mit Kernecht-Rot *8 min*

12. Spülen in Aqua dest. *kurz*

13. Entwässern in aufsteigender Alkoholreihe:

1 x 80 % Alkohol

1 x 96 % Alkohol

2 x 100 % Alkohol,

jeweils kurz

14. Entfetten in Xylol, Vorbereitung zur Eindeckung *2 x 5 min*

4.6 LDH-Messung in Überständen

Zur Messung der Laktatdehydrogenase wurden weitere Inkubationsversuche mit VSMC durchgeführt wie oben beschrieben. Hierzu allerdings wurden die Zellen bis maximal fünf Tage inkubiert. Mediumwechsel wurde an Tag 0 und Tag 2 durchgeführt. Die zuvor aus den Wells entnommenen Überstände wurden zunächst bei -20°C tiefgefroren. Als Positivkontrolle lagerten wir eine Zellkulturplatte für 24h bei -20°C. Dies führt zur Lyse vieler Zellen, so dass die in den Überständen bestimmten LDH-Werte deutlich erhöht sind.

Zur Bestimmung der LDH-Konzentration am folgenden Tag wurde das LDH-Kit der Firma Roche verwendet.

Hierbei werden 100µl einer Probe mit 100 µl eines mitgelieferten Reagenzes versetzt und die Absorption photometrisch bei nm bestimmt. Nach Vergleich mit einem ebenfalls mitgelieferten Standard wird die Konzentration errechnet.

4.7 Inkubation VSMC mit PTX3 und CRP zur RNA-Messung

Zur Untersuchung der Auswirkungen des CRP und des PTX 3 auf das Genmilieu glatter Muskelzellen wurden glatte Muskelzellen in Zellkulturflaschen bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Nachdem die Zellen bis zur Konfluenz gewachsen waren, wurden zunächst alle Zellkulturen für 24h mit FKS-freiem Medium inkubiert. Anschließend wurde eine der Flasche mit Kontrollmedium, und drei mit dem Kalzifikationsmedium, von welchen zwei zusätzlich CRP oder PTX enthielten, versetzt. Die Zellen inkubierten jeweils 24h.

4.8 RNA-Isolation

Nach 24stündiger Stimulation der glatten Muskelzellen, wurde das Medium abgesaugt und die Zellen mit 100µl Mercaptoethanol in 1ml RLT Puffer lysiert und in Eppendorfgefäße überführt. Das Lysat wurde bei -80°C aufbewahrt.

Die RNA-Isolation erfolgte mit dem RNA-Kit der Firma Qiagen. Zunächst werden die Lysate bei 13000 Umdrehungen pro Minute für drei Minuten zentrifugiert, so dass die festen Zellbestandteile absinken. Die Überstände und die darin gelöste RNA werden auf zwei neue Eppendorfgefäße aufgeteilt und mit 500µl 70%igen Ethanol versetzt und anschließend in RNeasy spin columns überführt. Diese Gefäße bestehen aus einem Filter mit einem darunter befindliches Auffanggefäß. Nach 15sekündiger Zentrifugation bei 10000 Umdrehungen befindet sich die RNA in dem Filter und die restliche Flüssigkeit in dem Auffanggefäß, was nun entleert wird. Anschließend wird auf die Filter 500µl RW1 Puffer zur Säule hinzugegeben, wiederum bei 10000 rpm zentrifugiert und der Durchfluss entsorgt. Nun wird nach der Zugabe von 500µl RPE-Puffer ebenso verfahren. Abschließend wird ein weiteres Mal 500µl RPE-Puffer hinzupipettiert und diesmal für 4 Minuten bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert.

Nun werden die Filter entnommen, in neue Eppendorfgefäße gesetzt und mit 50 µl RNase freien Wasser versetzt. Nach fünfminütiger Zentrifugation bei 10000 rpm befindet sich die RNA in dem Eppendorfgefäß. Der RNA-Gehalt kann nun mit einem Photometer bei 280 nm gemessen werden. Nach Einstellung der RNA auf 0,1µg/ml

mittels Präzipitation kann anschließend mit der Reversetranskription der RNA in cDNA fortgeföhren werden.

4.9 Reverse Transkription

Ziel dieser Methode ist es, die gewonnene RNA in cDNA umzuschreiben, die dann mittels PCR amplifiziert werden kann. Zur Vermeidung einer Kontamination wurden alle nun erfolgten alle weiteren Schritte in eigens für PCR eingerichteten Arbeitsbereichen unter sterilen Kautelen, mit puderfreien Handschuhen durchgeführt. Alle im Folgenden aufgelisteten Schritte erfolgten mit sterilen Pipetten, in 0,5 ml Eppendorfröhren und auf Eis. Für die Reverse Transkription wurden 0,1µg Gesamt-RNA verwendet. Alle Reaktionen wurden in Ansätzen von 30µl in Eppendorfgeföhßen in einem Thermocycler der Firma Gene Amp gemäß folgendem Ansatz durchgeführt:

Reagenz	Konzentration	Endkonzentration	Volumen
RNA	0,1 µg/µl	1 µg	10 µl
Random primer	50 µM	5 µM	2 µl
dNTP Mix I	10 mM	1 mM (jeweils)	2 µl
5xReaktionspuffer	250 mM TRIS 250 mM KCl 50 mM MgCl ₂ 50 mM DTT	250 mM 250 mM 50 mM 50 mM	4 µl
UF H ₂ O			1,75 µl
R.-Transkriptase	5 U / µl	1,25 U	0,25 µl
Endvolumen			20 µl

Die RNA wird am Thermocycler dann mittels folgenden Programms transkribiert:

30 Minuten bei 42°C; 5 Minuten bei 95° C; Abkühlen auf 4°C.

Nach Beendigung des Programms werden weitere 80µl ultrafiltrierten Wassers hinzupipettiert. Die cDNA kann bei -20°C gelagert werden.

4.10 PCR und Detektion

Die nun gewonnene cDNA kann nun mittels Polymerasekettenreaktion amplifiziert werden. Alle PCRs wurden mehrfach durchgeführt, um die Reproduzierbarkeit der Resultate zu gewährleisten. Alle PCRs wurden in Ansätzen von 30 µl in Eppendorfgefäßen in einem Thermocycler der Firma Gene Amp gemäß folgenden Ansatzes durchgeführt:

Reagenz	Konzentration	Endkonzentration	Volumen
cDNA	0,01 µg/µl	50 µg	5 µl
MgCl ₂	50 mM	2 mM	1,2 µl
dNTP Mix II	Jeweils 10 mM dATP, dCTP, dGTP, und dTTP	10mM	3 µl
10 x Puffer	500 mM Tris 100 mM TRIS 1 % Triton X	50 mM 10 mM 0,1%	3 µl
Primer	10µM	0,2MM	Je 0,6 µl
Taq Polymerase	5 U / µl	1,25 U	0,25 µl
UF H ₂ O			16,35 µl
Endvolumen			30 µl

Ein für diese Arbeit typisches verwendetes Programm sei am Beispiel der GAPDH demonstriert:

- I. 5 Min 94°C, 1 Min 56°C, 1 Min 72°C –ein Zyklus
- II. 1 Min 94°C, 1 Min 56°C, 1 Min 72°C –25 Zyklen
- III. 1 Min 94°C, 10 Min 56°C, -ein Zyklus

Abkühlen auf 4°C

Dieses PCR-Programm wurde für folgende Primer verwendet: GAPDH, MGP.

4.11 Agarosegel Elektrophorese

Die Elektrophorese von DNA erfolgt in horizontaler Lage in einem 1 x TBE-Puffer.

100 ml 1x TBE-Puffer werden mit 1,5g Agarose versetzt und anschließend in der Mikrowelle 3 Minuten gekocht. Unter permanentem Rühren lässt man die Lösung abkühlen und pipettiert bei ca. 60° C 10µl Ethidiumbromid (5 mg/ml)hinzu. Anschließend wird das Gel in eine Elektrophoresekammer, in der sich zwei Kunststoffkämme befinden, gegossen. Nach einer Stunde ist das Gel in die feste Form übergegangen und kann, nachdem die Kämme entfernt wurden, mit 1xTBE Puffer überschichtet werden.

Nun werden 10µl des PCR-Produktes mit 3µl Loading buffer versetzt und vorsichtig in die im Gel befindlichen Taschen pipettiert. In die erste Tasche wird ein Längenstandard pipettiert, dessen Abstände je 123 kbp entsprechen.

Das Gel läuft nun für eine Stunde bei 125 mV und ca. 85 mA. Anschließend wird das Gel unter UV-Licht der Wellenlänge 265 nm photographiert. Zur besseren Auswertung wurde das Gel anschließend auf eine Nylonmembran geblottet.

4.12 Blotten

Der Kapillartransfer dient der dauerhaften Fixierung der im Rahmen der RT-PCR gewonnenen Amplifikate. Er erfolgt in einer mit 20x SCC Puffer gefüllten Wanne über Nacht gemäß folgendem Aufbau:

- Gewicht
- Glasgestell
- Papierhandtücher
- 5x2 mm Gel-blotting-Papier
- Parafilmrahmen
- Nylonmembran
- umgedrehtes Gel
- 5 x 4 mm Gel-blotting-Papier
- Wanne mit 20x SCC Puffer

Um die DNA dauerhaft auf der Membran zu fixieren, wird im UV-Crosslinker eine kovalente Bindung der DNA an die positiv geladene Nylonmembran durch 3-minütige Bestrahlung mit UV-Licht hergestellt. Der vollständige Transfer der DNA vom Gel auf die Membran kann unter UV-Licht kontrolliert werden. (Das Gel sollte keine Banden mehr zeigen.) Die Membran sollte bis zur Detektion trocken bei 4°C gelagert werden.

4.13 Detektion

Ziel der Detektion ist der Nachweis der DNA, die mit Digoxigenin markiert wurde. Hierfür wird ein Anti-Digoxigenin-Alkalische-Phosphatase konjugierter Antikörper, dessen spezifische Bindung mittels eines lichtemittierenden Substrates nachweisbar ist, verwendet. Die Lichtemission erfolgt bei einer Wellenlänge von 477 nm. Durch Belichtung eines Fotofilms erfolgen die Dokumentation und die weitere Auswertung.

Die Detektion erfolgt nach folgendem Protokoll:

Membran für 5 Minuten in Waschpuffer geben

Membran für 30 Minuten in Blocking solution geben

Membran für 30 Minuten in Anti-Digoxigenin-Alkalische-Phosphatase konjugierte Antikörper-Lösung geben (Verdünnung 1:10000, als Verdünnungsmethode blocking solution nehmen)

Membran für 30 Minuten in Waschpuffer geben

Membran für 5 Minuten im Detektionspuffer äquilibrieren.

Membran für 2 Minuten in CSPD geben

Membran in Frischhaltefolie wickeln und für 10 Minuten im Brutschrank bei 37°C inkubieren

Belichten des Filmes in der Dunkelkammer je nach Intensität der Lichtemission, anschließend Entwicklung des Filmes

Anschließend werden zur semiquantitativen Auswertung die Filme eingescannt und mithilfe des Bildbearbeitungsprogramms Scion Image analysiert. Hierbei werden die optischen Dichtewerte der Banden der verschiedenen Versuche gemessen und daraus Mittelwerte gebildet. Die Konzentration in der Kontrolle wurde als 100 % festgesetzt und die anderen Konzentrationen wurden jeweils darauf bezogen.

4.14 Monozytenisolation

Die Isolation von Monozyten erfolgte durch das Verfahren der Dichtegradientenzentrifugation. In diesem Verfahren werden verschiedene Zelltypen aufgrund ihrer Schwebedichte getrennt. Zur Trennung der Monozyten verwendeten wir als Trennlösung Ficoll, welches ein synthetisches Polymer aus Saccharose ist. Hierzu wurden zunächst sieben freiwilligen, gesunden Probanden jeweils 20-30 ml venöses Blut unter sterilen Kautelen abgenommen und mit Heparin versetzt. Das Blut wurde auf zwei 50 ml Falconröhrchen aufgeteilt und hierin mit isotoner Kochsalzlösung auf 35 ml aufgefüllt. Anschließend wurde eine mit 15 ml Ficoll gefüllte 15 ml Pipette in das Falconröhrchen gestellt, so dass sich das Ficoll durch hydrostatischen Druck am Grund des Falconröhrchens verteilte.

Nun wurden die Falconröhrchen für 30 Minuten bei 1200 Umdrehungen pro Minute in einer Zentrifuge (Eppendorf) zentrifugiert. Während der Zentrifugation ordneten sich die Bestandteile des Vollblutes von oben nach unten folgendermaßen an:

- › Kochsalzlösung
- › Monozytenring
- › Ficolllösung
- › Erythrozyten

Anschließend wurde der Monozytenring abpipettiert und wiederum in ein 50 ml Falconröhrchen überführt, was wiederum mit Kochsalzlösung auf 50 ml aufgefüllt wurde.

Nach erneuter 10-minütiger Zentrifugation bei 10000 rpm befinden sich die Zellen schließlich im Pellet, der Überstand kann verworfen werden. Nun werden die Zellen in RPMI-Medium resuspendiert. Dieses wurde zuvor mit 1% Penicillin und Streptomycin sowie 1 % Glutamin versetzt und anschließend sterilfiltriert.

Dann wurden die Zellen in Trichloressigsäure (0,3 N) zehnfach verdünnt und anschließend in einer Zählkammer ausgezählt.

4.15 Monozytenstimulation

Die Monozytenstimulationsversuche erfolgten in 12-Wellplatten. Diese wurden mit oben genanntem Medium mit absteigenden PTX 3-, CRP- bzw. LPS- Konzentrationen versehen und eine durch Zellzählung zuvor ermittelte Zahl isolierter Monozyten wurde hinzupipettiert.

Die Zellen wurden dann 24h bei 37°C, 5% CO₂ inkubiert und anschließend bei -20°C gelagert. Durch den Gefrierprozeß wird ein Großteil der Zellen lysiert.

4.16 ELISA

Prinzip eines ELISA

Zuerst wird der Antikörper gegen das nachzuweisende Antigen zunächst auf einer Mikrotiterplatte immobilisiert. Nach der Blockierung unspezifischer Bindungsstellen wird das Antigen hinzugefügt und während einer Inkubation gebunden. Im nächsten Schritt wird ein weiterer, gegen das Antigen gerichteter Antikörper hinzugegeben, der mit einem Enzym gekoppelt ist. Die Zugabe eines Substrates setzt eine Enzymreaktion in Gang, mit der das farblose Substrat in ein farbiges Produkt überführt wird. Die entsprechenden Produkte werden dann kolorimetrisch bestimmt. Die Extinktion der entstehenden Farblösung ist proportional zur Konzentration des Proteins in der Probe und damit ein Mittel zur quantitativen Proteinbestimmung einer Probe.

Bestimmung von IL-1, IL-6 und TNF α

Die IL-1-, IL-6- und TNF α -Konzentrationen wurden mittels hochsensitiven ELISA (R&D Systems) bestimmt. Die benötigten Chemikalien sind in den jeweiligen Kits enthalten.

Der 1. Antikörper wird 1:180 mit PBS verdünnt und dann eine 96-well Mikrotiterplatte mit 100 μ l pro well precoated. Die Platte wird mit Parafilm versiegelt und inkubiert bei Raumtemperatur über Nacht. Danach wird die Platte ausgeklopft und mit 400 μ l des mitgelieferten Waschpuffers (0,05% Tween 20 in PBS, pH 7,2-7,4) gewaschen. Der Vorgang wird zweimal wiederholt, insgesamt also 3 Waschgänge. Die Platte wird durch Zugabe von 300 μ l Reagenzlösung (1% BSA in PBS, pH 7,2-7,4) in jedes well geblockt. Die Platte inkubiert mindestens eine Stunde bei Raumtemperatur. Die Platte wird erneut ausgeklopft und dreimal mit Waschpuffer gewaschen.

Nun werden Standard und Proben aufgetragen. Für die Verdünnungsreihe wurde der Standardstock mit Reagenzlösung auf 600 pg / ml verdünnt und davon 100 μ l in die Näpfe A1 und A2 pipettiert. In 6 Verdünnungsschritten mit jeweils 50 μ l der vorigen Verdünnung und 50 μ l Reagenzlösung wurde eine Verdünnungsreihe in doppelter Ausführung erstellt. Das letzte Well der Reihen 1 und 2 ist der Leerwert und enthält daher nur Reagenzlösung. Von den Proben werden jeweils 100 μ l in die wells pipettiert. Anschließend wird die Platte für 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert.

Die Platte wird erneut ausgeklopft und dreimal mit Waschpuffer gewaschen. Danach werden 100 μ l des 2. Antikörpers, der mit Reagenzlösung 1:180 verdünnt ist, in jedes

Well pipettiert und die Platte für 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Die Platte wird erneut ausgeklopft und dreimal mit Waschpuffer gewaschen.

Jetzt werden 100µl des mitgelieferten Streptavidinkomplexes in jedes Well pipettiert und die Platte für 20 Minuten bei Raumtemperatur im Dunklen inkubiert. Die Platte wird erneut ausgeklopft und dreimal mit Waschpuffer gewaschen. In jedes well werden 100 µl TMB-Lösung pipettiert und die Platte für 20 Minuten bei Raumtemperatur im Dunklen inkubiert.

Die Farbreaktion wird mit 50 µl 2 N Schwefelsäure pro well gestoppt. Die Messung der optischen Dichte erfolgt bei einer Wellenlänge von 450 nm mit einer Referenzwellenlänge von 570 nm.

4.17 Endotoxinmessung

Der Endotoxingehalt wurde mehrfach sowohl im C-reaktiven Protein als auch im Pentraxin 3 bestimmt. Hierzu wurde der Limulus Amebocyte Lysate Test Kit der Firma BioWhittaker verwendet, welcher ein quantitativer Test für gram-negative bakterielles Endotoxin ist und die Endotoxinkonzentration mit einer Sensitivität von 0,125 EU bestimmt. Hierzu werden 50 µl einer zu untersuchenden Probe mit LAL Reagenz in pyrogenfreien Teströhrchen gemischt und für 10 Minuten bei 37°C inkubiert. Nach Zusatz von 100µl Substratlösung wird die Probe bei 37°C für weitere sechs Minuten inkubiert. Die Reaktion wird dann mithilfe eines Stopreagenz beendet. Bei Präsenz von Endotoxin in der Probe nimmt diese eine gelbe Farbe an. Die Absorption der Probe wird schließlich bei 405-410 nm photometrisch bestimmt. Diese Absorption ist der Endotoxinkonzentration proportional, so dass diese anhand einer Standardkurve errechnet werden kann.

4.18 Statistik

Die statistische Auswertung der Resultate erfolgte mithilfe des Softwareprogramms InStat der Firma GraphPad Software. Die in dieser Arbeit dargestellten Resultate sind dargestellt als Durchschnitt \pm SEM. Unterschiede wurden mit dem Mann-Whitney Test verglichen. Ein p-Wert von $< 0,05$ wurde hierbei als signifikanter Unterschied gewertet.

5 Ergebnisse

5.1 Kalziumkonzentrationen

Die Hauptfrage dieser Doktorarbeit war die Frage, ob die Akutphaseproteine CRP und PTX 3 in humanen glatten Muskelzellen Kalzifikation induzieren.

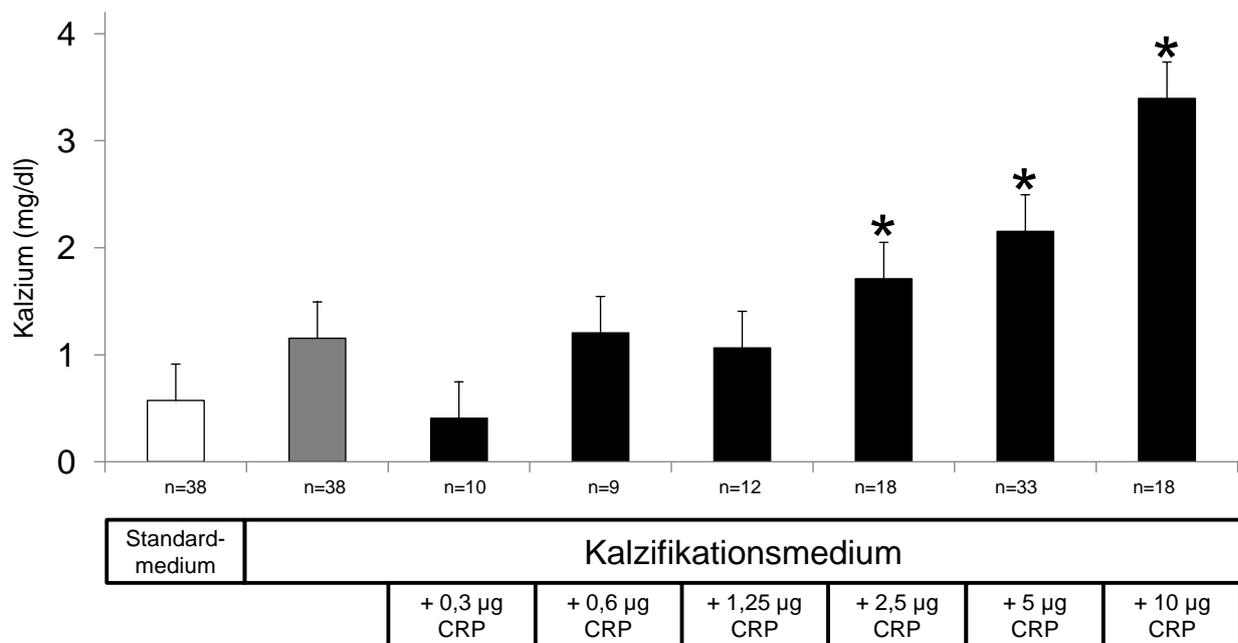
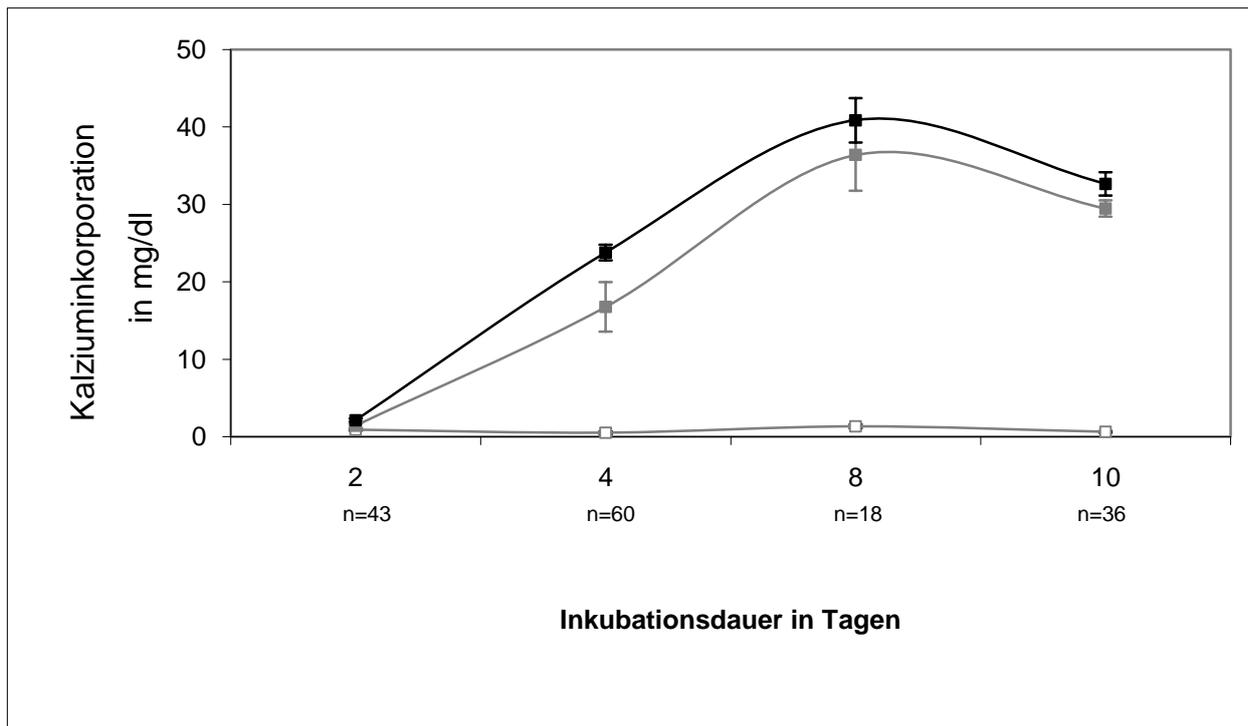


Abb. 5.1. Kalziuminkorporation in glatten Muskelzellen nach Inkubation mit verschiedenen Medien für jeweils zwei Tage. Die Verwendung von Kalzifikationsmedium (Grau) führt bereits zu einem signifikanten Anstieg der Kalziuminkorporation. Durch die weitere Zugabe von CRP (Schwarze Balken) wird ein weiterer signifikanter Anstieg der Kalziuminkorporation erreicht. * = $p < 0,05$ im Vergleich zur Kontrolle (Grau).

Die Graphik zeigt, dass die alleinige Inkubation von VSMC mit Kalzifikationsmedium (Grau) zu einem statistisch signifikanten Anstieg in der intrazellulären Kalziumkonzentration gegenüber derjenigen der mit herkömmlichen Medium (Weiß) inkubierten Zellen führt. Entscheidend jedoch ist, dass die zusätzliche Inkubation mit CRP dosisabhängig zu einem weiteren Anstieg in der intrazellulären Kalziumkonzentration führte. Bereits eine CRP-Konzentration von 2,5 µg/dl führte hier bereits zu einem deutlichen Anstieg in der durchschnittlichen intrazellulären Kalziumkonzentration von 1,15 auf 1,71 mg/dl. Statistische Signifikanz gegenüber der Kalziumkonzentration der mit Kalzifikationsmedium inkubierten glatten Muskelzellen erreicht dieser Anstieg bereits bei einer CRP-Konzentration von 5 µg/ml. Die

durchschnittliche Kalziumkonzentration betrug hier 2,15 mg/dl. Die Inkubation der Zellen mit 10 µg/ml CRP führte dann zu einem weiteren Anstieg der Kalziumkonzentration auf 3,1 mg/dl, was ebenfalls statistisch signifikant war gegenüber der Kalziumkonzentration in den mit Kalzifikationsmedium inkubierten Zellen.

Die Verkalkung wurde zu verschiedenen Zeitpunkten untersucht. Für die Zellen, die mit Kalzifikationsmedium inkubiert wurden, zeigt die Kinetik, dass die gemessenen Kalziumkonzentrationen bis zum achten Tag ansteigen und schließlich wieder abfallen.



— □ —	— ■ —	— ■ —
Standardmedium	Kalzifikationsmedium	
		+ 5 µg CRP

Abb.5.2

Kalziuminkorporation in glatte Muskelzellen nach Inkubation mit (schwarz) und ohne (grau) CRP. Messung nach 2, 4, 8 und 10 Tagen. Die Inkubation mit Kalzium und Phosphat führt zu einem Anstieg der Kalziumkonzentration, der Zusatz von CRP führt zu einem weiteren Anstieg.

Auch die Inkubation mit Pentraxin 3 führte in den Zellkulturen zu einer Verstärkung der Kalziuminkorporation in VSMC. (s. Abb. 5.3). Nach Zusatz von 1 µg/ml PTX 3 zu dem Kalzifikationsmedium war ein Anstieg der durchschnittlichen Kalziumkonzentration von 1,15 mg/dl auf 2,32 mg/dl messbar.

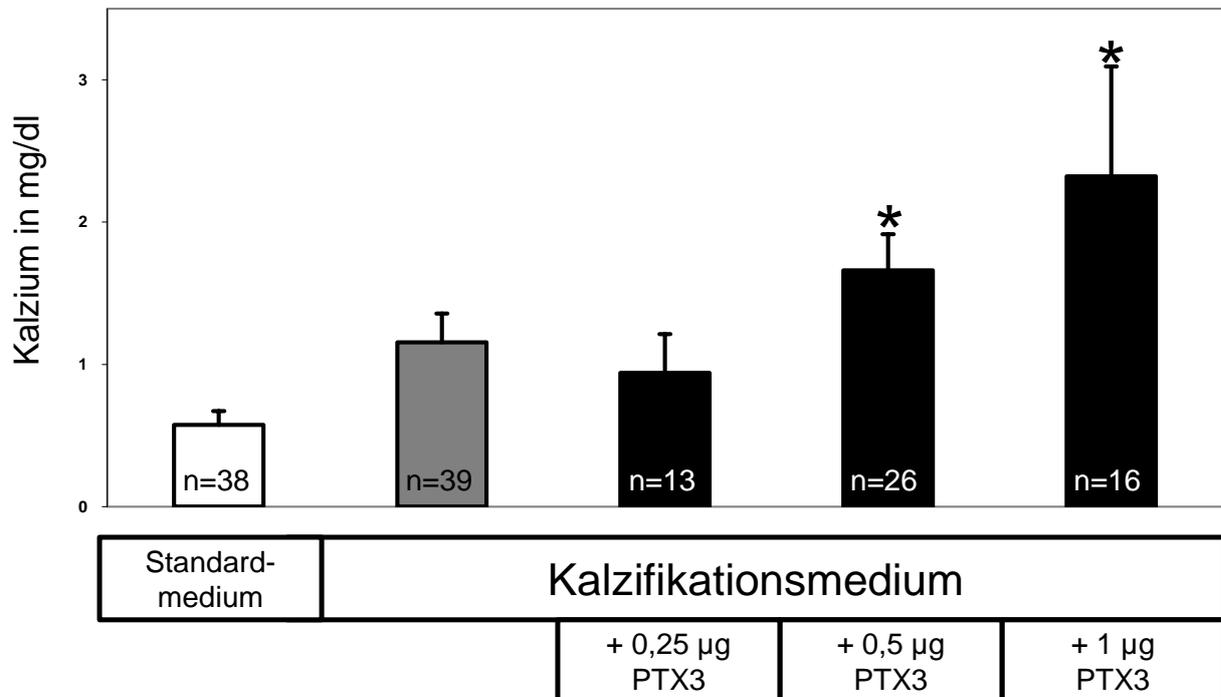
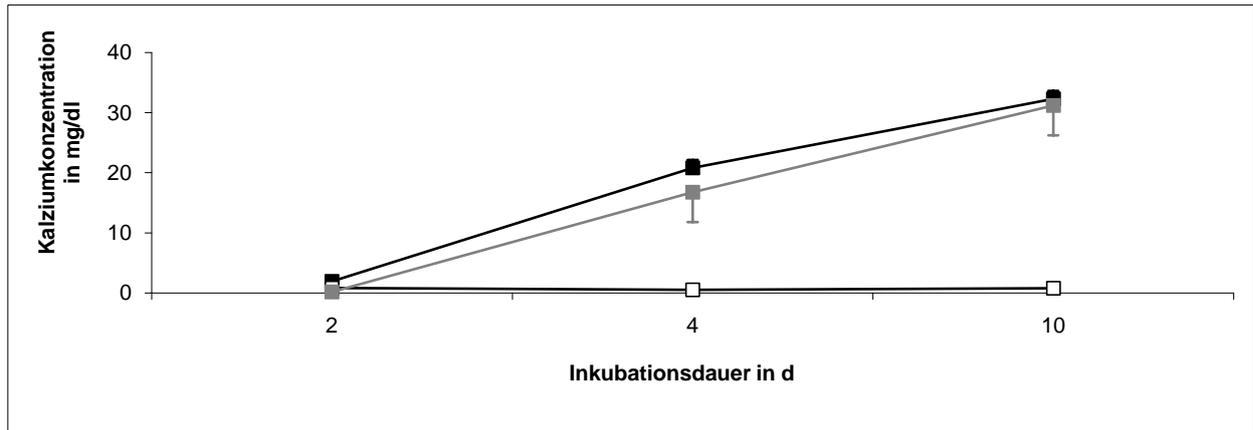


Abb. 5.3 Kalziuminkorporation in glatten Muskelzellen nach Inkubation mit Pentraxin für jeweils zwei Tage. Die Verwendung von Medium mit Zusatz von Phosphat und Kalzium (Grauer Balken) führt bereits zu einem signifikanten Anstieg der Kalziuminkorporation. Durch die weitere Zugabe von PTX (schwarz) wird ein weiterer Anstieg der Kalziuminkorporation erreicht. * = $p < 0,05$ im Vergleich zur Kontrolle (grau).



—□—	—■—	—■—
Standardmedium	Kalzifikationsmedium	
		+ 0,5 µg PTX

Abb.5.4

Kalziuminkorporation in glatte Muskelzellen nach Inkubation mit (schwarz) und ohne (grau) PTX. Messung nach 2, 4 und 10 Tagen. Die Inkubation mit Kalzium und Phosphat führt zu einem Anstieg der Kalziumkonzentration, der Zusatz von CRP führt zu einem weiteren Anstieg. (2d: n=39, 4d: n= 56, 10d: n=32)

Um Schwankungen der Zellzahlen als kausalen Faktor auszuschließen, wurde bei den Versuchen auch der Proteingehalt in den Wells bestimmt und die Kalziumkonzentrationen hierauf bezogen. Die Proteingehalte waren insgesamt sehr konstant, so dass sich auch bei Berücksichtigung des Proteingehaltes der Wells die gleichen Resultate ergaben. Von großen Schwankungen der Anzahl der in den Wells enthaltenen Zellen ist also nicht auszugehen. Die starken Zunahmen der Kalziumkonzentrationen sind als ein deutlicher Hinweis auf die eigenständige kalzifikationsinduzierende Wirkung dieser beiden inflammatorischen Proteine, CRP und PTX3, zu werten. Dies wird gestützt durch die offenbar dosisabhängige Wirkung von CRP und PTX 3 auf die Verkalkung der Zellen.

Um zu untersuchen, ob der kalzifizierende Effekt durch kontaminierendes, eventuell in den CRP- oder PTX3- Proben vorhandenes Endotoxin verursacht sein könnte, wurden erneut VSMC mit Kalzifikationsmedium inkubiert, welches entweder CRP oder LPS enthielt. Während das CRP erneut Verkalkung herbeiführte, brachte das LPS auch in sehr hohen Konzentrationen keinen solchen Effekt.

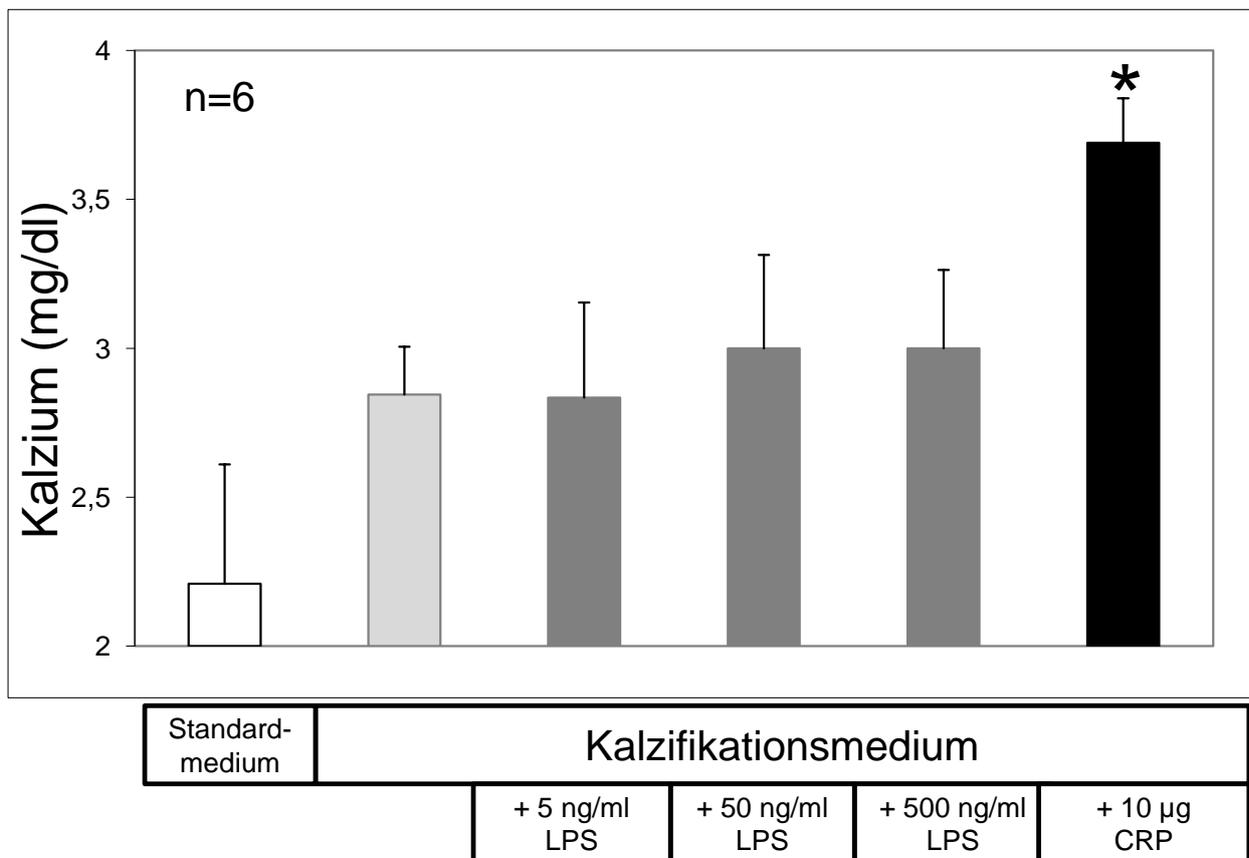


Abb. 5.5: Inkubation glatter Muskelzellen mit Kalzifikationsmedium und verschiedenen Konzentrationen Lipopolysacharids sowie CRP. Die Inkubation mit Kalzium-Phosphatmedium (hellgrau) -wie bei den vorherigen Versuchen wurden 1,9 mmol/l Kalzium und 2 mmol/l Phosphat verwendet- führt zu einem Anstieg der Kalziumkonzentration gegenüber der mit handelsüblichen Medium inkubierten Zellen (weiß). Der Zusatz von LPS (dunkelgrau) führt zu keinem signifikanten Anstieg der Kalziumkonzentration gegenüber der nur mit Kalzifikationsmedium inkubierten Zellen. Die Inkubation mit CRP (schwarz) hingegen schon. * = $p < 0,05$. Die statistische Analyse wurde mit einem gepaarten t-Test durchgeführt.

Von Kossa Färbung

Als weitere Untersuchungsmethode der Kalzifikation der VSMC wurde die Von Kossa Färbung angewandt, die mineralisierende Strukturen mithilfe von Silbernitrat sichtbar macht.

Die Ergebnisse der Von Kossa Färbung der Zellen stehen mit den Kalziummessungen in Einklang. Während die mit normalem Medium inkubierten SMC keinerlei Zeichen von Kalzifikation zeigen, weisen die mit Kalzifikationsmedium inkubierten Zellen einige schwarz gefärbte Kalziumkristalle als deutliches Zeichen von Verkalkung auf. Eine deutlich größere Zahl an verfärbten Arealen zeigt sich nach zusätzlicher Inkubation mit CRP. Auch die mit PTX 3 behandelten Zellen weisen im Vergleich zur Kalzifikationskontrolle vermehrte Verkalkungsherde auf. Dies ist die exakte Bestätigung der in den Kalziummessungen erzielten Ergebnisse, was als weiterer Hinweis auf eine kalzifikationsinduzierende Wirkung dieser Akutphaseproteine gelten kann.



Standardmedium



Kalzifikationsmedium

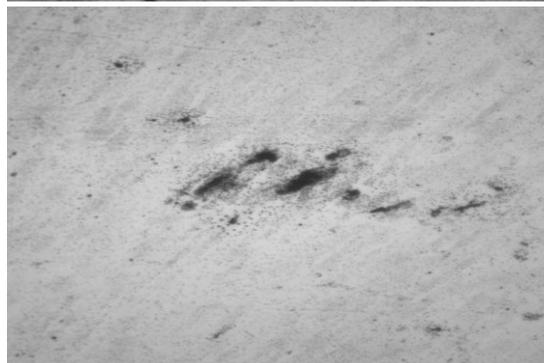
Kalzifikationsmedium
+ 5 µg CRPKalzifikationsmedium
+ 0,5 µg PTX 3

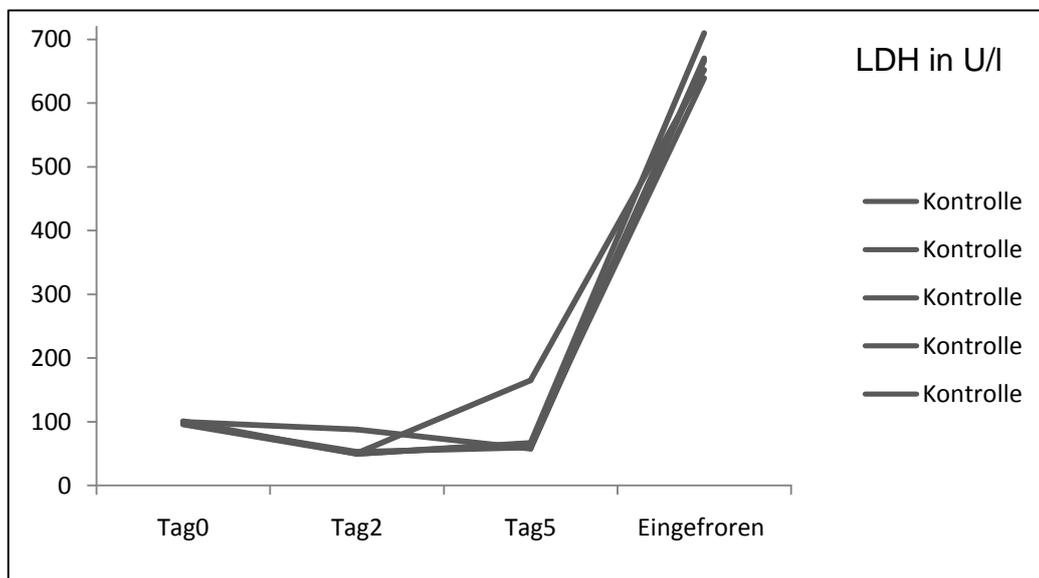
Abb. 5.6: Kalzifikation in glatten Muskelzellen wurde mittels Von Kossa Färbung sichtbar gemacht. Die mit herkömmlichem Medium inkubierten Kulturen sowie die mit Kalzifikationsmedium inkubierten Zellen zeigen nach demselben Inkubationszeitraum deutlich weniger Verkalkung als die zusätzlich mit CRP bzw. PTX3 inkubierten Zellen. (n=4)

5.2 LDH

In den Überständen der glatten Muskelzellen wurde zu verschiedenen Zeitpunkten die Konzentration der Laktatdehydrogenase (LDH) bestimmt. Dieses intrazellulär in allen Zellen des menschlichen Körpers vorkommende Protein wird im Falle des Zelltodes freigesetzt und findet somit auch als Marker des Zelltodes Verwendung. Im Zuge des Prozesses der Gefäßverkalkung kommt es zur Bildung von Apoptosekörperchen, die zum Teil aus glatten Muskelzellen bestehen und wesentlich zur Verkalkung beitragen.

Die Messungen der LDH erfolgten in den Überständen, die sowohl nach Tag 2 als auch nach Tag 5 entnommen wurden. Die Resultate zeigen zunächst, dass in den mit Kontrollmedium inkubierten Zellkulturen kein deutlicher Anstieg der LDH-Konzentrationen zu verzeichnen ist. Als Positivkontrolle eignen sich die Kulturen, die zuvor eingefroren wurden, hier kommt es zu einem starken Anstieg der LDH.

In den Zellkulturen, die mit Kalzifikationsmedium inkubiert wurden, kommt es nach fünf Tagen zu einem Anstieg. Dieser Anstieg fällt in den mit CRP bzw. PTX3 versetzten Kulturen noch deutlicher aus. Abgebildet sind Einzelwerte.



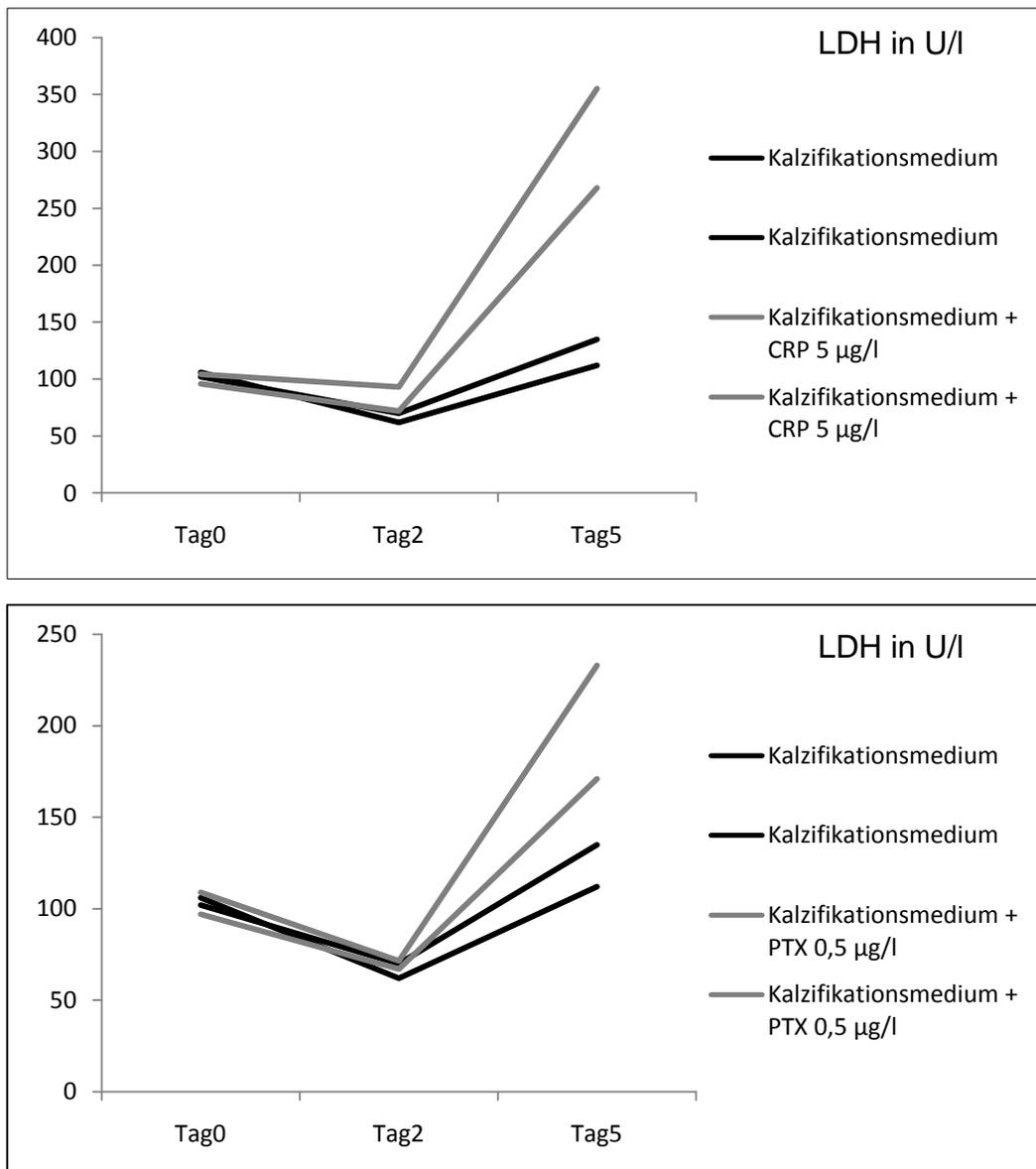


Abb. 5.7: LDH-Konzentrationen in Überständen von Kulturen glatter Muskelzellen, die mit Kontrollmedium (oben), mit Kalzifikationsmedium und CRP (Mitte) oder Kalzifikationsmedium und PTX 3 (unten) stimuliert wurden. Abgebildet sind Einzelwerte. Es kommt zu einem Anstieg der LDH in den Überständen nach fünf Tagen nach Stimulation mit CRP/PTX3. Als Positivkontrolle wurde in Überständen zuvor eingefrorener Zellen die LDH bestimmt. (Oben)

5.3 Expression MGP

Um zu untersuchen, über welchen Mechanismus CRP und PTX 3 Verkalkung in den glatten Muskelzellen herbeiführen, wurde die Expression des Verkalkungsinhibitors Matrix Gla Protein (MGP) untersucht. Hierzu wurde die mRNA-Konzentration von MGP bestimmt.

In der Analyse der optischen Dichtewerte der verschiedenen Banden zeigt sich, dass die Inkubation der Zellkulturen mit Kalzifikationsmedium zu einer Reduktion der MGP-mRNA-Konzentration gegenüber der Kontrolle führte. Ein zusätzlicher Abfall der MGP-mRNA-Konzentration war nach Inkubation mit CRP zu verzeichnen. Dieser weitere Abfall ist allerdings nicht statistisch signifikant.

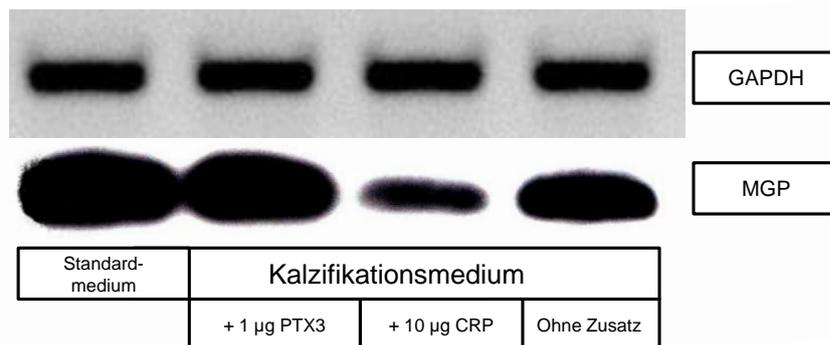


Abb. 5.8.: Expression des Kalzifikationsinhibitors MGP (n=4) in VSMC nach Inkubation mit CRP und PTX im Vergleich zur Expression von GAPDH (oben). Die MGP-Konzentration in Zellen, die mit CRP inkubiert wurden, ist geringer als in der Kontrolle.

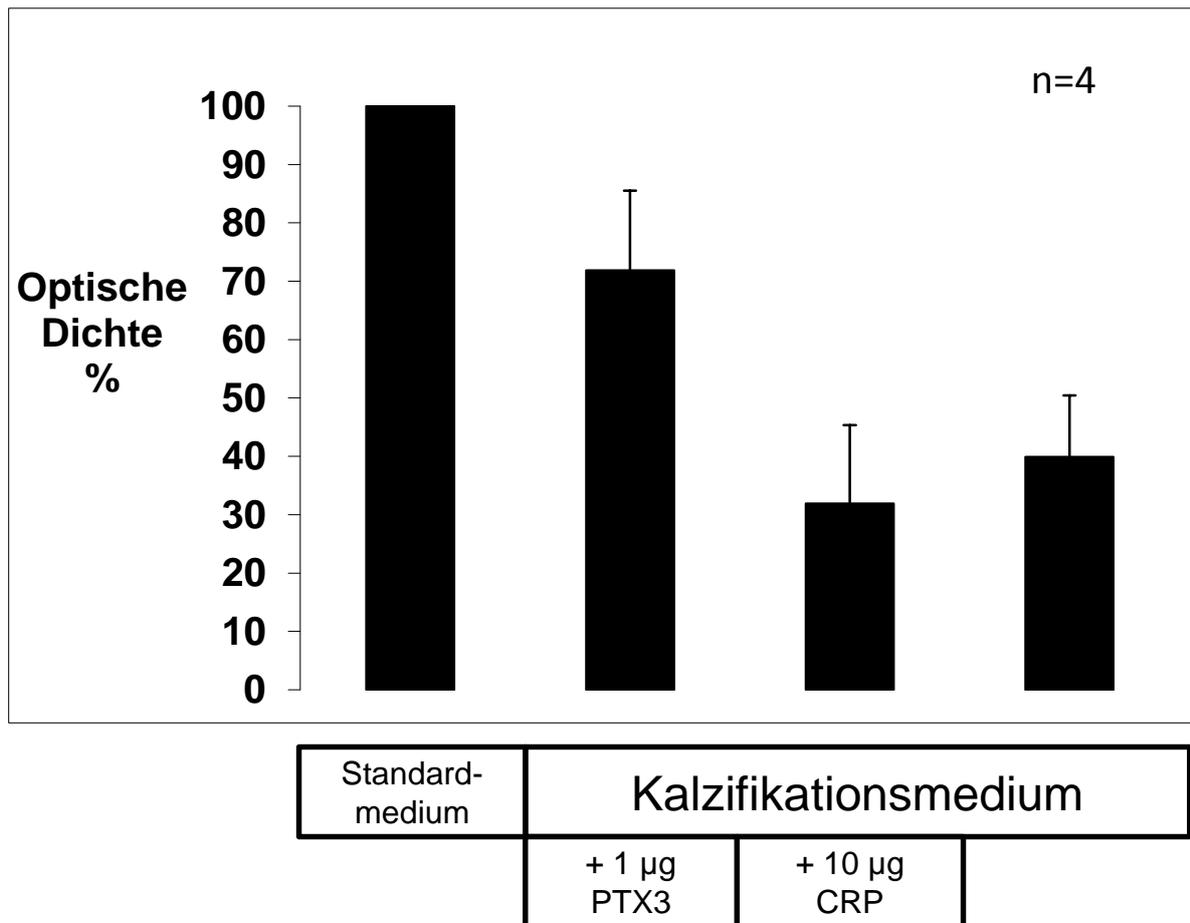


Abb. 5.9: Die MGP-Expression der Kulturen wurden quantifiziert durch die Messung der optischen Dichte der verschiedenen Blots. Übereinstimmend mit der Abb. 5.8 zeigt die mit CRP inkubierte Kultur die niedrigste MGP-Expression. Dieser Unterschied war nicht signifikant. $p > 0,05$

5.4 Monozytenstimulation mit CRP

Ziel der Monozytenstimulationsversuche und der anschließenden Interleukinbestimmungen mittels ELISA, war es, zu untersuchen, ob die Akutphaseproteine eine proinflammatorische Wirkung auf Monozyten haben. Die Messung der Interleukine nach Inkubation mit CRP zeigt folgende Graphik:

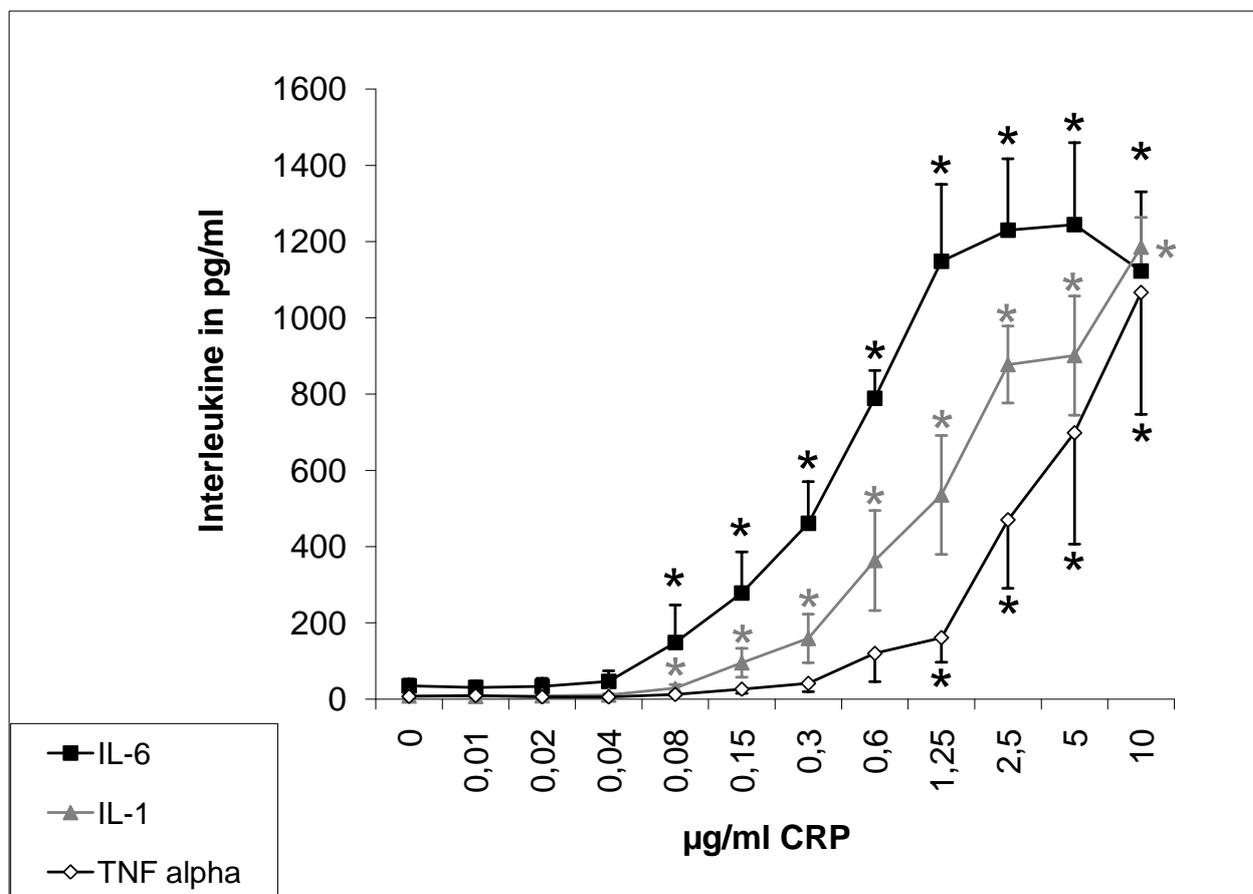


Abb.5.10: Interleukinproduktion in Monozyten gesunder Probanden nach Stimulation mit aufsteigenden Konzentrationen CRP. Abgebildet sind die Mittelwerte sowie SEM. * = $p < 0,05$. Signifikanter Anstieg gegenüber 0 µg/ml CRP. Die statistische Analyse wurde mit Wilcoxon paired test durchgeführt. $n = 7$.

Die Inkubation der Monozyten mit CRP führte zu einem deutlichen Anstieg der untersuchten Zytokine IL-1, IL-6 und TNF α . Dieser Anstieg war jeweils dosisabhängig.

Der Umstand, dass die IL-6-Produktion einen Gipfel hat und anschließend wieder abfällt, kann als deutlicher Hinweis darauf gelten, dass der Anstieg dem CRP und nicht etwa Endotoxinkontamination geschuldet ist. Wäre die Zunahme an Interleukinen auf Endotoxin zurückzuführen, würde die Konzentration an IL-6 mit steigenden CRP- (bzw. in jenem Falle dann Endotoxin-) Konzentrationen ebenfalls weiter steigen. Wie zuvor erwähnt, gibt es in den vorliegenden Experimenten aber mit steigenden CRP-Konzentrationen schließlich einen Abfall, was darauf hinweist, dass die optimal stimulierende CRP-Menge im Bereich um 5 µg/ml liegt.

Um einen weiteren Überblick zu erhalten, welche Rolle das Endotoxin in diesen Versuchen spielte, wiederholten wir diese Versuche mit und ohne Zusatz von Polymyxin B. Polymyxine zerstören bakterielle Zellmembranen, indem sie mit den Phospholipiden der Membranen reagieren. Sie sind somit potente Antagonisten des Endotoxins. Die Ergebnisse sind in Abbildung 5.11 abgebildet.

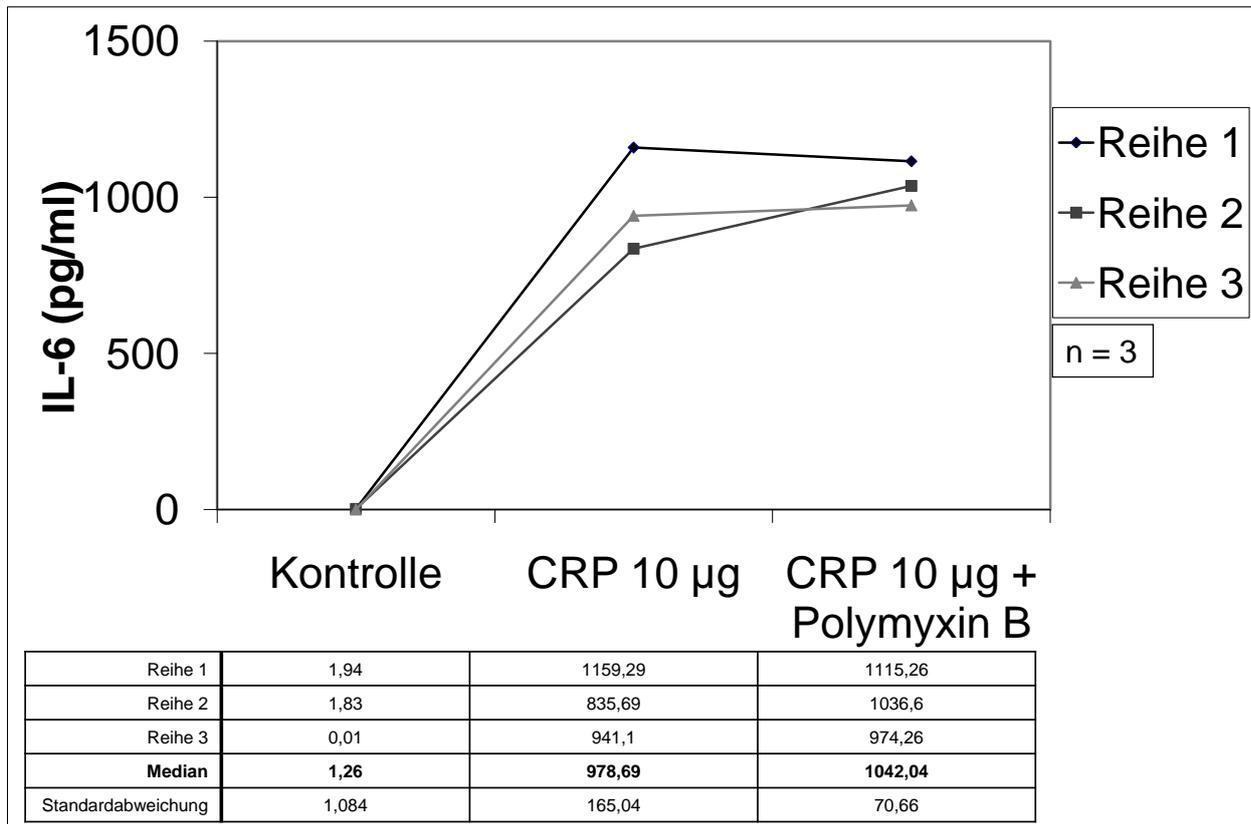


Abb. 5.11: Inkubation von Monozyten mit CRP führt zu Produktion von Interleukinen. Der Endotoxininhibitor Polymyxin B hat darauf keinen entscheidenden Einfluss. Jede Reihe entspricht den Einzelwerten einer Versuchsreihe. (n=3)

Erneut führte die Inkubation von Monozyten mit CRP eine IL-6-Produktion herbei. Der Zusatz von Polymyxin B führte zu keiner nennenswerten Reduktion in der IL-6-Produktion. Wäre für die Monozytenstimulation die Kontamination mit Endotoxin verantwortlich gewesen, wäre hier die IL-6-Konzentration deutlich niedriger gewesen.

5.5 Monozytenstimulation mit PTX 3

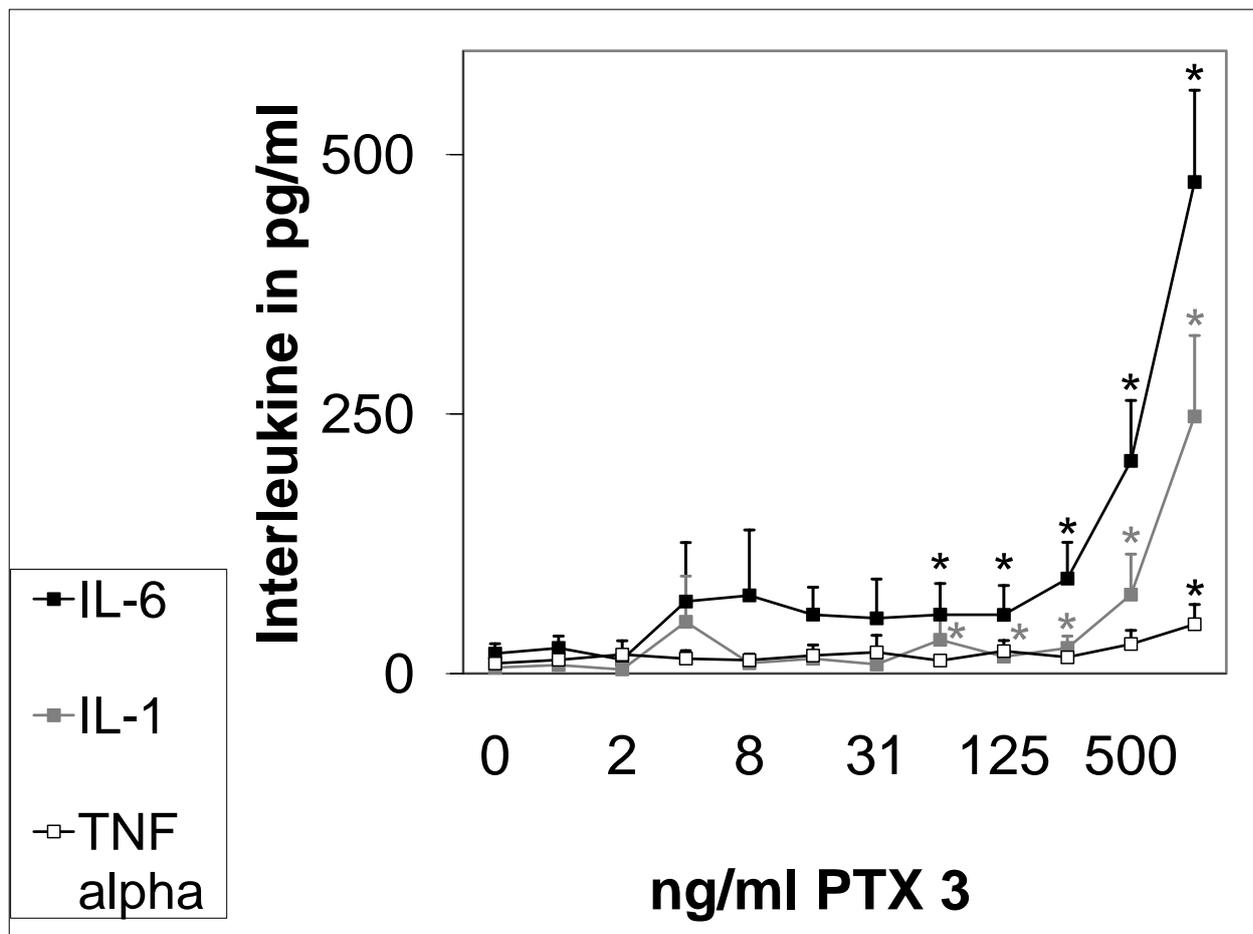


Abb.5.12: Interleukinproduktion in Monozyten gesunder Probanden nach Stimulation mit aufsteigenden Konzentrationen PTX 3. Abgebildet sind die Mittelwerte sowie SEM. * = $p < 0,05$. Signifikanter Anstieg gegenüber 0 $\mu\text{g/ml}$ PTX 3. Die statistische Analyse wurde mit dem Wilcoxon paired test durchgeführt. $n = 7$.

Auch die Monozytenstimulation mit PTX 3 führte zu einem dosisabhängigen Anstieg der IL-1- und IL-6- Konzentrationen. Im Gegensatz dazu ließ sich die TNF α -Konzentration durch die Inkubation mit PTX 3 nicht stimulieren. Dies kann ebenfalls als Hinweis darauf gewertet werden, dass Endotoxin in diesen Versuchen als kontaminierender Faktor keine Rolle gespielt hat. Denn eine eventuelle Kontamination mit Endotoxin hätte unselektiv die Synthese aller Interleukine stimuliert. Somit kann der beobachtete stimulierende Effekt eindeutig dem PTX 3 zugeschrieben werden.

5.6 Monozytenstimulation mit LPS

Als Positivkontrolle führten wir überdies Stimulationsversuche mit LPS durch. Sie zeigen erwartungsgemäß ebenfalls einen dosisabhängigen Anstieg der IL-6-Konzentration.

Diese Versuche dienten ferner der Bestimmung derjenigen Endotoxinkonzentration, ab der eine Stimulation in Monozyten eintritt. Somit konnten die im CRP und PTX mittels LAL (s. unten) bestimmten Endotoxinkonzentrationen interpretiert werden.

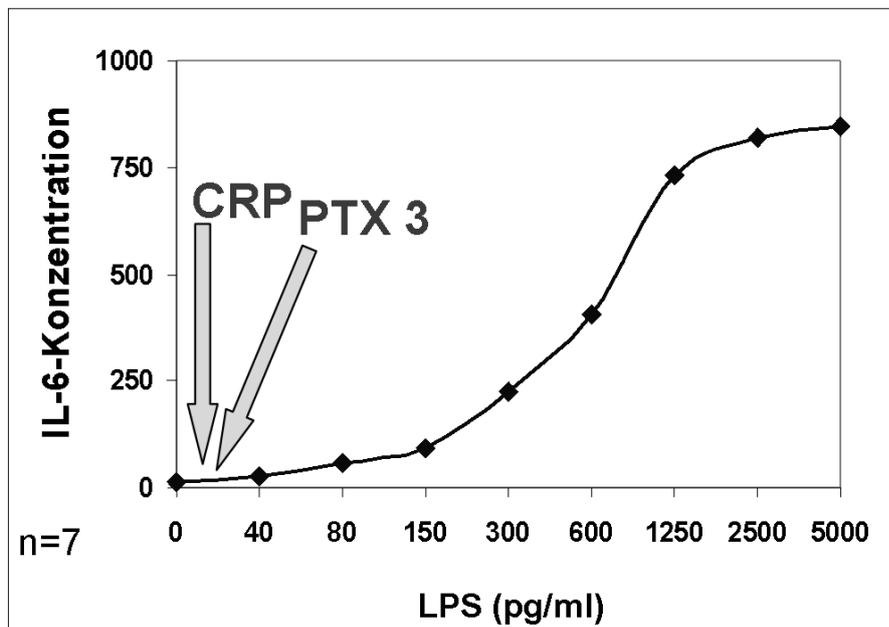


Abb. 5.13: Monozyten gesunder Probanden wurden mit aufsteigenden Konzentrationen LPS inkubiert, anschließend wurde die IL-6-Produktion bestimmt. Die Pfeile zeigen die Endotoxinkonzentrationen, die in den CRP und PTX 3-Lösungen enthalten waren, an. Sie befinden sich in dem Bereich, in der keine Monozytenstimulation stattfindet.

5.7 Endotoxinmessung

Die Endotoxinkonzentrationen wurden sowohl im CRP als auch im PTX 3 mehrfach bestimmt (n=3). Für CRP wurde eine durchschnittliche Konzentration von 1,5 pg Endotoxin / µg CRP, für PTX 3 von 21 pg Endotoxin / µg PTX3 gemessen.

Die höchste von uns verwendete CRP-Konzentration (10µg/ml) enthielt also durchschnittlich 15 pg Endotoxin, die höchste PTX-Konzentration enthielt 21 pg

Endotoxin. Überträgt man diese Konzentrationen auf die LPS-Versuche, wie in Graphik 5.13 geschehen, so zeigt sich, dass diese Konzentrationen nicht ausreichen, um Monozyten zur IL-6-Produktion zu stimulieren. Dies kann als weiterer Anhalt dafür dienen, dass die LPS-Konzentrationen auf die Ergebnisse der CRP- und PTX3-Versuche keinen entscheidenden Einfluss hatten.

6 Diskussion

6.1 CRP und PTX 3 verstärken vaskuläre Kalzifikation

CNI Patienten weisen eine im Vergleich zur gesunden Bevölkerung deutlich erhöhte Mortalität auf. Nachdem dieser Umstand trotz laufender Fortschritte in der Beseitigung sowohl der Urämie als auch metabolischer Entgleisungen durch Etablierung der Nierenersatzverfahren bestehen blieb, traten andere Begleitfaktoren der CNI in den Fokus der Aufmerksamkeit. Hierbei steht insbesondere die vaskuläre Verkalkung im Vordergrund. Sie ist in CNI-Patienten in hohem Maße prävalent. Der Prozess der vaskulären Kalzifikation ist heute Gegenstand intensiver Untersuchungen und gilt inzwischen als einer der Hauptpathomechanismen der erhöhten Rate an kardiovaskulären Ereignissen in CNI-Patienten.

Der Schwerpunkt dieser Arbeit ist der Einfluss der Pentraxine PTX3 und CRP auf die vaskuläre Kalzifikation in vitro. Sie gelten als Prädiktoren kardiovaskulärer Ereignisse [47, 49], wohingegen eine kausale Rolle der Pentraxine bislang stark umstritten war.

Es wurde der Einfluss von CRP und Pentraxin 3 auf die Verkalkung glatter Gefäßmuskelzellen untersucht. Als Vorbild dieser Versuche stand die Publikation von Jono et al zur Verfügung, die zeigten, dass durch Zugabe eines Kalzifikationsmediums mit hohen Kalzium- und Phosphatkonzentrationen Gefäßverkalkung induzierbar ist. [16] Unter ähnlichen Versuchsbedingungen wurde in dieser Arbeit der Effekt von Pentraxinen auf VSMC erforscht.

In der vorliegenden Arbeit gelang der Nachweis, dass Pentraxin 3 und CRP die Kalzifikation in glatten Gefäßmuskelzellen dosisabhängig verstärken. Während bereits eine Korrelation zwischen den Serumspiegeln von Pentraxinen und der Gefäßverkalkung bekannt war, so war nicht bekannt, ob dies ein Epiphänomen oder eine Ursache für die Gefäßverkalkung war. Im Rahmen einer Zellkulturexperimentreihe konnte in dieser Arbeit ein kausaler Zusammenhang zwischen Pentraxinen und der Gefäßverkalkung gezeigt werden. Dies gelang mittels verschiedener Methoden. Einerseits wurde die Kalziumkonzentration in den glatten Muskelzellen gemessen, weiterhin wurde die Von Kossa Färbung zur Visualisierung von Verkalkung angewandt. Mit beiden Methoden ergaben sich unabhängig Hinweise, dass Pentraxine Gefäßverkalkung verstärken.

Ein Blick in die Literatur zeigt eine Reihe von Publikationen, die nahelegen, dass CRP vaskuläre Kalzifikation induziert. Untersucht oder gezeigt wurde ein direkter kalzifizierender Effekt auf VSMC indes bislang noch nicht. Es gibt lediglich zahlreiche Studien, die eine Korrelation von CRP mit kardiovaskulären Erkrankungen nachweisen. So konnte in diversen voneinander unabhängigen prospektiven Studien ein Zusammenhang zwischen hohem CRP und sowohl der Gesamtmortalität als auch kardiovaskulären Ereignissen festgestellt werden. [47] Weiterhin wird dem CRP die Fähigkeit zugesprochen, rezidivierende kardiovaskuläre Ereignisse und das Outcome dieser Patienten zu prognostizieren. [50] Hiernach gilt die Präsenz des CRPs als ein Marker für eine schlechte Prognose für Patienten mit instabiler Angina, Myokardinfarkt und Apoplektischem Insult. Außerdem kann CRP in akuten Koronarsyndromen unabhängig von Troponin Folgeereignisse vorhersagen, was annehmen lässt, dass das CRP nicht nur den Myokardschaden sondern auch arteriosklerotische Prozesse widerspiegelt.

Eine Assoziation zwischen Inflammationsmarkern und Koronararterienverkalkung wurde im Rahmen der Multi-Ethnic-Studie von Jenny et al gezeigt. Sie schlossen mehr als 6000 Patienten ein, bei denen keinerlei kardiovaskuläre Erkrankung bekannt war. Mittels electron-beam-CT (EBCT) wurde der Agatston score, also das Maß für Koronarverkalkung, ermittelt. Weiterhin wurden die Serumwerte von CRP, IL-6 und Fibrinogen bestimmt. Eine Analyse der Daten zeigte eine moderate Assoziation zwischen CRP, IL-6 und Fibrinogen und der Koronarverkalkung. Wurden diese drei Marker kombiniert, so zeigte dies eine stärkere Assoziation als jeder einzelne Marker für sich genommen.[63] Auch Oh et al zeigten, dass CRP mit dem Grad an Vaskulärer Kalzifikation korreliert.[27] Sie ermittelten ebenfalls den Agatstonkalzifikationsscore mittels EBCT und verglichen diesen mit den Serum-CRP-Werten. Hierbei zeigte sich ein eindeutiger Zusammenhang zwischen hohen CRP-Werten und ausgeprägter Gefäßverkalkung. Bei diesen Beobachtungen war es bislang völlig unklar, ob ein kausaler Zusammenhang zwischen CRP und Gefäßverkalkung besteht.

Ein Erklärungsansatz für die in diesen Studien beobachteten Ergebnisse wäre gewesen, dass die Gefäßverkalkung ein ganz normaler chronischer Entzündungsprozess ist, als dessen Ausdruck auch erhöhte CRP-Werte messbar sind. Dies hätte bedeutet, dass die erhöhten CRP-Werte als Folge der vaskulären Kalzifikation gewertet würden.

In dieser Arbeit gelang es jedoch mittels CRP im in vitro Modell vaskuläre Kalzifikation hervorzurufen. Somit liegt ein anderer Erklärungsansatz für die in den oben genannten Studien beobachteten Korrelationen nahe: Die erhöhten CRP-Werte sind Ursache und nicht Folge der Gefäßverkalkung. Denn die in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse sind diesbezüglich eindeutig.

Die Untersuchungen wurden in einer relativ hohen Versuchszahl durchgeführt. Der beobachtete Effekt war in verschiedenen Generationen der Zellreihen immer wieder reproduzierbar. Auch deshalb war eine eindeutige statistischer Signifikanz nachweisbar. Die Wertigkeit der Ergebnisse dieser Arbeit wird auch dadurch gesteigert, dass der kalzifikationsinduzierende Effekt dosisabhängig zu beobachten war. Je höher die CRP-Konzentrationen waren, desto stärker fiel die vaskuläre Verkalkung aus. Dadurch kann der beobachtete Effekt relativ sicher dem CRP bzw. dem PTX3 zugeordnet werden. Als weitere mögliche Erklärung für die Dosisabhängigkeit der Verkalkung wäre noch ein Kontamination mit Endotoxin denkbar. Denn man könnte argumentieren, dass wenn man mit Endotoxin kontaminiertes CRP in höheren Dosen appliziert, man auch die Endotoxinkonzentration steigert. Diese Theorie, dass die beobachteten Effekte durch Endotoxin hervorgerufen würden, konnte jedoch eindeutig entkräftet werden. Denn mit derselben Methodik konnte in demselben Zellkulturmodell mit verschiedenen Endotoxinkonzentrationen kein verkalkender Effekt erzielt werden. Eine weitere besonders wertvolle Erkenntnis dieser Arbeit liegt also auch darin, dass Endotoxin im Gegensatz zu CRP und Pentraxin keine zusätzliche Verkalkung zu induzieren vermochte.

6.2 Mechanismen

Die Frage, über welchen Mechanismus CRP und Pentraxin 3 zu einer verstärkten vaskulären Kalzifikation führen, bleibt zu klären. Hierzu konnten die in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse lediglich Hinweise geben. In einer relativ kleinen Fallzahl kam es in VSMC unter CRP-Einfluss zur Herunterregulation der MGP-Expression. Dieser Effekt wies keine statistische Signifikanz auf, so dass nur unter großem Vorbehalt Rückschlüsse gezogen werden können, ob CRP diesen Kalzifikationsinhibitor tatsächlich beeinflusst. Die Ergebnisse dieser Versuche können lediglich als erste Hinweise auf einen möglichen direkten CRP-Effekt auf die MGP-Produktion gewertet werden.

Vergleicht man diese Ergebnisse mit der vorliegenden Literatur, so stellt man fest, dass aktuell der Fokus des Interesses weniger auf der MGP-Expression insgesamt liegt, als mehr auf dem Verhältnis von karboxyliertem zu unkarboxyliertem MGP. Die karboxylierte Form ist die biologisch aktive Form des MGP, während die unkarboxylierte Form keinen kalzifikationshemmenden Einfluss entfaltet. Dies zeigten Schurgers et al in vitro, als sie in humanen VSMC mit Warfarin die Karboxylierung des MGP hemmten. In der Folge war eine sowohl eine vermehrte Verkalkung als auch eine erhöhte Konzentration an unkarboxyliertem MGP nachweisbar. [64]

Die unkarboxylierte Form des MGP wurde in den letzten Jahren als Surrogatmarker der vaskulären Kalzifikation etabliert. Es wurde gezeigt, dass dieser Marker in der Dialysepopulation signifikant erniedrigt ist. [65] Weitere Forschungsarbeiten zeigten, dass die unkarboxylierte Form des MGP wiederum in eine phosphorylierte und eine dephosphorylierte Form unterschieden werden kann. So demonstrierten Schurgers et al, dass die Plasmakonzentration der dephosphorylierten, unkarboxylierten Form des MGP (dp-uc-MGP) mit Voranschreiten der chronischen Niereninsuffizienz ansteigt. Ferner wurde in dieser Studie eine Assoziation des dp-uc-MGP mit der Aortensklerose gezeigt. Möglicherweise wird in einiger Zeit das dp-uc-MGP als Biomarker für Gefäßverkalkung eine entscheidende Rolle spielen.

Es belegen also diese Studien, die sich schwerpunktmäßig mit dem Biomarker MGP befassen, dass das Hauptproblem der vaskulären Kalzifikation in niereninsuffizienten Patienten offensichtlich nicht eine verminderte Produktion an MGP insgesamt ist. Im Vordergrund steht offenbar eher eine Verschiebung der Balance zwischen karboxyliertem und unkarboxyliertem MGP. Somit muss man also konstatieren, dass nach der derzeitigen Studienlage der mangelnde kalzifikationsinhibierende Effekt des MGP wohl nicht der erniedrigten Konzentration des MGP insgesamt geschuldet zu sein scheint.

Die Resultate dieser Arbeit bezüglich des Pentraxineinflusses auf die Kalzifikationshemmung mittels MGP sind deshalb in diesem Kontext schwierig einzuordnen. Es wurde gezeigt, dass die MGP-Expression unter CRP-Einfluss reduziert ist. Eine statistische Signifikanz konnte bei der Hemmung der MGP-Produktion durch CRP nicht erreicht werden. Weiterhin ist vor dem Hintergrund der aktuellen Studienlage wie oben beschrieben die Gesamtkonzentration des MGP möglicherweise nicht das entscheidende Kriterium. Mitunter sind je nach Karboxylierungsgrad sogar erhöhte

Werte mit einem schlechteren Kalzifikationsscore behaftet. Nach jetzigem Stand der Forschung wird also die Gesamtkonzentration des MGP nicht als entscheidend für die Verkalkung angesehen. Denkbar wäre aber, dass bei einer ohnehin erniedrigten MGP-Expression auch die karboxylierte Form in niedrigerer Konzentration vorliegt. Denn wenn MGP insgesamt erniedrigt ist, wird wahrscheinlich -unabhängig davon, wie das Verhältnis von unkarboxyliertem zu karboxyliertem MGP aussieht- die Konzentration von karboxyliertem MGP ebenfalls reduziert sein. Damit würde eine kalzifikationshemmende Wirkung des MGP abgeschwächt. Ob CRP die Verkalkung über eine Hemmung der MGP-Produktion verstärkt, kann mit den in dieser Arbeit erarbeiteten Ergebnissen nicht gesagt werden. Bevor die in dieser Frage erzielten Ergebnisse endgültig eingeordnet werden können, sind also noch weitere Versuche erforderlich.

6.3 Interleukinproduktion von Monozyten

Eine weitere Frage, der sich diese Arbeit widmete, war, ob CRP und PTX3 eine proinflammatorische Wirkung auf Monozyten haben. Hierzu stand uns ein Modell zur Verfügung, das die isolierte Betrachtung der Pentraxinwirkung auf Monozyten gesunder Probanden erlaubte. In diesen Versuchen zeigte sich ein eindeutiges Ergebnis:

1. CRP stimuliert dosisabhängig die Produktion von IL-6, IL-1 und TNF α .
2. PTX 3 stimuliert dosisabhängig die Produktion von IL-6, IL-1.

Hieraus ergibt sich die Frage, welche Rolle diese Zytokine im Bezug auf die erhöhte Mortalität in CNI-Patienten im Allgemeinen und auf die vaskuläre Verkalkung im Besonderen haben. Wie oben bereits erwähnt, zeigte die Studie von Jenny et al eine erhöhte Rate an vaskulärer Verkalkung in CNI-Patienten, deren IL-6-Spiegel mit dem Verkalkungsgrad korrelierte. Eine ähnliche Studie von Ramadan et altera bestätigte dies und zeigte eine deutlich stärkere Korrelation mit dem Agatston-Score für IL-6 als für CRP.[66] Dies belegt den wichtigen Stellenwert des IL-6 zumindest als Surrogatmarker für Gefäßverkalkung. Wie diese Korrelation zustande kommt, kann nicht eindeutig gesagt werden. Wieder steht die Frage im Raum, ob diese Interleukine lediglich

Surrogatmarker oder kausaler Faktor sind. Es wurden bereits diverse Zytokineffekte, die diese Korrelation andeutungsweise nachvollziehbar machen, untersucht.

Zytokine beeinflussen die verschiedenen in der Gefäßwand enthaltenen Zellen auf mannigfaltige Weise. So greifen sie offenkundig in den Apoptoseprozess ein. Eine Arbeit von Geng et al. belegte, dass die kombinierte Gabe von TNF- α , IL-1 β und IFN γ in VSMC Apoptose induziert. [67] Die wichtige Rolle der Apoptose in der Arteriosklerose wurde bereits in der Einleitung diskutiert. Neben den VSMC hat IL-1 β auch auf Endothelzellen direkte Auswirkungen. So zeigten Bevilacqua et al., dass es die Koagulation fördert, indem es beispielsweise Plasminogenaktivatoren inhibiert. [68, 69] Außerdem induziert es die Expression von Adhäsionsmolekülen, die die Leukozytenmigration und somit auch die Inflammation im Blutgefäß befördert. Darüberhinaus fördert es die Sekretion vasoaktiver Substanzen wie Prostaglandine.

Weiterhin ist bereits bekannt, dass TNF α die vaskuläre Kalzifikation dadurch befördert, dass es die osteogene Differenzierung glatter Muskelzellen induziert. [45, 46] Zum ersten nehmen die Zellen unter TNF-Einfluss phänotypische Eigenschaften von Osteoblasten an. Zum zweiten waren mit alkalischer Phosphatase auch Frühmarker, die Osteoblastendifferenzierung anzeigen, in erhöhten Konzentrationen nachweisbar. Parallel hierzu waren in den Zellen erhöhte cAMP-Konzentrationen messbar. Es ist also anzunehmen, dass TNF α diese Differenzierung in osteoblasten-ähnliche Zellen über den second messenger cAMP beeinflusst. Diese Umwandlung ist einer der entscheidenden Schritte in der Entwicklung einer gesunden in eine arteriosklerotische veränderte Gefäßwand. Dieser Weg ist ein möglicher Erklärungsansatz dafür, wie CRP vaskuläre Kalzifikation induziert: CRP befördert die TNF α -Produktion in Monozyten. TNF α induziert vaskuläre Kalzifikation in VSMC.

Im Gegensatz zur Arteriosklerose, die aufgrund der vermehrten Gefäßsteifigkeit häufig über eine Herzinsuffizienz zum Tode führt, sind Patienten, in denen die Atherosklerose vorherrscht, durch eine Plaqueruptur mit kardioembolischen Ereignissen gefährdet. Zwar herrscht in den meisten CNI-Patienten der Prozess der Arteriosklerose vor, welcher auch den Schwerpunkt dieser Arbeit darstellte, doch auch Elemente der Atherosklerose sind in Dialysepatienten prävalent und tragen zur erhöhten Mortalität bei. Daher soll kurz der Einfluss der Interleukine auf die Plaqueruptur erörtert werden. Diese wird durch Zytokine forciert. Atheroskleroseplaques, die erhöhte Zytokinkonzentrationen enthalten, sind durch Instabilität und Neigung zur Ruptur

gekennzeichnet. Hierfür ist möglicherweise die Aktivierung von Enzymen wie Gelatinase und MMP-2 verantwortlich. Diese sind nämlich für die Degradation von interstitiellen Matrixproteinen wie Kollagen und Elastin verantwortlich. Libby et al. befassten sich mit dem Einfluss der Interleukine auf Kollagene. Sie zeigten, dass die Zytokine TNF- α und IL-1 β auf vielfältige Weise die Produktion und Sekretion von Kollagenen regulieren, welche in großen Mengen in atherosklerotischen Plaques vorkommen. [70] Sie fördern nämlich die Produktion einer interstitiellen Kollagenase, welche Kollagen degradiert. Das hat schließlich eine Instabilität der Plaques zur Folge und erklärt die erhöhte Gefahr der Plaqueruptur an Orten erhöhter Interleukinkonzentrationen.

Insgesamt kann also konstatiert werden, dass u.a. folgende Interleukinwirkungen die Gefäßverkalkung befördern:

Differenzierung von VSMC in Osteoblasten-ähnliche Zellen

Induktion von Apoptose

Endothelzellaktivierung

Plaueinstabilität durch MMP -Produktion

Durch die in dieser Arbeit belegte Förderung der Produktion dieser Interleukine durch Pentraxine, kann postuliert werden, dass CRP und PTX3 all diese Effekte mittelbar befördern. Auch diese Ergebnisse erlauben es, CRP und PTX3 eine entscheidende Rolle im Prozess der vaskulären Kalzifikation zuzuschreiben. Sie sind nicht nur Epiphänomene, sondern befördern die Gefäßverkalkung auf verschiedenen Ebenen aktiv.

6.4 Diskussion der Methodik

In der vorliegenden Arbeit wurden die kalzifizierenden Effekte der Pentraxine anhand eines Zellkulturmodells demonstriert. Der direkte Effekt von CRP auf glatte Muskelzellen wurde in diesem Modell untersucht. Vorteilhaft hieran ist die Möglichkeit, exemplarisch isoliert den Effekt von CRP oder Pentraxin 3 auf glatte Muskelzellen zu untersuchen. Hierüber kann man aufgrund der erzielten Ergebnisse eine eindeutige Aussage machen: Pentraxine verstärken die Verkalkung in glatten Muskelzellen.

Gleichwohl sind die Schlüsse, die man aus den Ergebnissen der Zellkulturexperimente ziehen kann, limitiert. Der komplexe Prozess der vaskulären Kalzifikation bezieht vielerlei Mediatoren und Zelllinien mit ein. Diese vielfältigen Mechanismen können in einem relativ simplen Versuchsaufbau mit einer Zelllinie und jeweils einem Mediator nur unzulänglich abgebildet werden. Es muss beachtet werden, dass vielfältige Kompensationsmechanismen der vaskulären Kalzifikation in diesem Modell nicht berücksichtigt wurden. Wie in der Einleitung diskutiert, zählen hierzu beispielsweise noch Fetuin-A, Osteopontin und andere. So wäre es beispielsweise denkbar, dass in vivo bei erhöhten CRP-Spiegeln im Blut kompensatorisch die hepatische Fetuin-A-Produktion verstärkt würde und hierdurch ein tatsächlicher biologischer Effekt verhindert würde. Das komplexe Zusammenspiel der verschiedenen Mediatoren, die ganz unterschiedlicher Herkunft sind, wird also durch diese Zellkulturexperimentreihe nicht unbedingt abgebildet.

Auch wurde in der vorliegenden Arbeit der Pentraxineffekt zwar auf die Zellreihen, Monozyten und glatte Muskelzellen, jeweils einzeln, nicht jedoch im Zusammenspiel untersucht. Es wurde gezeigt, dass Pentraxine direkte Effekte auf die verschiedenen Zellreihen entfalten. In glatten Muskelzellen wird die Verkalkung verstärkt, in Monozyten die Interleukinproduktion angeregt. Nicht untersucht jedoch wurde der Nettoeffekt erhöhter Pentraxinspiegel auf Monozyten und VSMC in einem vereinten Zellkulturmodell. Die in der vorliegenden Arbeit erzielten Ergebnisse könnten auf eine Potenzierung der Verkalkung durch zusätzliche Stimulation der vaskulären Verkalkung durch die Interleukine schließen lassen. Auch hier wäre eine gegenseitige Beeinflussung möglich, was eventuell zu einer Abschwächung oder einer Verstärkung der beobachteten biologischen Effekte wie eine Zunahme der Verkalkung bedeuten könnte. In weiterführenden Versuchen wäre also anzustreben, dass in einem Zellkulturmodell mit glatten Muskelzellen und Monozyten gesunder Probanden der

CRP-Effekt erneut untersucht würde. In einer solchen Experimentreihe wäre eine Verstärkung der Verkalkung zu vermuten, da zu den CRP-Effekten auf die VSMC nun noch die Wirkung der in den Monozyten produzierten Interleukine hinzutritt. Dies wäre ein erster Schritt in die Richtung, dem komplexen Vorgang der Gefäßverkalkung in weiteren Versuchen Rechnung zu tragen.

Als weitere mögliche Ursache vaskulärer Verkalkung sind neben Zellen und Interleukinen die Urämietoxine zu nennen. Die Gefäßverkalkung, die in CNI-Patienten vorherrscht, wird auch ursächlich mit ihnen in Verbindung gebracht. Dies wäre also ein weiterer zu untersuchender Faktor, welcher in chronisch niereninsuffizienten Patienten neben Pentraxinen Verkalkung induzieren könnte. Viele Urämietoxine sind nicht eindeutig identifiziert, was die Untersuchung ihres Einflusses im Rahmen der vaskulären Kalzifikation erschwert. Um zu untersuchen, welchen Anteil an der Verkalkung Pentraxine und welchen Anteil Urämietoxine haben, wäre folgender Versuchsaufbau denkbar: Es werden wiederum glatte Muskelzellen mit Kontroll- und Kalzifikationsmedium inkubiert. Dann wird Serum von ansonsten gesunden Dialysepatienten abgenommen und die SMC damit für einige Tage inkubiert. Als Kontrolle werden noch Zellen mit Serum von gesunden Probanden inkubiert. Anschließend sollte wiederum die Verkalkung mit mehreren Methoden gemessen werden. Um nun herauszufinden, welchen Anteil das im Patientenserum enthaltene CRP und welches die Urämietoxine haben, müsste das CRP antagonisiert werden.

Hierzu wäre die von Pepys et al entwickelte Methode der CRP-Inaktivierung mittels Phosphocholinen sehr geeignet. Diese Arbeitsgruppe entwickelte ein Molekül namens 1,6-Bis(Phosphocholin)-Hexan. Fünf dieser Moleküle werden durch diese palindromische Bindung durch zwei pentamere CRP-Moleküle gebunden. Diese Bindung hat zur Folge, dass die Ligandenbindungsstelle des CRP verdeckt wird und CRP seine Funktionen nicht mehr ausüben kann. Die Applikation von 1,6-Bis(Phosphocholin)-Hexan in Ratten, die einen Myokardinfarkt erlebten, reduzierte die Infarktgröße und die kardiale Dysfunktion, die durch injiziertes CRP in Kontrollgruppen hervorgerufen wurde. Inhibition der CRP-Wirkung ist somit nicht nur eine interessante therapeutische Option der Kardioprotektion im akuten Myokardinfarkt. Es ist auch eine mögliche Option, CRP-Effekte experimentell isoliert zu untersuchen.

Weiterhin wäre es erstrebenswert, die Mechanismen, über die CRP und PTX 3 einen kalzifizierenden Effekt hervorrufen, genauer zu erforschen. So wurde zwar in dieser

Doktorarbeit gezeigt, dass Pentraxine Verkalkung in VSMC hervorrufen, jedoch ist nicht klar, ob dies über weitere Mediatoren funktioniert. Denkbar wäre nämlich auch, dass CRP in VSMC die Interleukinproduktion anregt und der direkte kalzifizierende Effekt dann durch die proinflammatorischen Proteine ausgelöst wird. Um dies genauer zu erforschen, müßte in dem in dieser Doktorarbeit verwendeten Zellkulturmodell erneut VSMC mit CRP bzw. PTX3 inkubiert werden. In der Folge sollte dann in den Überständen die Interleukine bestimmt werden.

Um weitere mögliche Mechanismen, über die CRP Kalzifikation in VSMC induziert, zu erforschen, wurde in der vorliegenden Arbeit die Expression des Kalzifikationsinhibitors MGP untersucht. Wir haben uns für diesen Verkalkungshemmer entschieden, weil er im Gegensatz zu Fetuin, welches in der Leber produziert wird, in VSMC synthetisiert wird. Die in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse deuteten auf eine Herunterregulation des MGP hin, auch wenn die Ergebnisse nicht eindeutig sind und die Versuchszahl für eine definitive Beantwortung dieser Frage höher hätte ausfallen müssen. Weitergehende Versuche in dieser Frage sind also erforderlich. Dazu wäre es ein nächster Schritt, die MGP-Konzentration zu messen. Denn die Messung von mRNA beinhaltet immer die Unsicherheit, dass die mRNA im Verlauf wieder abgebaut wurde, bevor es überhaupt zur Translation in Proteine kam. Denn erst sobald Proteine vorhanden sind, kann man von einem biologischen Effekt ausgehen. In der Folge wären auch weitere Kalzifikationsinhibitoren wie Osteopontin und Osteoprotegerin zu untersuchen.

Die Bedeutung der Differenzierung zwischen karboxyliertem und unkarboxyliertem MGP wurde bereits hervorgehoben. Deshalb wäre es wichtig, diese zukünftig bei Messungen des MGP zu berücksichtigen. So sollte unter CRP-Einfluss die Konzentration des karboxylierten und des unkarboxylierten MGP gemessen werden. Bei dem unkarboxylierten MGP wäre es wünschenswert, zwischen phosphorylierter und dephosphorylierter Form zu unterscheiden.

Als weiterer möglicher Wirkmechanismus ist sicherlich der Prozess der Apoptose in den Fokus zuzunehmen. Wie in der Einleitung diskutiert, ist die Apoptose ein zentraler Prozess der vaskulären Verkalkung. Die in der vorliegenden Arbeit untersuchte LDH ist allenfalls als sehr indirektes Maß wenn überhaupt für Zelltod und nicht für Apoptose zu werten. Freisetzung von LDH wird durch vielerlei Faktoren hervorgerufen und stellt keinen zuverlässigen Parameter für Apoptose dar. Außerdem war die Anzahl der Zellreihen in diesen Experimenten viel zu klein, als dass man eine Aussage über den

Einfluss von Pentraxinen auf den Zelltod treffen könnte. Statt der LDH eignen sich hierzu beispielsweise der Apoptosemarker BCL-2.

Die Mitglieder der BCL-2-Familie sind entscheidende Regulatoren der Apoptose in VSMC. Neben BCL-2 werden insbesondere Bcl-xl, Bcl-xs, und Bax in Modellen der Atherosklerose mit Apoptose in Zusammenhang gebracht. Weiterhin wurde kürzlich gezeigt, dass VSMC vor Apoptose durch erhöhte Expression von inhibitor of apoptosis protein (IAP)-1 geschützt werden. Um zu erforschen, ob Pentraxine in VSMC Apoptose induzieren, müssten also die oben genannten Apoptosemarker in einem Zellkulturmodell wie dem in der vorliegenden Arbeit verwendeten unter CRP- bzw. PTX3-Einfluss untersucht werden. [71-74]

Weiterhin wäre es denkbar, dass CRP in VSMC die Produktion weiterer inflammatorischer Proteine induziert. In dieser Arbeit wurde untersucht, ob Pentraxine die Interleukinproduktion in Monozyten anregt. Es wäre ebenso gut möglich, in dem bereits etablierten Versuchsmodell mit VSMC die Interleukinproduktion unter CRP-Einfluss zu untersuchen. Hierdurch würde im Gefäß eine lokale Entzündungsreaktion in Gang gesetzt, die den Prozess der Gefäßverkalkung weiter beschleunigen würde. Es müssten hierzu die Interleukinkonzentrationen in den Überständen bestimmt werden.

Mit diesen oben genannten Versuchen könnte der Einfluss der Pentraxine auf die Gefäßverkalkung durch Zellkulturexperimente weiter erforscht werden. Die Zellkultur hat jedoch auch einige Nachteile, die eine eindeutige Beurteilung der erzielten Ergebnisse häufig erschweren. So ist man bei der Zellkultur zur Gewährleistung ausreichenden Zellwachstums auf fetales Kalbsserum angewiesen. Hierin befinden sich vielerlei Wachstumsfaktoren und –stimulatoren, die im einzelnen nicht bekannt sind. Diese Interleukine, Hormone und Wachstumsfaktoren spielen möglicherweise in der Versuchsreihe auch eine Rolle und könnten mit den Pentraxinen in Wechselwirkung treten. Ob die beobachteten Effekte also wirklich direkte CRP-Effekte auf glatte Muskelzellen sind und ob die Effekte auch ohne diese Wachstumsfaktoren beobachtet worden wären, kann mit letzter Sicherheit nie gesagt werden. Denn theoretisch denkbar wäre auch, dass Verkalkungsinhibitoren, die im FKS enthalten sind, durch CRP weggebunden werden und so die Verkalkung entsteht. Dass CRP und PTX3 Verkalkung verstärken, wird hierdurch zwar nicht ernsthaft angezweifelt, jedoch muss diese theoretische Möglichkeit auch genannt werden.

Kritisch angemerkt werden muss also insgesamt, dass die in der Zellkultur beobachteten Effekte nicht 1:1 auf den Vorgang der Gefäßverkalkung übertragen werden können, da nicht alle Zellreihen und Kalzifikationsinhibitoren in einem Modell berücksichtigt werden können. Eine weitergehende Maßnahme, um die Komplexität dieser Prozesse mit all ihren Facetten besser abzubilden, wäre deshalb die Etablierung eines Tiermodells.

Im Bereich der Transplantationsforschung haben Sun et al die Allograft Arteriosklerose untersucht und erhöhte CRP-Level mit verstärkter Allograftarteriosklerose in Verbindung gebracht. Hierbei wurde in transplantierten Ratten in Korrelation mit erhöhten CRP-Werten eine verstärkte Arteriosklerose in histologischen und immunhistochemischen Untersuchungen gezeigt. [75]Ein ursächlicher Zusammenhang ist dadurch jedoch noch nicht erwiesen, dies könnte auch ein Epiphänomen sein. Da der Prozess der Allograftarteriosklerose sich auch vom Prozess der Gefäßverkalkung in verschiedenen Punkten unterscheidet, kann dies nicht ohne weiteres auf den Prozess der Gefäßverkalkung in chronisch niereninsuffizienten Patienten übertragen werden.

Zur Untersuchung der vaskulären Kalzifikation in Tieren wird vielfach aktuell das Mausmodell bevorzugt. So wurde von Miyazaki et al zur Untersuchung des Einflusses des Farnesoid X-Rezeptors auf die Gefäßverkalkung ein Mausmodell gewählt. Hier wurde durch 5/6-Nephrektomie chronische Niereninsuffizienz induziert. Es zeigte sich, dass die Aktivierung dieses Rezeptors in ApoE-Knock-out Mäusen die Gefäßverkalkung verhindert. [76]Dieses Modell würde sich auch zur Erforschung des Einflusses von Pentraxinen und Interleukinen auf Gefäßverkalkung in chronisch niereninsuffizienten Patienten eignen. Diesen Mäusen müsste also über mehrere Wochen CRP in verschiedenen Konzentrationen injiziert werden. Der Kontrollgruppe sollte Kochsalz gespritzt werden, um den Stress, der mit der Injektion verbunden ist, als möglichen confounder zu vermeiden. Nach verschiedenen Wochen müssten die Tiere getötet und die Aorta sowie die Koronarien auf Gefäßverkalkung mittels von Kossa-Färbung und Alizarinfärbung untersucht werden. Weiterhin sollte der Kalziumgehalt der Aorta gemessen werden. Zu erwarten wäre hier eine Zunahme der Gefäßverkalkung in den mit CRP behandelten Tieren.

Um zu zeigen, dass dies tatsächlich ein Effekt ist, der durch das CRP hervorgerufen wird, müssten Methoden angewandt werden, die den CRP-Effekt in einer weiteren

Kontrollgruppe aufheben. Hierzu wäre wiederum die von Pepys et al entwickelte Methode der CRP-Inaktivierung mittels Phosphocholinen (s.o.) sehr geeignet.

Das oben bereits angeführte Tiermodell sollte in weiterführenden Versuchen also erweitert werden. Es sollte drei Gruppen geben, nämlich eine Kontrollgruppe, eine Gruppe, die CRP erhält und eine Gruppe die CRP und 1,6-Bis(Phosphocholin)-Hexan erhält. Mit dem 1,6-Bis(Phosphocholin)-Hexan läßt sich das CRP wirksam antagonisieren. Hieran ließe sich untersuchen, ob die in der vorliegenden Arbeit beobachtete Effekte, dass nämlich CRP Verkalkung induziert, 1. auch in vivo reproduzierbar ist, und 2. wirklich dem CRP zuzuordnen ist.

Als Fernziel sollte aber stehen, den chronischen CRP-Effekt auf Gefäßverkalkung im Menschen genauer zu untersuchen. Da es sich aus ethischen Gründen verbietet, Menschen CRP zu applizieren, müßte eine Population gefunden werden, die chronisch erhöhte CRP-Werte aufweist. Hierzu eignen sich chronisch niereninsuffiziente Patienten, die ansonsten gesund sind, insbesondere keine akuten Infektgeschehen aufweisen und möglichst keine vorbestehende koronare Herzerkrankung aufweisen sollten. In einer Gruppe sollte versucht werden, dass CRP zu senken. Bis das von Pepys et al entwickelte 1,6-Bis-(Phosphocholin)-Hexan ausreichend erprobt ist und dem Menschen appliziert werden darf, werden jedoch noch einige Jahre vergehen.

Als weitere Methode, CRP zu senken, soll die CRP-Apherese lediglich erwähnt werden. Dies ist eine bislang noch nicht etablierte Methode, mit der mit Anwendung eines extrakorporalen Verfahrens, nämlich der Apherese, CRP aus dem Blut adsorbiert werden kann. Sobald dieses Verfahren etabliert ist, stellt auch dies eine Möglichkeit dar, CRP zu entfernen und so seinen Effekt besser zu untersuchen. Es wird also noch dauern, bis Fallkontrollstudien durchgeführt werden können, in denen der CRP-Effekt im Menschen untersucht wird.

CRP oder Endotoxin?

Jede Arbeit, die CRP-Effekte untersucht, muss sich der Kritik, dass die beobachteten Effekte möglicherweise nicht dem CRP sondern dem kontaminierenden Endotoxin, welches man mit dem CRP appliziert hat ,geschuldet sind, stellen. Dies gilt für Zellkultur- und Tierversuche gleichermaßen. Diese Diskussion wurde hervorgerufen durch die Arbeit von Bisioendial et altera. [67] Sie applizierten gesunden, freiwilligen Probanden intravenös rekombinant hergestelltes, humanes CRP. Anschließend wiesen

sie eine Inflammationsreaktion in Form von erhöhten Serumwerten von IL-6, IL-8, sekretorische Phospholipase A2 und Serum Amyloid A Protein nach.

Diese Arbeit wurde in der Folge sehr stark kritisiert. So kritisierte Berg et al. in einem Leserbrief, dass eine große Wahrscheinlichkeit bestehe, dass das aus E.coli generierte CRP mit Endotoxin kontaminiert gewesen sei. Auch die von Bisio et al. verwendete Methode, den Endotoxingehalt zu reduzieren, nämlich mit Gelfiltration, sei hierzu nicht geeignet. Diesem Standpunkt schlossen sich Pepys et al. an, und untermauerten diesen mit einer vergleichenden Arbeit.[68] Sie gewannen humanes CRP aus Aszitesflüssigkeit und reinigten diesen bis zu einem Endotoxingehalt von 0,9 EU/mg CRP mittels Dialyse auf. Sie verglichen dessen Effekte mit einem kommerziellen rekombinant aus E.coli gewonnenen CRP, der japanischen Firma Oriental Yeast, welches laut eigenen Messungen 46,6 EU Endotoxin / mg CRP enthielt, indem sie beide CRP Mäusen in vivo applizierten und Mausmakrophagen in vitro applizierten.

Anschließend untersuchten sie den Grad an Inflammation und bestimmten die Konzentrationen von Komplement und Serum Amyloid A Protein. Die Resultate ergaben stark erhöhte Werte von Komplement und Makrophagen nach Behandlung mit kommerziellem CRP, während das sauberere CRP aus Aszitesflüssigkeit keine solche Stimulation zur Folge hatte. Mit dieser Arbeit untermauerten sie die These, dass angebliche proinflammatorische Effekte nicht dem CRP sondern dem Endotoxin geschuldet seien.

Auch diese Arbeit wurde in der Folge stark kritisiert. So erwiderte Bisio in einem Leserbrief, dass das von Pepys genutzte kommerzielle CRP durch massiv erhöhte Endotoxinwerte sehr auffällig sei. Das in seiner Arbeit verwendete CRP der Firma BiosPacific enthielt hingegen weniger als 1,5 EU Endotoxin, weswegen Vergleiche dieser Arbeiten keinen Sinn hätten. Weiter argumentiert Bisio, dass diejenigen Endotoxinkonzentrationen, die in ihren CRP-Proben vorhanden waren in anderen Stimulationsversuchen mit Endotoxin nicht ausreichten, um in vivo oder in vitro einen proinflammatorischen Effekt zu erzielen. Schließlich weist er noch auf die eingeschränkte Vergleichbarkeit des CRP-Effektes in der Atherosklerose von Menschen und Mäusen hin. In Mäusen durchgeführte Experimente seien ungeeignet, an Menschen beobachtete Resultate zu widerlegen. Um die kontrovers diskutierte Frage eines proinflammatorischen Effektes auf Monozyten zu beantworten, führten wir Stimulationsversuche an Monozyten durch.

Die in der vorliegenden Arbeit erzielten Resultate bestätigen erneut einen proinflammatorischen Effekt des CRP. Es gelang der Nachweis, dass CRP tatsächlich Monozyten zur IL-1 β , IL-6 und TNF- α - Produktion stimuliert. Um einen unterliegenden Endotoxineffekt zu untersuchen, wurden die verwendeten CRP-Proben mehrfach auf Endotoxin untersucht. In der Folge wurden dann Monozyten mit Endotoxin stimuliert, um die Stimulationsschwelle, die für eine Monozytenstimulation erforderlich ist, zu ermitteln. Hierbei zeigte sich, dass die im CRP enthaltene Endotoxinmenge nicht ausreichend war, um eine Monozytenaktivierung hervorzurufen.

Auch die zusätzliche Antagonisierung von Endotoxin durch Polymyxin B in den Stimulationsversuchen mit CRP führte zu keinem Rückgang der Interleukinproduktion in Monozyten. Hiermit liegt ein weiterer Beleg für einen proinflammatorischen Effekt des CRP auf menschliche Monozyten unabhängig von Endotoxin vor. Die von uns erzielten Ergebnisse legen nahe, dass erhöhte CRP-Werte allein, unabhängig von Endotoxin eine Interleukinproduktion in Monozyten zur Folge haben.

Dennoch kann ein kontaminierender Endotoxineffekt nie sicher ausgeschlossen werden. So muss kritisch angemerkt werden, dass auch die Möglichkeit besteht, dass bei den Endotoxinmessungen mittels LAL deshalb kaum Endotoxin gemessen wurde, weil es zu diesem Zeitpunkt vom CRP gebunden war. In diesem Falle würden, sobald man das CRP auf Zellen gibt, andere Moleküle mit dem CRP in Wechselwirkung treten. Dann würde das Endotoxin frei werden und die beobachteten Effekte verursacht haben. Dieser Kritikpunkt kann auch durch die Polymyxinversuche nicht gänzlich entkräftet werden. Man könnte nämlich argumentieren, dass durch das CRP schon das gesamte Endotoxin gebunden wurde, und deshalb kein Unterschied durch zusätzliches Polymyxin nachweisbar war. Diese Punkte zeigen, dass ein kontaminierender Endotoxineffekt nie gänzlich ausgeschlossen werden kann. In dieser Arbeit ist es jedoch gelungen, die Wahrscheinlichkeit eines entscheidenden Endotoxineffekt weitgehend zu minimieren.

7 Zusammenfassung

Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz haben ein im Vergleich zur Normalbevölkerung um ein Vielfaches erhöhtes kardiovaskuläres Risiko. Bei diesen Patienten steht als zugrundeliegende Pathologie hauptsächlich die Arteriosklerose im Vordergrund, deren Grundlage der Prozess der vaskulären Kalzifikation ist. Hierbei wandelt sich die Media der Gefäßwand in verkalktes, knochenähnliches Gewebe um.

Der Grad an vaskulärer Kalzifikation korreliert stark mit der kardiovaskulären Mortalität und der Prognose des Patienten. Er korreliert weiterhin mit der Höhe verschiedener Inflammationsmarker wie dem C-reaktiven Protein (CRP) und Interleukin 6 (IL-6), die wiederum ihrerseits mit der kardiovaskulären Mortalität korrelieren. Aufgrund dieser Zusammenhänge wird vermutet, dass die chronische Inflammation dieser Patienten, die sowohl durch Urämie-assoziierte Faktoren als auch durch Modalitäten der Hämodialysebehandlung aufrechterhalten wird, mitverantwortlich für deren hohes kardiovaskuläres Risiko ist. Der Erhöhung von CRP bei Dialysepatienten wird nicht nur eine Markerfunktion für Inflammation zugesprochen, sondern es wird auch diskutiert, ob CRP selbst zur Arterioskleroseentstehung beiträgt. In der vorliegenden Arbeit sollte untersucht werden, ob CRP und PTX3 direkt *in vitro* eine Steigerung der Verkalkung von glatten Muskelzellen bewirken kann.

Ziel dieser Arbeit war es, eine mögliche direkte verkalkende Wirkung von CRP und PTX3 auf VSMC zu untersuchen. Weiterhin sollte der Einfluss auf die Expression des Verkalkungsinhibitors MGP untersucht werden. Darüber hinaus sollte die Frage, ob CRP und PTX3 proinflammatorische Wirkung auf Monozyten habe und sie zur Produktion weiterer Interleukine stimulieren, geklärt werden.

Humane glatte Muskelzellen wurden mit einem verkalkungsinduzierenden Medium, was entweder CRP, PTX3, Endotoxin oder keinen weiteren Zusatz enthielt, inkubiert. Anschließend wurde der Grad der Verkalkung sowohl mit der Von Kossa Färbemethode als auch durch Kalziummessung bestimmt. Darüberhinaus wurde nach den Inkubationsversuchen die Expression des Kalzifikationsinhibitors MGP mittels semiquantitativer PCR untersucht. Um die Wirkung der Pentraxine auf Monozyten zu untersuchen, wurden Monozyten von gesunden Probanden isoliert und mit PTX3, CRP

oder Lipopolysachariden inkubiert. Anschließend wurde die Produktion der Interleukine 1, 6 und TNF α mittels ELISA bestimmt. Die Endotoxinkonzentration der Pentraxine wurde mehrfach gemessen. Die Versuche wurden auch mit Polymyxin B, einem Endotoxinantagonist wiederholt, um einen möglichen Endotoxineinfluss zu untersuchen.

CRP und PTX 3 steigern dosisabhängig die Kalziuminkorporation in verkalkende humane glatte Muskelzellen. In der maximalen CRP-Konzentration zeigte sich eine Verdreifachung, in der maximalen PTX-Konzentration eine Verdoppelung der Kalziuminkorporation. Dies ließ sich mit der Kalziummessung demonstrieren und mit der von Kossa Färbemethode bestätigen. Unter Inkubation von glatten Muskelzellen mit CRP zeigte sich eine reduzierte Konzentration des Verkalkungsinhibitors MGP. Diese war jedoch nicht statistisch signifikant.

Endotoxin hat keinen verkalkungsinduzierenden Effekt auf VSMC.

PTX3 stimuliert Monozyten zur Produktion von IL-1 und IL-6 um ein Vielfaches.

CRP stimuliert Monozyten zur Produktion von IL-1, IL-6 und TNF α um ein Vielfaches.

Diese Effekte scheinen von kontaminierendem Endotoxin unabhängig zu sein.

Waren CRP und PTX3 zuvor vor allem als Prädiktoren kardiovaskulärer Ereignisse bekannt und galten sie vor allem als korrelierendes Epiphänomen der vaskulären Kalzifikation und der Inflammation, so lässt sich ihnen nun mit den Ergebnissen dieser Arbeit eine aktive Rolle sowohl in der vaskulären Kalzifikation als auch in der Inflammation zuschreiben. Sie verstärken direkt die vaskuläre Kalzifikation in glatten Gefäßmuskelzellen. Außerdem induzieren sie in Monozyten die Produktion von Interleukinen, die bekannt dafür sind, die vaskuläre Kalzifikation ihrerseits zu verstärken. Es konnte den Pentraxinen somit auf verschiedenen Ebenen ein verkalkungsfördernder Effekt nachgewiesen werden.

Über die genauen Mechanismen, wie das CRP die Verkalkung induziert, besteht zum jetzigen Zeitpunkt keine Klarheit. Die in dieser Arbeit beobachteten Hinweise auf eine Hemmung des Verkalkungsinhibitors MGP wäre ein weiterer möglicher vom CRP beeinflusster Mechanismus. Die Ergebnisse dieser Arbeit bezüglich des MGP waren jedoch nicht statistisch signifikant.

Die Verstärkung der vaskulären Kalzifikation und der Inflammation durch Pentraxine kann also als ein Grund für die Korrelation von Pentraxinwerten mit kardiovaskulären Ereignissen betrachtet werden.

Klinisch bedeutet dies, dass eine Antagonisierung des CRP oder eine Senkung der Inflammation für Patienten mit chronisch erhöhten CRP-Werten im Rahmen einer inflammatorischen Erkrankung wie beispielsweise der chronischen Niereninsuffizienz von Vorteil sein könnte.

8 Abkürzungen

AMI	Akuter Myokardinfarkt
CBFA-1	Core-binding factor alpha 1
CNI	Chronische Niereninsuffizienz
CRP	C-reaktives Protein
DP-UC-MGP	Dephosphoryliertes unkarboxyliertes MGP
GFR	Glomerulären Filtrationsrate
IL	Interleukin
MMP	Matrix Metalloproteinase
MGP	Matrix Gamma Carboxy Glutamat Protein
M-CSF	Macrophage-Colony-Stimulating factor
OPG	Osteoprotegerin
OPN	Osteopontin
PCR	Polymerase chain reaction
Pit-1	Phosphattransporter
PTX 3	Pentraxin 3
TNF α	Tumornekrosefaktor α
VK	Vaskuläre Kalzifikation
VCAM-1	Vascular Cell Adhesion Molecule 1

9 Literaturverzeichnis

1. Chertow GM, Normand SL, Silva LR, *et al.*: Survival after acute myocardial infarction in patients with end-stage renal disease: results from the cooperative cardiovascular project. *Am J Kidney Dis* 35:1044-1051, 2000
2. Herzog CA, Ma JZ, Collins AJ: Poor long-term survival after acute myocardial infarction among patients on long-term dialysis. *N Engl J Med* 339:799-805, 1998
3. Moe SM, O'Neill KD, Duan D, *et al.*: Medial artery calcification in ESRD patients is associated with deposition of bone matrix proteins. *Kidney Int* 61:638-647, 2002
4. Schwarz U, Buzello M, Ritz E, *et al.*: Morphology of coronary atherosclerotic lesions in patients with end-stage renal failure. *Nephrol Dial Transplant* 15:218-223, 2000
5. Gross ML, Meyer HP, Ziebart H, *et al.*: Calcification of coronary intima and media: immunohistochemistry, backscatter imaging, and x-ray analysis in renal and nonrenal patients. *Clin J Am Soc Nephrol* 2:121-134, 2007
6. Eiji Ishimura SO, Hiromichi Taniwaki, Akane Kizu, Takao Tsuchida, Atsushi Shioi, Tetsuo Shoji, Tsutomu Tabata, Masaaki Inaba YN: Different Risk Factors for Vascular Calcification in End-Stage Renal Disease between Diabetics and Nondiabetics: The Respective Importance of Glycemic and Phosphate Control. *Kidney Blood Press Res* 1:10–15, 2007
7. London GM, Guerin AP, Marchais SJ, *et al.*: Arterial media calcification in end-stage renal disease: impact on all-cause and cardiovascular mortality. *Nephrol Dial Transplant* 18:1731-1740, 2003
8. Okuno S, Ishimura E, Kitatani K, *et al.*: Presence of abdominal aortic calcification is significantly associated with all-cause and cardiovascular mortality in maintenance hemodialysis patients. *Am J Kidney Dis* 49:417-425, 2007
9. Shanahan CM, Cary NR, Salisbury JR, *et al.*: Medial localization of mineralization-regulating proteins in association with Monckeberg's sclerosis: evidence for smooth muscle cell-mediated vascular calcification. *Circulation* 100:2168-2176, 1999
10. Shanahan CM, Cary NR, Metcalfe JC, *et al.*: High expression of genes for calcification-regulating proteins in human atherosclerotic plaques. *J Clin Invest* 93:2393-2402, 1994
11. Speer MY, Giachelli CM: Regulation of cardiovascular calcification. *Cardiovasc Pathol* 13:63-70, 2004
12. Bucay N, Sarosi I, Dunstan CR, *et al.*: osteoprotegerin-deficient mice develop early onset osteoporosis and arterial calcification. *Genes Dev* 12:1260-1268, 1998
13. Bennett BJ, Scatena M, Kirk EA, *et al.*: Osteoprotegerin inactivation accelerates advanced atherosclerotic lesion progression and calcification in older ApoE^{-/-} mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 26:2117-2124, 2006
14. Heiss A, DuChesne A, Denecke B, *et al.*: Structural basis of calcification inhibition by alpha 2-HS glycoprotein/fetuin-A. Formation of colloidal calciprotein particles. *J Biol Chem* 278:13333-13341, 2003
15. Stenvinkel P, Wang K, Qureshi AR, *et al.*: Low fetuin-A levels are associated with cardiovascular death: Impact of variations in the gene encoding fetuin. *Kidney Int* 67:2383-2392, 2005

16. Jono S, McKee MD, Murry CE, *et al.*: Phosphate regulation of vascular smooth muscle cell calcification. *Circ Res* 87:E10-17, 2000
17. Engelse MA, Neele JM, Bronckers AL, *et al.*: Vascular calcification: expression patterns of the osteoblast-specific gene core binding factor alpha-1 and the protective factor matrix gla protein in human atherogenesis. *Cardiovasc Res* 52:281-289, 2001
18. de Vries CJ, van Achterberg TA, Horrevoets AJ, *et al.*: Differential display identification of 40 genes with altered expression in activated human smooth muscle cells. Local expression in atherosclerotic lesions of smags, smooth muscle activation-specific genes. *J Biol Chem* 275:23939-23947, 2000
19. Yang H, Curinga G, Giachelli CM: Elevated extracellular calcium levels induce smooth muscle cell matrix mineralization in vitro. *Kidney Int* 66:2293-2299, 2004
20. Chen NX, Duan D, O'Neill KD, *et al.*: The mechanisms of uremic serum-induced expression of bone matrix proteins in bovine vascular smooth muscle cells. *Kidney Int* 70:1046-1053, 2006
21. Devuyst O, van Ypersele de Strihou C: Nitric oxide, advanced glycation end products, and uremia. *Kidney Int* 58:1814-1815, 2000
22. Jono S, Nishizawa Y, Shioi A, *et al.*: 1,25-Dihydroxyvitamin D3 increases in vitro vascular calcification by modulating secretion of endogenous parathyroid hormone-related peptide. *Circulation* 98:1302-1306, 1998
23. Jono S, Nishizawa Y, Shioi A, *et al.*: Parathyroid hormone-related peptide as a local regulator of vascular calcification. Its inhibitory action on in vitro calcification by bovine vascular smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 17:1135-1142, 1997
24. Reynolds JL, Joannides AJ, Skepper JN, *et al.*: Human vascular smooth muscle cells undergo vesicle-mediated calcification in response to changes in extracellular calcium and phosphate concentrations: a potential mechanism for accelerated vascular calcification in ESRD. *J Am Soc Nephrol* 15:2857-2867, 2004
25. Clarke M, Bennett M: The emerging role of vascular smooth muscle cell apoptosis in atherosclerosis and plaque stability. *Am J Nephrol* 26:531-535, 2006
26. Clarke MC, Figg N, Maguire JJ, *et al.*: Apoptosis of vascular smooth muscle cells induces features of plaque vulnerability in atherosclerosis. *Nat Med* 12:1075-1080, 2006
27. Oh J, Wunsch R, Turzer M, *et al.*: Advanced coronary and carotid arteriopathy in young adults with childhood-onset chronic renal failure. *Circulation* 106:100-105, 2002
28. Ishimura E, Okuno S, Kitatani K, *et al.*: C-reactive protein is a significant predictor of vascular calcification of both aorta and hand arteries. *Semin Nephrol* 24:408-412, 2004
29. Brinda KV, Surolia A, Vishveshwara S: Insights into the quaternary association of proteins through structure graphs: a case study of lectins. *Biochem J* 391:1-15, 2005
30. Breviario F, d'Aniello EM, Golay J, *et al.*: Interleukin-1-inducible genes in endothelial cells. Cloning of a new gene related to C-reactive protein and serum amyloid P component. *J Biol Chem* 267:22190-22197, 1992
31. Tsirpanlis G: Inflammation in atherosclerosis and other conditions: a response to danger. *Kidney Blood Press Res* 28:211-217, 2005

32. Thomassen MJ, Meeker DP, Deodhar SD, *et al.*: Activation of human monocytes and alveolar macrophages by a synthetic peptide of C-reactive protein. *J Immunother Emphasis Tumor Immunol* 13:1-6, 1993
33. Doni A, Michela M, Bottazzi B, *et al.*: Regulation of PTX3, a key component of humoral innate immunity in human dendritic cells: stimulation by IL-10 and inhibition by IFN-gamma. *J Leukoc Biol* 79:797-802, 2006
34. Jaillon S, Peri G, Delneste Y, *et al.*: The humoral pattern recognition receptor PTX3 is stored in neutrophil granules and localizes in extracellular traps. *J Exp Med* 204:793-804, 2007
35. Klouche M, Peri G, Knabbe C, *et al.*: Modified atherogenic lipoproteins induce expression of pentraxin-3 by human vascular smooth muscle cells. *Atherosclerosis* 175:221-228, 2004
36. Nauta AJ, Bottazzi B, Mantovani A, *et al.*: Biochemical and functional characterization of the interaction between pentraxin 3 and C1q. *Eur J Immunol* 33:465-473, 2003
37. Rovere P, Peri G, Fazzini F, *et al.*: The long pentraxin PTX3 binds to apoptotic cells and regulates their clearance by antigen-presenting dendritic cells. *Blood* 96:4300-4306, 2000
38. Garlanda C, Hirsch E, Bozza S, *et al.*: Non-redundant role of the long pentraxin PTX3 in anti-fungal innate immune response. *Nature* 420:182-186, 2002
39. Diniz SN, Nomizo R, Cisalpino PS, *et al.*: PTX3 function as an opsonin for the dectin-1-dependent internalization of zymosan by macrophages. *J Leukoc Biol* 75:649-656, 2004
40. Ross R: Atherosclerosis--an inflammatory disease. *N Engl J Med* 340:115-126, 1999
41. Boenisch O, Ehmke KD, Heddergott A, *et al.*: C-reactive-protein and cytokine plasma levels in hemodialysis patients. *J Nephrol* 15:547-551, 2002
42. Stenvinkel P, Alvestrand A: Inflammation in end-stage renal disease: sources, consequences, and therapy. *Semin Dial* 15:329-337, 2002
43. Boehme M, Kaehne F, Kuehne A, *et al.*: Pentraxin 3 is elevated in haemodialysis patients and is associated with cardiovascular disease. *Nephrol Dial Transplant* 22:2224-2229, 2007
44. Yuen D, Chan CT: Inflammation, cardiovascular disease and nocturnal hemodialysis. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 14:538-542, 2005
45. Tintut Y, Patel J, Territo M, *et al.*: Monocyte/macrophage regulation of vascular calcification in vitro. *Circulation* 105:650-655, 2002
46. Tintut Y, Patel J, Parhami F, *et al.*: Tumor necrosis factor-alpha promotes in vitro calcification of vascular cells via the cAMP pathway. *Circulation* 102:2636-2642, 2000
47. Menon V, Greene T, Wang X, *et al.*: C-reactive protein and albumin as predictors of all-cause and cardiovascular mortality in chronic kidney disease. *Kidney Int* 68:766-772, 2005
48. Libby P, Ridker PM: Inflammation and atherosclerosis: role of C-reactive protein in risk assessment. *Am J Med* 116 Suppl 6A:9S-16S, 2004
49. Danesh J, Wheeler JG, Hirschfield GM, *et al.*: C-reactive protein and other circulating markers of inflammation in the prediction of coronary heart disease. *N Engl J Med* 350:1387-1397, 2004

50. Dimitrijevic O, Stojcevski BD, Ignjatovic S, *et al.*: Serial measurements of C-reactive protein after acute myocardial infarction in predicting one-year outcome. *Int Heart J* 47:833-842, 2006
51. Pearson TA, Mensah GA, Alexander RW, *et al.*: Markers of inflammation and cardiovascular disease: application to clinical and public health practice: A statement for healthcare professionals from the Centers for Disease Control and Prevention and the American Heart Association. *Circulation* 107:499-511, 2003
52. Menon V, Wang X, Greene T, *et al.*: Relationship between C-reactive protein, albumin, and cardiovascular disease in patients with chronic kidney disease. *Am J Kidney Dis* 42:44-52, 2003
53. Zimmermann J, Herrlinger S, Pruy A, *et al.*: Inflammation enhances cardiovascular risk and mortality in hemodialysis patients. *Kidney Int* 55:648-658, 1999
54. Rolph MS, Zimmer S, Bottazzi B, *et al.*: Production of the long pentraxin PTX3 in advanced atherosclerotic plaques. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 22:e10-14, 2002
55. Latini R, Maggioni AP, Peri G, *et al.*: Prognostic significance of the long pentraxin PTX3 in acute myocardial infarction. *Circulation* 110:2349-2354, 2004
56. Peri G, Inrona M, Corradi D, *et al.*: PTX3, A prototypical long pentraxin, is an early indicator of acute myocardial infarction in humans. *Circulation* 102:636-641, 2000
57. Haydar AA, Covic A, Colhoun H, *et al.*: Coronary artery calcification and aortic pulse wave velocity in chronic kidney disease patients. *Kidney Int* 65:1790-1794, 2004
58. Blacher J, Asmar R, Djane S, *et al.*: Aortic pulse wave velocity as a marker of cardiovascular risk in hypertensive patients. *Hypertension* 33:1111-1117, 1999
59. Guerin AP, Blacher J, Pannier B, *et al.*: Impact of aortic stiffness attenuation on survival of patients in end-stage renal failure. *Circulation* 103:987-992, 2001
60. Pepys MB, Hirschfield GM, Tennent GA, *et al.*: Targeting C-reactive protein for the treatment of cardiovascular disease. *Nature* 440:1217-1221, 2006
61. Yang J, Wang J, Zhu S, *et al.*: C-reactive protein augments hypoxia-induced apoptosis through mitochondrion-dependent pathway in cardiac myocytes. *Mol Cell Biochem*, 2007
62. Hattori Y, Matsumura M, Kasai K: Vascular smooth muscle cell activation by C-reactive protein. *Cardiovasc Res* 58:186-195, 2003
63. Jenny NS, Brown ER, Detrano R, *et al.*: Associations of inflammatory markers with coronary artery calcification: results from the Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis. *Atherosclerosis* 209:226-229
64. Schurgers LJ, Spronk HM, Skepper JN, *et al.*: Post-translational modifications regulate matrix Gla protein function: importance for inhibition of vascular smooth muscle cell calcification. *J Thromb Haemost* 5:2503-2511, 2007
65. Hermans MM, Vermeer C, Kooman JP, *et al.*: Undercarboxylated matrix GLA protein levels are decreased in dialysis patients and related to parameters of calcium-phosphate metabolism and aortic augmentation index. *Blood Purif* 25:395-401, 2007
66. Ramadan MM, Mahfouz EM, Gomaa GF, *et al.*: Evaluation of coronary calcium score by multidetector computed tomography in relation to endothelial function and inflammatory markers in asymptomatic individuals. *Circ J* 72:778-785, 2008

67. Geng YJ, Wu Q, Muszynski M, *et al.*: Apoptosis of vascular smooth muscle cells induced by in vitro stimulation with interferon-gamma, tumor necrosis factor-alpha, and interleukin-1 beta. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 16:19-27, 1996
68. Bevilacqua MP, Pober JS, Majeau GR, *et al.*: Interleukin 1 (IL-1) induces biosynthesis and cell surface expression of procoagulant activity in human vascular endothelial cells. *J Exp Med* 160:618-623, 1984
69. Bevilacqua MP, Pober JS, Wheeler ME, *et al.*: Interleukin-1 activation of vascular endothelium. Effects on procoagulant activity and leukocyte adhesion. *Am J Pathol* 121:394-403, 1985
70. Libby P, Sukhova G, Lee RT, *et al.*: Cytokines regulate vascular functions related to stability of the atherosclerotic plaque. *J Cardiovasc Pharmacol* 25 Suppl 2:S9-12, 1995
71. Igase M, Okura T, Kitami Y, *et al.*: Apoptosis and Bcl-xs in the intimal thickening of balloon-injured carotid arteries. *Clin Sci (Lond)* 96:605-612, 1999
72. Kockx MM, De Meyer GR, Buysse N, *et al.*: Cell composition, replication, and apoptosis in atherosclerotic plaques after 6 months of cholesterol withdrawal. *Circ Res* 83:378-387, 1998
73. Konstadoulakis MM, Kymionis GD, Karagiani M, *et al.*: Evidence of apoptosis in human carotid atheroma. *J Vasc Surg* 27:733-739, 1998
74. Erl W, Hansson GK, de Martin R, *et al.*: Nuclear factor-kappa B regulates induction of apoptosis and inhibitor of apoptosis protein-1 expression in vascular smooth muscle cells. *Circ Res* 84:668-677, 1999
75. Sun H, Lu X, Wu S, *et al.*: The effects of C-reactive protein, interleukin-6, and tumor necrosis factor-alpha in rat allograft adventitial inflammation and allograft arteriosclerosis. *Transplant Proc* 41:3909-3912, 2009
76. Miyazaki-Anzai S, Levi M, Kratzer A, *et al.*: Farnesoid X receptor activation prevents the development of vascular calcification in ApoE^{-/-} mice with chronic kidney disease. *Circ Res* 106:1807-1817

10 Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

11 PUBLIKATIONEN

- April 2007 Vortrag auf dem „World Congress of Nephrology“ in Rio de Janeiro: „The Pentraxins CRP and PTX 3 augment calcification of human VSMC.“
- Juni 2007 Postervorstellung auf dem ERA-EDTA in Barcelona: „The Pentraxins CRP and PTX 3 augment calcification of human VSMC“
- September 2009 Vortrag auf dem ISBP in Stockholm mit „Randomized controlled trial with high-cutoff-membranes in chronic hemodialysis patients: humoral and cellular markers of inflammation“
- Oktober 2009 Teilnahme am ASN in San Diego mit Vortrag „Randomized controlled trial with high-cutoff-membranes in chronic hemodialysis patients: humoral and cellular markers of inflammation“
- Oktober 2009 **The pentraxins C-reactive protein and pentraxin3 augment calcification of human vascular smooth muscle cells and induce interleukin-6 in mononuclear cells**
D. Zickler, P. Koehne, N. Otto, O. Boenisch, A. Wilde, U. Frei, R. Schindler (Eingereicht)
- Oktober 2009 Randomized controlled trial with high-cutoff-membranes in chronic hemodialysis patients: humoral and cellular markers of inflammation. Daniel Zickler, Christian Epple, Sonia Briese, Andreas Lun, Markus Storr, Werner Beck and Ralf Schindler. (Eingereicht)
- November 2009 „Removal of Immunoglobulin Free Light Chains by High Cut-Off Haemodialysis in Patients with Acute Renal Failure Secondary to Multiple Myeloma: An Multi-Center, International Chart Review.“ Colin A Hutchison, Parisa Airia, Nils Heyne, Ralf Schindler, Daniel Zickler, Arthur R Bradwell, Mark Cook, Paul Cockwell, Daniel Grima. (Eingereicht)

EIDESSTÄTLICHE ERKLÄRUNG

Hiermit erkläre ich, Daniel Zickler, geb. am 25.2.1980, an Eides Statt, dass die Dissertation „Einfluss von C-reaktivem Protein und Pentraxin 3 auf die Kalzifikation glatter Muskelzellen und Zytokinproduktion von Monozyten im Prozess der Arteriosklerose“ von mir selbst und ohne die unzulässige Hilfe Dritter verfasst wurde, auch in Teilen keine Kopie anderer Arbeiten darstellt und die benutzten Hilfsmittel sowie die Literatur vollständig angegeben sind.

Danksagungen

Ganz besonderer Dank gilt meinem Doktorvater und Betreuer Herrn Prof. Dr. Schindler, der mit starkem Engagement, unermüdlichem Einsatz und großer Detailkenntnis meine Doktorarbeit betreut hat und für mich stets ansprechbar war.

Ferner bedanke ich mich bei Herrn Prof. Dr. Frei für die Möglichkeit, in seiner Abteilung unter idealen Arbeitsbedingungen forschen und promovieren zu können.

Weiterhin danke ich Dr. Petra Köhne, die mir die Methode der Isolation glatter Muskelzellen nahegebracht hat, und Dr. Olaf Boenisch für die Anleitung in der Methode der Monozytenisolation.

Dank gebührt auch Adelheid Wilde, die mich in der Laborarbeit stets tatkräftig unterstützt hat.

Nicht zuletzt möchte ich meinen Eltern danken, die mir durch ihre fortwährende Unterstützung das Studium und diese Arbeit ermöglichten und sie mit großer Anteilnahme verfolgt haben.

Der wichtigste Dank geht an meine Frau Maripili für Ihre Unterstützung, Ihren Rat und Ihre Ermutigung.