

Aus der Medizinischen Klinik
der Universität Würzburg
Direktor: Professor Dr. med. G. Ertl

Zellulärer und gewebsspezifischer Nachweis von
C-reaktivem Protein.

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der
Medizinischen Fakultät
der
Bayerischen Julius-Maximilians-Universität zu Würzburg

vorgelegt von
Frank Guderian
aus Würzburg

Würzburg, Mai 2004

Referent: Prof. Dr. C. Wanner

Koreferent: Prof. Dr. J. Dämmrich

Dekan: Prof. Dr. S. Silbernagl

Tag der mündlichen Prüfung:

26. April 2005

Der Promovend ist Arzt.

1. Einleitung.....	1
1.1 C-reaktives Protein (CRP)	1
1.1.1 Inflammation.....	1
1.1.2 Funktionen des CRP	2
1.1.3 Biochemie und Struktur des CRP.....	3
1.2 Rolle des CRP bei der Atherosklerose.....	5
1.3 Die diabetische Nephropathie.....	6
1.4 Zielsetzungen	8
1.4.1 CRP-Nachweis in der Zellkultur.....	8
1.4.2 CRP-Nachweis in der diabetischen Nephropathie	8
1.4.3 Charakterisierung des CRP-Antikörpers	9
2. Material und Methoden.....	10
2.1 Chemikalien und Biochemikalien	10
2.2 Materialien	10
2.3 Zellkultur	10
2.3.1 Humane Hepatozyten und CRP-Stimulation	10
2.3.2 Humane Monozyten und Herstellung konditionierter Medien	11
2.3.4 Molekulare Analysen (PCR)	11
2.3.5 Westernblot und Immunpräzipitation.....	13
2.4 Humanes Nierengewebe	15
2.4.1 Charakterisierung des clone 8.....	15
2.4.2 Patienten	15
2.4.3 Immunhistochemie	16
3. Ergebnisse	18
3.1 Zellkultur	18
3.1.1 Nachweis von CRP-mRNA in Hepatozyten und Monozyten (PCR) .	18
3.1.2 Nachweis von CRP-Protein in Hepatozyten (Westernblot und Immunpräzipitation).....	21
3.2 Humane Nierenschnitte	25
3.2.1 Spezifität des clone 8	25

3.2.2 Patientendaten	25
3.2.3 CRP-Färbung in gesunden Nieren, bei Patienten mit diabetischer Nephropathie sowie IgA-Nephritis	26
3.2.4 Laborparameter und Korrelation mit CRP-Signalstärke	30
4. Diskussion	37
5. Zusammenfassung	42
6. Literaturverzeichnis	43

1. Einleitung

1.1 C-reaktives Protein (CRP)

1.1.1 Inflammation

Der menschliche Körper wird von zahlreichen schädigenden Reizen bedroht. Diese können mechanischer, chemischer, physikalischer oder biologischer Natur sein. Um den schädigenden Reiz und seine Folgen zu beseitigen, kommt es im Organismus zu einer Entzündungsreaktion. Dabei kann zwischen lokaler und allgemeiner Entzündungsreaktion unterschieden werden. Die lokale Reaktion führt zu Proliferation von ortständigen Zellen sowie zu Veränderungen der lokalen Durchblutung. Der Verlauf kann in drei Phasen eingeteilt werden. In der ersten Phase ist eine Verengung der Arteriolen zu beobachten. Die zweite Phase ist gekennzeichnet durch eine Hyperämie. Die Konstriktion der Venolen in der dritten Phase führt u.a. zum klinischen Bild der Schwellung. Ortständige Makrophagen und Thrombozyten bewirken durch die Ausschüttung von Mediatoren eine Permeabilitätsstörung. Es kommt zur Blutplasmaexsudation und zur Einwanderung von Granulozyten, Makrophagen und Lymphozyten. Diese setzen weitere Mediatoren frei, die sowohl die lokale als auch die allgemeine Antwort des Körpers beeinflussen können. Die für die Inflammation wichtigsten Cytokine sind Interleukin-1 (IL-1), IL-6, IL-11, Tumornekrosefaktor α (TNF- α), transforming growth factor β (TGF- β), Interferon γ (IFN- γ), leukemia inhibitory factor (LIF), Onkostatine M (OSM), ciliary neurotrophic factor (CNTF) und Retinolsäure. Das typische klinische Bild einer Entzündungsreaktion mit Krankheitsgefühl, Fieber, einer Linksverschiebung im Blutbild und Stoffwechseleränderungen in zahlreichen Organen ist hauptsächlich auf die Wirkungen dieser Cytokine zurückzuführen. Sie wirken in erster Linie auf die Leber. Dort kommt es zur Bildung von sog. Akut-Phase-Proteinen. Darunter versteht man Proteine, deren Plasmakonzentration während einer Entzündung um mehr als 25% ansteigt oder abfällt. Die wichtigsten Akut-Phase-Proteine beim Menschen sind das C-reaktive Protein (CRP) und das Serum Amyloid A

(SAA). Zu den Akut-Phase-Proteinen gehören außerdem Proteinase-Inhibitoren, metallbindende Proteine, Komplementfaktoren, Proteine des Gerinnungssystems und zahlreiche weitere. Durch Wechselwirkungen mit dem Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren-System kommt es überwiegend über TNF- α und IL-1 zu einer Verstärkung der Bildung von Akut-Phase-Proteinen. Diese bewirken eine Neutralisation des schädigenden Agens und eine Eindämmung des Gewebeschadens. Sie können Reparaturmechanismen steigern und die Regeneration anregen oder über ihre Funktion als Opsonine sowie über die Aktivierung des Komplementsystems die unspezifische Abwehr steigern. Allerdings werden den Akut-Phase-Proteinen auch Eigenschaften zugeschrieben, die zu einer Verschlechterung des Gesundheitszustandes beitragen können. So ist insbesondere bei chronischen Entzündungen das Risiko für die Entstehung von Atherosklerose erhöht, es kommt vermehrt zu kardiovaskulären Komplikationen und zu reaktiven Erscheinungen wie z.B. Amyloidose.

1.1.2 Funktionen des CRP

Beim C-reaktiven Protein handelt es sich um ein phylogenetisch sehr altes Protein. Es geht wahrscheinlich auf ein über 200 Millionen Jahre altes Vorläuferprotein zurück. In zahlreichen Tiergattungen konnte man Proteine nachweisen, die dem CRP sehr ähnlich sind, selbst wenn sie dabei nicht immer die Funktion eines Akut-Phase-Proteins übernehmen. Im Rahmen von Untersuchungen über die Inflammation bei Pneumokokken-Pneumonien beim Menschen wurde das CRP im Jahre 1930 zum ersten Mal beschrieben.¹ Es erhielt seinen Namen aufgrund der Eigenschaft, an das C-Polysaccharid von Pneumokokken zu binden. Trotzdem blieb lange unklar, welche Aufgaben dem CRP im menschlichen Körper zukommen. Erst in den letzten Jahren konnten die Struktur und Funktionen des CRP zum Teil geklärt werden.

Das C-reaktive Protein wird fast ausschließlich von der Leber gebildet. Die Synthese wird vorwiegend durch IL-1 β und IL-6 stimuliert, wobei IL-1 β einen vierfachen, IL-6 einen zehnfachen Anstieg des CRP in der Zellkultur bewirkt.

Zusammen addieren sich die Wirkungen der Interleukine. Die Funktionen des CRP bestehen überwiegend in der unspezifischen Abwehr. Über Komplementaktivierung, die Verstärkung der Chemotaxis und Phagozytose von Makrophagen und Neutrophilen und die Fähigkeit zur Opsonierung wird die Körperabwehr gesteigert. Ebenso verstärkt CRP die Aktivität von natürlichen Killer-Zellen. Zusätzlich bindet CRP Ca^{++} -abhängig an Phosphocholin, Phospholipide, Phosphatidylcholin, Chromatin, Histone, sn-Ribonukleoprotein, Fibronectin, Laminin und C1q.^{2,3}

Für die klinische Bedeutung des CRP sind neben den oben genannten noch drei weitere Faktoren verantwortlich. Der Serum-CRP-Spiegel reagiert sehr schnell auf eine Stimulation und lässt sich dabei relativ leicht bestimmen. Des Weiteren hat der Serum-CRP-Wert eine sehr große Spannweite von $\leq 1,0$ mg/l bis über 1000 mg/l. Diese Faktoren haben dazu geführt, dass das CRP zu einem wichtigen Marker bei der systemischen Inflammation geworden ist.

Es hat sich gezeigt, dass der CRP-Spiegel bei Dialysepatienten und Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz ungefähr beim Zehnfachen des Normalwertes liegt. In dieser Population stehen die Höhe des CRP-Spiegels und das kardiovaskuläre Risiko sowie die Mortalität in direktem Zusammenhang.⁴ Weitere Studien haben gezeigt, dass dies nicht nur für kranke, sondern auch für gesunde Personen gilt. Die Baseline-CRP-Spiegel bei Gesunden korrelieren direkt mit dem zukünftigen Risiko für die Entwicklung einer peripheren arteriellen Verschlusskrankheit (pAVK)⁵, eines Herzinfarktes und eines Schlaganfalls.^{6,7}

1.1.3 Biochemie und Struktur des CRP

Dem gesteigerten klinischen Interesse am CRP folgend wurden in den letzten Jahren zunehmend Untersuchungen über die Proteinstruktur und die biochemischen Eigenschaften von CRP durchgeführt. Seit längerem ist bekannt, dass das CRP und das mit ihm sehr ähnliche Serum-Amyloid A und Serum-Amyloid P (bei der Maus)⁸ zu den Akut-Phase-Proteinen gehören. Molekularbiologisch gesehen, handelt es sich bei allen drei Proteinen um

Vertreter der Pentraxin-Familie, die sich durch eine pentamerische Anordnung von identischen Untereinheiten auszeichnet. Beim CRP besteht jede dieser Untereinheiten aus 206 Aminosäuren bei einem Gewicht von ca. 23kD. Die fünf Monomere sind zyklisch angeordnet und über nicht kovalente Bindungen verknüpft.⁹ Wenn CRP denaturierenden Bedingungen in Gegenwart eines Chelators ausgesetzt wird, dissoziiert das Pentamer irreversibel in diese stabilen Untereinheiten. Untersuchungen haben gezeigt, dass diesen, auch monomeres CRP oder mCRP genannt, eigene biochemische Funktionen zukommen. Zur besseren Unterscheidung spricht man daher beim Pentamer auch von nativem CRP (nCRP). Das ist auch die Form, in welcher das CRP im Serum vorkommt. Das mCRP konnte bislang nur im Gewebe nachgewiesen werden. Dabei fanden sich mCRP-Ablagerungen in Intima und Lamina elastica normaler Gefäße ohne Nachweis von nCRP.¹⁰ Beim Nieren-Ca war die mCRP-Reaktivität der Gefäße verschwunden, und nCRP wurde in schwacher Ausprägung in der Media intrarenaler Gefäße nachgewiesen (persönliche Mitteilung L. Potempa). Ob mCRP in situ gebildet wird oder aus dem Serum ins Gewebe gelangt, ist bisher unklar.

Die Tatsache, dass es sich beim CRP um ein sehr altes und konserviertes Protein handelt, legt die Vermutung nahe, dass ihm evtl. wichtige Aufgaben im Körper zukommen. Erst 1995 konnte Fc γ RI (CD64) auf Monozyten als ein Rezeptor nachgewiesen werden, an den CRP mit niedriger Affinität bindet.¹¹ 1999 wurde auf den gleichen Zellen Fc γ RIIa (CD32) als Hauptrezeptor für CRP identifiziert.¹² Schließlich wurde im Jahr 2000 ein reiner Rezeptor für CRP (CRP-R) auf Monozyten nachgewiesen.¹³ Welche Folgen eine Interaktion zwischen CRP und seinen Rezeptoren hat, ist noch nicht geklärt. Die Bindung von CRP an Fc γ RI und Fc γ RIIa bewirkt wahrscheinlich über eine Abnahme von L-Selectin an der Zelloberfläche eine verminderte Adhäsion von Monozyten an Endothelzellen.¹⁴ Beim Kontakt von CRP und CRP-R wird der CRP/CRP-R-Komplex endosomal aufgenommen, CRP vom Rezeptor getrennt und abgebaut.¹⁵ Dies scheint eine Zunahme der chemotaktischen Aktivität von Monozyten zu bewirken.¹³ Durch den gleichen Mechanismus soll auch die Bildung von Gewebefaktor (tissue factor) in Monozyten gesteigert werden.¹⁶

1.2 Rolle des CRP bei der Atherosklerose

Die Atherosklerose ist eine der häufigsten Erkrankungen der Arterien. Sie ist gekennzeichnet durch in Stadien verlaufende zunehmende Veränderungen der Gefäße, die zu Elastizitätsverlust, Verdickung und Lumeneinengung führen können. Erstes Stadium einer atherosklerotischen Veränderung ist die sog. endotheliale Dysfunktion. Diese wird durch zahlreiche Faktoren, wie z.B. einen erhöhten LDL- (low density lipoprotein), Cholesterin- oder Homocysteinspiegel, freie Radikale infolge Nikotinabusus, Hypertonus, Diabetes mellitus, genetische Disposition oder auch Infektionen begünstigt. Es kommt dabei besonders im Bereich des Endothels zu einer Zunahme der Permeabilität, zu einer Steigerung des Adhäsionsverhaltens des Endothels und zu einer vermehrten Adhäsion und Migration von Leukozyten. Mediatoren bei diesen Stoffwechselveränderungen sind NO, Prostazyklin, PDGF (platelet-derived growth factor), Selektine, oxLDL (oxidiertes LDL), MCP-1 (monocyte chemotactic protein 1), IL-8 und MCSF (macrophage colony-stimulating factor). Beim zweiten Stadium, der frühen Läsion, spricht man auch vom Stadium der „fatty streaks“ (Fettstreifen). Das Lumen der Arterie wird durch die Einwanderung von Schaumzellen (vermittelt durch oxLDL, MCSF, TNF- α , IL-1) weiter eingeengt. Diese kommen zusammen mit aktivierten T-Zellen vor. Im weiteren Verlauf kommt es in diesem Stadium auch zur Einwanderung von glatten Muskelzellen und zur Ansammlung und Aggregation von Blutplättchen. Die komplizierte Läsion („advanced, complicated lesion“) stellt das dritte Stadium der Atherosklerosepathogenese dar. Durch das Fortschreiten der Veränderungen aus Stadium 2 bildet sich mit der Zeit eine fibröse Plaque, die die Endothelläsion vom übrigen Lumen trennt. Im Zentrum der Plaque findet sich oft ein nekrotischer Kern, der aus Leukozyten, Fett und Zellbestandteilen besteht. Durch die bisher beschriebenen Faktoren vergrößert sich die Plaque ständig, wird mit der Zeit dünner, es kommt zu Einblutungen von kleinen Plaquegefäßen, und führt schließlich zum vierten Stadium, der sog. Plaque-Ruptur. Durch die gelösten Plaques kann es dann zur Thrombose im Versorgungsgebiet der betroffenen Arterie kommen.

Der Grund für das gesteigerte Interesse am Zusammenhang von CRP und der Pathogenese der Atherosklerose scheint die Tatsache zu sein, dass die Atherosklerose zunehmend als eine entzündliche Erkrankung angesehen wird.¹⁷ So konnten Torzewski et al. 1998 nachweisen, dass bei frühen atherosklerotischen Veränderungen CRP zusammen mit dem terminalen Komplementkomplex (C₅₋₉) in der Intima vorkommt.¹⁸ Von Zwaka et al. wurde gezeigt, dass CRP als Mediator bei der Aufnahme von nativem LDL durch Makrophagen fungiert. Dies stellt einen weiteren Schritt bei der Schaumzellbildung dar.¹⁹ Ebenso wurde nachgewiesen, dass CRP eine Rolle bei der Steigerung des Adhäsionsverhaltens einnimmt. Dies geschieht über eine Induktion der Bildung von ICAM-1, VCAM-1 und E-Selektin in menschlichen Endothelzellen.²⁰ Außerdem bewirken sowohl CRP als auch sein Rezeptor (CRP-R) eine Rekrutierung von Monozyten aus dem Blut.^{13,21}

1.3 Die diabetische Nephropathie

Die diabetische Nephropathie ist eine Nierenfunktionsstörung und diabetische Spätkomplikation, die durch eine Abnahme der glomerulären Filtrationsrate zum terminalen Nierenversagen führen kann.²² Über zunehmende Proteinurie und Hypertonie kommt es zu einer progredienten Niereninsuffizienz. 30-50% aller Typ-1 Diabetiker entwickeln im Laufe ihrer Erkrankung eine diabetische Nephropathie. Damit stellt der Diabetes die Hauptursache einer terminalen Niereninsuffizienz dar. Nach Mogensen erfolgt die Stadieneinteilung der diabetischen Nephropathie in die Stadien I bis V. Erste klinische Symptome im Sinne einer Mikroalbuminurie treten im Stadium III auf. Die Glomerula haben bis zu diesem Zeitpunkt schon eine Vergrößerung erfahren. Im Zuge des Diabetes kommt es zu Veränderungen des Mesangiums (Glomerulosklerose Kimmelstiel-Wilson). Diese Veränderungen können diffuser, diffuser und nodulärer oder vorwiegend nodulärer Natur sein. Es kommt zu einer Proliferation von Mesangiumzellen und zu einer Verdickung der Basalmembran. Die vermehrte Rückresorption von Glukose führt zu einer Vergrößerung des Epithels in den Tubuli. Durch fibrotische Veränderungen ist das Interstitium erweitert. Zum

Stadium V kommt es nach ca. 15-25 Jahren Diabetesdauer. Es ist gekennzeichnet durch eine terminale Niereninsuffizienz und eine Hypertonie in 90% der Fälle.²³ In diesem Stadium lassen sich immunhistochemisch in Kapillaren und/oder im Mesangium Immunglobuline (IgA, IgG, IgM) und Komplementkomponenten (C₃) nachweisen. Anreicherungen von IgG, Albumin und C₃ in der tubulären Basalmembran scheinen typisch für die diabetische Nephropathie zu sein.²⁴

Obwohl schon viel über die histologischen Veränderungen bei der diabetischen Nephropathie bekannt ist, ist immer noch nicht ganz geklärt, wie die pathologischen Prozesse genau ablaufen. Es scheint durch ein Zusammenspiel von metabolischen und hämodynamischen Faktoren zu den oben genannten Veränderungen zu kommen.

Auf der einen Seite kann die chronische Hyperglykämie der Diabetiker zur Erklärung herangezogen werden. Diese führt zu einer Aktivitätssteigerung des Aldosereduktasestoffwechsels und der Proteinkinase-C-Isoformen in der Gefäßwand und zu vermehrter Bildung von nichtenzymatisch glycosylierten Endprodukten (AGEs, Advanced glycation end-products). AGEs wiederum lagern sich besonders bei Niereninsuffizienten in der Niere ab und bewirken dort eine Aktivierung von Signalübertragungswegen, die zu einer gesteigerten Ablagerung von extrazellulärer Matrix führt. Das Lumen der Kapillaren wird enger, bis sie schließlich verstopfen und es zur Niereninsuffizienz kommt. AGEs und Glucose stimulieren außerdem die Bildung von TGF- β . Dies führt über eine Störung der Interaktion von hämodynamischen und Stoffwechselfaktoren zu einer weiteren Schädigung des Nierengewebes.

Auf der anderen Seite scheint der Hypertonus der Diabetiker direkt für die Entwicklung der Glomerulosklerose verantwortlich zu sein. Der erhöhte Druck in den Gefäßen setzt sich in die Glomerula fort. Es kommt zu einer Vermehrung der extrazellulären Matrix und der Anzahl mesangialer Zellen und zu einer Basalmembranverdickung. Außerdem scheint auch eine große Anzahl von genetischen Faktoren die Entwicklung und den Verlauf einer diabetischen Nephropathie zu beeinflussen.

1.4 Zielsetzungen

1.4.1 CRP-Nachweis in der Zellkultur

Die vorliegende Arbeit sollte zeigen, welche Faktoren eine CRP-Expression und -Produktion induzieren bzw. steigern, um daraus Rückschlüsse auf die Entstehung von Atherosklerose und der diabetischen Nephropathie in vivo ziehen zu können. Zu diesem Zweck sollten verschiedene Zelllinien mit unterschiedlichen Substanzen, die evtl. zur Atheromentstehung beitragen können, stimuliert werden. Monozyten wurden wegen ihrer unter Punkt 1.2 beschriebenen Rolle bei der Entstehung der Atherosklerose ausgewählt. Hepatozyten wurden als zweite Zelllinie hinzugezogen, da sie die Hauptproduzenten des zirkulierenden CRP sind. Es wurden Zelllinien gewählt, für die bereits ein Stimulationsprotokoll beschrieben worden war.²⁵ Die Versuche waren so konzipiert, dass zunächst versucht wurde, CRP auf molekularer Ebene nachzuweisen. Danach war das Ziel, CRP auch auf Proteinebene mittels Westernblot nachzuweisen. Da es im Verlauf der Arbeit aber nicht gelang, eine verwertbare Menge an CRP im Westernblot nachzuweisen, konzentrierten sich die Versuche im weiteren Verlauf auf den immunhistochemischen Nachweis von CRP in humanen Gewebeschnitten.

1.4.2 CRP-Nachweis in der diabetischen Nephropathie

Für die Untersuchungen waren zwei Fragestellungen leitend: Zum einen sollte beschrieben werden, wo CRP in der Niere lokalisiert ist, zum anderen sollte geklärt werden, inwieweit CRP als Marker für die diabetische Nephropathie Anwendung finden könnte.

Für den immunhistochemischen Nachweis des CRP wurden Nierenbiopsien verwendet, deren pathologische Begutachtung eine diabetische Nephropathie ergeben hatte. Mit einem kommerziell erhältlichen Antikörper sollte der Nachweis von CRP im Nierengewebe erbracht werden.

1.4.3 Charakterisierung des CRP-Antikörpers

Die Existenz von zwei verschiedenen CRP-Konformationen ist inzwischen gesichert. Ebenso hat sich gezeigt, dass monomere Form und pentamere Form unterschiedliche Funktionen haben. Um eine Aussage darüber treffen zu können, welches CRP der kommerziell erhältliche clone 8 anfärbt, wurde eine Charakterisierung des Antikörpers mittels ELISAs durchgeführt.

2. Material und Methoden

2.1 Chemikalien und Biochemikalien

Alle Chemikalien und Biochemikalien (bovines Serumalbumin (BSA), Lipopolysaccharid (LPS)) stammten von Boehringer, Merck und Sigma (Mannheim, Darmstadt und Taufkirchen, BRD) sowie von J.T.Baker (Phillipsburg, NJ, U.S.A.), falls nicht anders vermerkt. Zellkulturmedien (minimal essential medium (MEM) und RPMI 1640), Zusätze (L-Glutamin, Penicillin-Streptomycin (Pen-Strep), essentielle Aminosäuren, fetales Kälberserum (FCS)) und Stimulantien (Dexamethason, Interleukine) wurden bei Invitrogen Life Technologies (Carlsbad, CA, U.S.A.), PAA Laboratories GmbH (Linz, Österreich), Greiner Labortechnik (Nürtingen, BRD) und Boehringer (Frickenhausen bzw. Mannheim, BRD) erworben.

2.2 Materialien

Die in der Zellkultur verwendeten Kulturflaschen stammten von Greiner und Sarstedt (Nümbrecht, BRD). 6-, 12- und 24-wells lieferte Nalge Nunc International (Rochester, NY, U.S.A.). Pipetten und Falcons wurden von Eppendorf (Hamburg, BRD) bezogen.

2.3 Zellkultur

2.3.1 Humane Hepatozyten und CRP-Stimulation

Die humane Hepatozyten-Zelllinie Hep3B wurde von der DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig, BRD) bezogen, die Zelllinie PLC/PRF/5 von ATCC (American Type Culture Collection, Manassas, VA, U.S.A.). Die Kultivierung erfolgte in Earle's MEM mit 10% FCS, 1% L-Glutamin, 1% essentielle Aminosäuren und 1% Pen-Strep in einem Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂. Die Zellen wurden jeden dritten Tag 1:3 bis

1:5 mittels Trypsin gesplittet. Die Experimente wurden mit Zellen der Passagen 10 bis 20 durchgeführt.

Stimuliert wurden die Zellen jeweils bei einer Konfluenz von 70-90% und nach einer Hungerphase von einem bis drei Tagen in 1%-igem FCS-Medium.

Die Stimulation erfolgte mit konditioniertem Medium von Monozyten (siehe unten). In einer weiteren Versuchsreihe erfolgte die Stimulation mit 2500U/ml Interleukin-6 (IL6), 200U/ml Interleukin-1 β (IL1 β) und 10⁻⁸M Dexamethason für jeweils ein, zwei oder drei Tage.

2.3.2 Humane Monozyten und Herstellung konditionierter Medien

Die humane Monozyten-Zelllinie U937 wurde bei der DSMZ erworben. Die Kultivierung erfolgte in RPMI 1640-Medium mit 10% FCS, 1% L-Glutamin und 1% Pen-Strep im Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂. Die in Suspension befindlichen Zellen wurden alle 2-3 Tage 1:2 bis 1:5 mit frischem Medium verdünnt. Für die Experimente wurden die Zellen zentrifugiert (1000U/min, 5min), in frischem Medium aufgenommen, so dass eine Zellsuspension von 1-5x10⁵/ml entstand, und nachfolgend mit LPS inkubiert (100 μ g/ml, bis zu 24h). Die Zellysate wurden für PCR und Westernblot weiterverarbeitet.

Zur Herstellung konditionierter Medien für die Hep3B wurden Zellen mit 10ng/ml LPS über 1-3 Tage stimuliert. Für die Folgeversuche wurden die Überstände der Monozyten in einer 1:3 Verdünnung mit frischem 1%-igem MEM-Medium versetzt und Hep3B mit diesem Medium zwischen 24 und 72h inkubiert.

2.3.4 Molekulare Analysen (PCR)

Die für die PCR benötigten Substanzen waren wie folgt erhältlich: 1st strand cDNA Synthesis Kit, PCR Nucleotide Mix, PCR Reaction buffer und Taq Polymerase bei Boehringer; Oligonucleotide bei Carl Roth GmbH (Karlsruhe, BRD); DNA Ladder 100 bp bei Invitrogen Life Technologies; Verdünnungspuffer für thermostabile DNA-Polymerasen bei PEQLAB Biotechnologie GmbH

(Erlangen, BRD); MgCl₂, Taq Polymerase und thermophiler DNA Polymerase Puffer (10x) bei Promega (Madison, WI, U.S.A.).

CRP-mRNA wurde in Monozyten und Hep3B-Zellen mittels semi-quantitativer reverser Transkription-Polymerase Ketten-Reaktion (RT-PCR) untersucht.

Zunächst wurde die gesamte RNA in trypsinieren und abzentrifugierten (Hep3B) oder nur abzentrifugierten (U937) Zellen mittels Phenol-Chloroform extrahiert. Die extrahierte RNA wurde in DEPC Wasser aufgenommen und die RNA-Konzentration bzw. Reinheit der Probe mittels Extinktionsmessungen bei 260nm und 280nm ermittelt. Unter Berücksichtigung der Gleichung $1 \text{ OD}_{260} = 40\mu\text{g/ml RNA}$ konnte der RNA-Gehalt berechnet werden.

Ein Mikrogramm RNA pro Probe wurde für die reverse Transkription unter Zuhilfenahme des 1st strand cDNA Synthesis Kits weiterverarbeitet. Für jede Probe erfolgte eine Kontrolle ohne reverse Transkriptase (RT) zur Bestimmung der genomischen DNA in späteren PCR-Versuchen. Oligo dTs dienten dazu, die RT zu primen. Das Reaktionsgemisch wurde für 10min bei 25°C, für 60min bei 42°C und für weitere 5min bei 99°C inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Proben 1:5 (für die CRP-PCR) bzw. 1:20 (für die GAPDH-PCR) mit DEPC-Wasser verdünnt und bis zur Weiterverarbeitung bei -20°C aufbewahrt.

Glyceraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase-(GAPDH)-Primer für das „house keeping gene“ wurden der Literatur²⁶ entnommen und erbrachten ein 598-Basenpaarprodukt. Sense und antisense Primer für CRP, designed auf der Basis der publizierten cDNA-Sequenz für humanes CRP (NIH-Genbank), erbrachten ein 482-Basenpaarprodukt. Die Sense-Primer-Sequenz war 5'-AAG CCT TCA CTG TGT GCC TC-3' (BP 235-254) und die Antisense-Primer Sequenz 5'-ACT TCA GTG CCC GCC AGT TC-3' (BP 698-717). Das PCR-Reaktionsvolumen von 50µl enthielt: 2µl verdünnte cDNA, 1x PCR-Reaktionspuffer, 1,5mM MgCl₂, 0,2mM Deoxynucleotide Mix, 0,25µM Primer 1 und 2, 1,25 Units Taq Polymerase und DEPC Wasser. Das PCR-Gerät wurde folgendermaßen programmiert: initiale Inkubation: 94°C für 3min, gefolgt von 29 (GAPDH) bzw. 32 (CRP) Zyklen mit folgenden sequentiellen Schritten: 94°C für 1min, 60°C für 45min und 72°C für 7min, sowie zum Schluss 72°C für 7min.

Die PCR-Produkte wurden mittels Gelelektrophorese aufgetrennt, gefolgt von einer Ethidiumbromidfärbung, und unter dem UV-Licht analysiert. Für beide Zelltypen wurde pro PCR-Produkt jeweils eine einzige Bande der erwarteten Größe gefunden. Für das CRP-Genprodukt wurde eine Restriktionsenzymanalyse mit SSPI durchgeführt, um zu beweisen, dass das PCR-Produkt eine spezifische Amplifikation der CRP cDNA darstellt. Der Verdau mit SSPI erbrachte zwei Spaltprodukte (329 bp und 153 bp), bei 482 bp war keine Bande mehr erkennbar (Abb. 1).

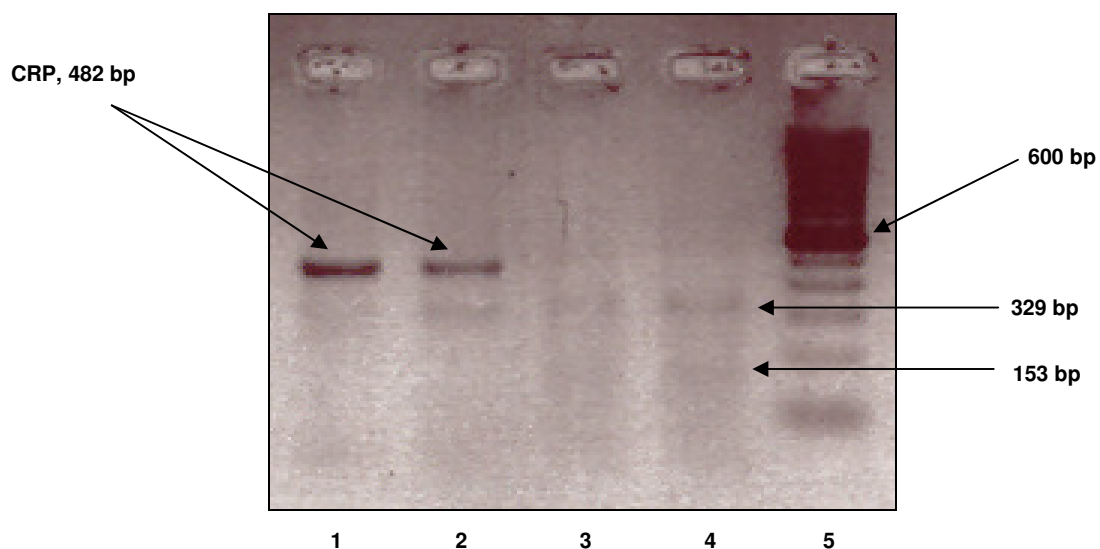


Abb. 1 Restriktionsenzymanalyse. Banden 1 und 2: CRP; Banden 3 und 4: CRP-Verdau; Bande 5: Standard.

2.3.5 Westernblot und Immunpräzipitation

Beim Standard-Westernblot-Verfahren wurden die Hepatozyten nach Stimulation (Interleukine und Dexamethason) zentrifugiert (1000Umin^{-1} , 5min). Es folgte eine Analyse der Zellen und Überstände. Das Zell-Pellet wurde in $25 \mu\text{l}$ Westernblot-Auftragspuffer (Laemmli nach Santa Cruz), die Überstände in einem Verhältnis von 1:1 in Auftragspuffer aufgenommen. Als Positivkontrolle diente $0,1 \mu\text{g}$ CRP (Calbiochem) mit Auftragspuffer versetzt. Als Standard wurde Rainbow-Marker (Sigma) für Proteingrößen von 15 bis 70 kD verwendet.

Nach Denaturierung (95°C, 5min) erfolgte die Auftrennung in einem 13%igen SDS-Gel.

Der Blot wurde in Magermilch inkubiert (RT, 1h), um die unspezifischen Bindungsstellen zu blockieren.

Nach zweimaligem Waschen mit TTBS-Puffer (Tween 20 + TBS (tris buffered saline)) erfolgte die Inkubation des Blots in 20ml clone 8 (mouse anti-human CRP AK, 1:1000, RT, 1h, Sigma). Danach wurde der Blot erneut in TTBS gewaschen (5 x 5min), bevor er mit 20ml anti-mouse IgG-POD, Fab fragments (Boehringer) inkubiert wurde (1:5000, RT, 1h). Nach erneutem Waschen in TTBS erfolgte die Detektion mit dem ECL-Kit von Amersham Pharmacia Biotech (Piscataway, NJ, U.S.A.).

Um auch geringe Mengen an CRP nachweisen zu können, wurde dem Westernblot eine Immunpräzipitation vorangestellt.

Nach Zentrifugation der Zellen wurden die Überstände abgesaugt, das Pellet mit 1 ml PBS gewaschen und erneut zentrifugiert (1000Umin⁻¹, 5min). Der Überstand wurde entfernt, das Pellet in Lysispuffer (RIPA, 30µg/ml Aprotinin, 2mM Natrium-Orthovanadate; 1ml) aufgenommen und anschließend 30min auf Eis belassen. Alle nachfolgenden Schritte wurden bei 4°C durchgeführt.

Die Zellen wurden mittels einer 21G-Nadel zerstört und nach Zugabe von 10µl PMSF (Phenylmethylsulfonylfluorid) (10mg/ml) erneut inkubiert (30min). Nachfolgend wurde das Lysat mit 20µl Protein A/G plus Sepharose beads (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, U.S.A.) rotierend inkubiert (30min). Nach der Zentrifugation (2500Umin⁻¹, 5min) wurden die Überstände in gekühlte Eppendorfhütchen überführt. Zum Lysat wurden 2µg rabbit anti-human-CRP-AK (Calbiochem, Bad Soden, BRD) gegeben und das Lysat erneut rotierend inkubiert (1h). Es wurden wiederum 40µl Protein A/G plus Sepharose beads zugegeben und über Nacht inkubiert.

Am nächsten Tag wurde das Pellet zentrifugiert (5min, 2500Umin⁻¹) und mehrmals gewaschen, um dann in Auftragspuffer aufgenommen zu werden.

2.4 Humanes Nierengewebe

2.4.1 Charakterisierung des clone 8

Für die Charakterisierung des clone 8 Antikörpers wurden spezifische ELISAs durchgeführt. Um die Reaktivität von nCRP zu bestimmen, ist es wichtig zu wissen, dass eine direkte Adsorption von nCRP auf einer Plastikoberfläche zu einem Verlust der nCRP-Antigenität und zu einer Expression der mCRP-Antigenität führt. Um also die CRP-Antigenität bestimmen zu können, muss nCRP zunächst an einen Liganden gebunden werden, der dann adsorbiert wird. Im Rahmen dieser Arbeit wurde nCRP an KLH (Keyhole Limpet Hemocyanin) gebunden, welches Phosphocholin (PC-KLH) enthielt.²⁷

Für die mCRP-Messung wurden 100ng mCRP pro Schale direkt auf die ELISA-Platte adsorbiert. Nach dem Blockieren und Waschen wurden die Schalen mit unterschiedlichen Verdünnungen (von 1:2500 bis 1:160000; verdünnt mit 1% Albumin) des clone 8 Antikörpers inkubiert. Die gebundenen Antikörper wurden mit F(ab´2) anti-Maus IgG-Peroxidase Reagenz und ABTS-Substrat sichtbar gemacht und die Stärke der Reaktion mittels Absorption bei 405nm gemessen. Um eine Spezifität für nCRP nachzuweisen, wurden die ELISA-Platten zuerst mit 200ng PC-KLH pro Schale beschichtet. Nach dem Blockieren und Waschen wurden 100ng nCRP in 2mM CaCl₂-Lösung gebunden. Danach wurde wiederum mit clone 8 in unterschiedlichen Verdünnungen inkubiert. Alle Pufferlösungen zum Waschen und Inkubieren enthielten 2mM CaCl₂, um die Bindung von nCRP an PC-KLH zu gewährleisten. Die gebundenen Antikörper wurden mit dem gleichen anti-Maus IgG-Peroxidase Reagenz und ABTS-Substrat wie zuvor beschrieben sichtbar gemacht.

2.4.2 Patienten

Es wurden Nierenbiopsien von 25 Patienten herangezogen, die in den Jahren 1992 bis 2001 in der Nephrologischen Abteilung der Medizinischen Klinik der Universität Würzburg biopsiert wurden. Die histologische Aufarbeitung des

gewonnenen Materials hatte eine diabetische Nephropathie ergeben. Elf wurden als leichte, zehn als mittelgradige und vier als schwere diabetische Nephropathie eingestuft. Grundlage für die Beurteilung der Biopsien war folgende Einteilung: Als leichte diabetische Nephropathie (Grad I) wurden Nieren bezeichnet, bei denen die interstitielle Fibrose sowie die diffuse und noduläre Glomerulosklerose weniger als 30% betrug. Veränderungen von 30% bis 70% wurden als mittelgradige diabetische Nephropathie (Grad II), histologische Veränderungen von mehr als 70% als schwere diabetische Nephropathie (Grad III) bezeichnet.

Als Kontrolle diente das Biopsiematerial von 6 Patienten mit IgA-Nephritis und von 4 Patienten, deren Biopsie ohne pathologischen Befund blieb.

Der Grad der CRP-Expression wurde unabhängig von zwei Personen jeweils zweimal ohne Kenntnis der Biopsie beurteilt. Die Stärke des Signals wurde mit Zahlen von 0 bis 3 bewertet, wobei 0 keinem und 3 einem starken Signal entsprach.

2.4.3 Immunhistochemie

Alle Nierenpunktionszylinder waren in Paraffin fixiert. Zur Etablierung der Methode wurden Aortensegmente mit deutlicher Atherosklerose herangezogen, bei denen CRP mittels clone 8 in der Intima nachgewiesen werden konnte.¹³

Die CRP-Färbungen wurden mit dem Vectastain ABC Kit Elite (Mouse IgG; Vector Laboratories) durchgeführt. Bei der ABC-Methode reagiert der zweite biotinylierte Antikörper mit einem Avidin/Biotin Enzym Komplex, um die Sensitivität zu erhöhen. Beim Peroxidase-Substrat handelte es sich um DAB (Sigma).

Die Deparaffinisierung und Rehydrierung erfolgte in Xylol, gefolgt von einer Ethanolreihe absteigender Konzentrationen (100%, 95%, 70%; jeweils 3min). Anschließend kamen die Schnitte in Ampuwa (5min).

Im Anschluss wurden die Biopsien zur Blockade der unspezifischen Bindungen mit 10%igem Horse serum blockiert (30min, RT). Danach folgte die Inkubation mit dem ersten Antikörper, d.h. clone 8 (1:500 in 1% horse serum, 30min, RT).

Nach Waschen in PBS (5min) wurde das Protokoll mit der Inkubation mit dem zweiten Antikörper (30min, RT)) aus dem Vectastain-Kit fortgesetzt. Nach erneutem Waschen in PBS erfolgte die Zugabe des ABC-Reagenz (30min, RT). Einem weiteren Waschvorgang in PBS schloss sich das Färben mit DAB (10min, RT) und das Gegenfärben mit Hämalaun (10min, RT) an.

Nach einer aufsteigenden Alkoholreihe (70%, 95%, 100%; jeweils 2min) und einem Xylolbad (2min) wurden die Paraffinschnitte mit VectaMount Mounting-Medium (Vector Laboratories) haltbar gemacht.

3. Ergebnisse

3.1 Zellkultur

3.1.1 Nachweis von CRP-mRNA in Hepatozyten und Monozyten (PCR)

Im ersten Versuch konnte gezeigt werden, dass sowohl Monozyten als auch Hepatozyten CRP-mRNA produzieren. Die Messungen wurden bei unstimulierten und stimulierten Zellen durchgeführt, wobei in diesem Versuch neben konditioniertem Medium noch weitere Stimulationsbedingungen (AGEs, BSA) getestet wurden. Die Auswertungen der PCR haben gezeigt, dass die Zellen auch schon im unstimulierten Zustand CRP-mRNA produzierten. GAPDH als „house keeping gene“ war in allen Fällen nachweisbar.

Abb. 2 zeigt ein repräsentatives Gel für einen Versuch mit Hepatozyten. Bande 1 stellt den molekularen Standard mit dem Bereich 100 kD bis 1000 kD dar. Dabei ist die 600 kD-Bande als Referenz stärker zu sehen. In den Banden 2 bis 5 ist das GAPDH-Signal bei ca. 600 kD, in den Banden 6 bis 9 das CRP-Signal etwas unter 500 kD deutlich zu erkennen.

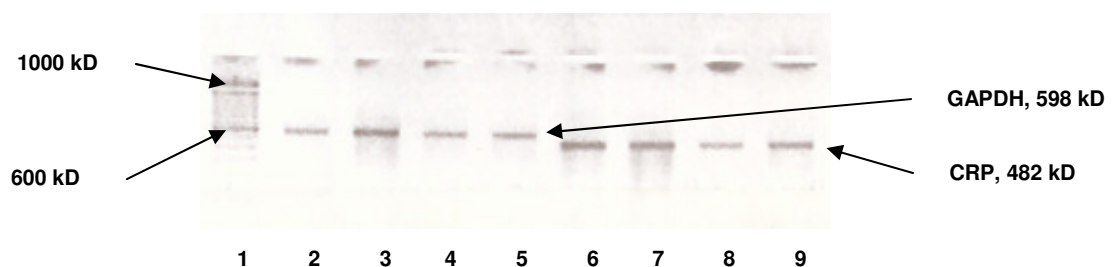


Abb. 2 PCR, Stimulation Hep 3B. GAPDH 26 Zyklen, CRP 32 Zyklen. Bande 1: Standard; Bande 2: GAPDH, Stimulation mit konditioniertem Medium; Bande 3: GAPDH, nur Medium; Bande 4: GAPDH, Stimulation mit AGE; Bande 5: GAPDH, Stimulation mit BSA; Bande 6: CRP, Stimulation mit konditioniertem Medium; Bande 7: CRP, nur Medium; Bande 8: CRP, Stimulation mit AGE; Bande 9: CRP, Stimulation mit BSA.

Wurden die Verhältnisse der Intensität der CRP-Bande zur GAPDH-Bande berechnet, war unter keiner Bedingung eine Zunahme des CRP-Signals festzustellen (Prozentzahlen nicht gezeigt).

Abb. 3 zeigt einen Stimulationsversuch mit Monozyten. Banden 1 und 10 stellen den molekularen Standard dar. Wie schon bei den Hepatozyten sind auch in diesem Versuch die spezifischen Banden gut zu erkennen, Banden 2 bis 5 für GAPDH bei ca. 600 kD, Banden 6 bis 9 für CRP bei etwas unter 500 kD.

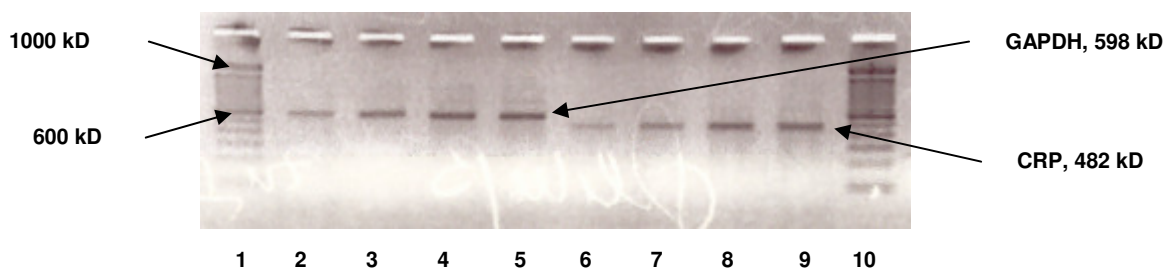


Abb. 3 PCR, Stimulation U 937. GAPDH 23 Zyklen, CRP 26 Zyklen. Banden 1 und 10: Standard; Bande 2: GAPDH, Stimulation mit AGE-BSA; Bande 3: GAPDH, Stimulation mit BSA; Bande 4: GAPDH, Stimulation mit LPS; Bande 5: GAPDH, nur Medium; Bande 6: CRP, Stimulation mit AGE-BSA; Bande 7: CRP, Stimulation mit BSA; Bande 8: CRP, Stimulation mit LPS; Bande 9: CRP, nur Medium.

Auch bei den Monozyten war die CRP-Expression (ermittelt erneut als Verhältnis von CRP-Bande zu GAPDH-Bande) unter allen Bedingungen gleich. Zur Klärung des zeitlichen Verlaufs der CRP-Expression wurden mit beiden Zelllinien Versuche mit unterschiedlicher Stimulationsdauer (4h – 36h) durchgeführt. Dabei zeigte sich, dass es bereits nach vier Stunden zu einer starken Expression gekommen war. Im weiteren Verlauf konnte keine eindeutige Zu- oder Abnahme festgestellt werden.

Abb. 4 zeigt einen Kinetikversuch mit LPS in Monozyten. Bande 1 stellt den Standard dar, die Banden 2 bis 7 zeigen die CRP-Expression ab einer Stimulationsdauer von vier Stunden in vierstündigem Abstand bis zu einer maximalen Stimulationsdauer von 36 Stunden. Die CRP-Banden liegen knapp unter 500 kD und sind deutlich zu erkennen.

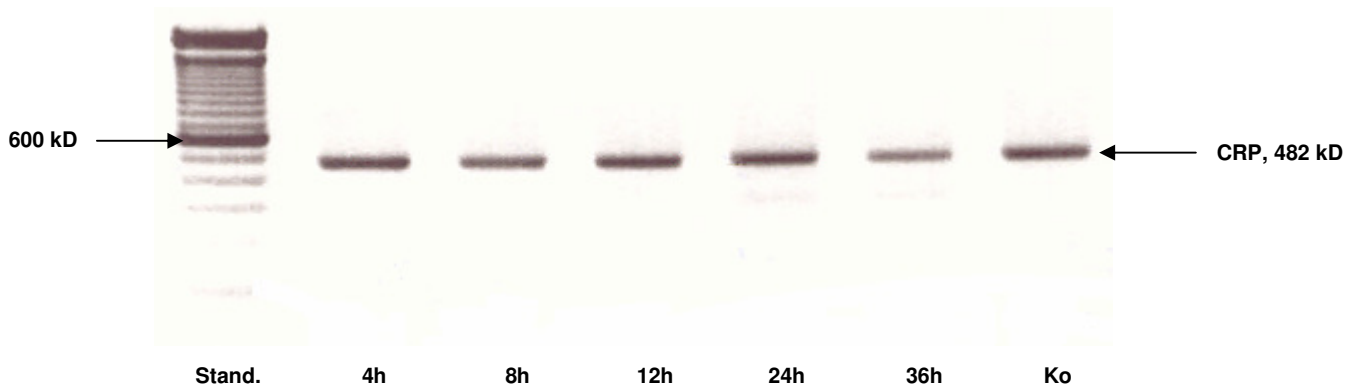


Abb. 4 PCR, Stimulation U 937. Kinetik CRP (Stand. = Standard; Ko = Kontrolle).

Auf Abb. 5 ist der gleiche Kinetikversuch zu sehen, in diesem Fall aber für GAPDH. Nach einer Stimulationsdauer von bis zu 36 Stunden waren wie zu erwarten alle Banden ungefähr gleich stark.

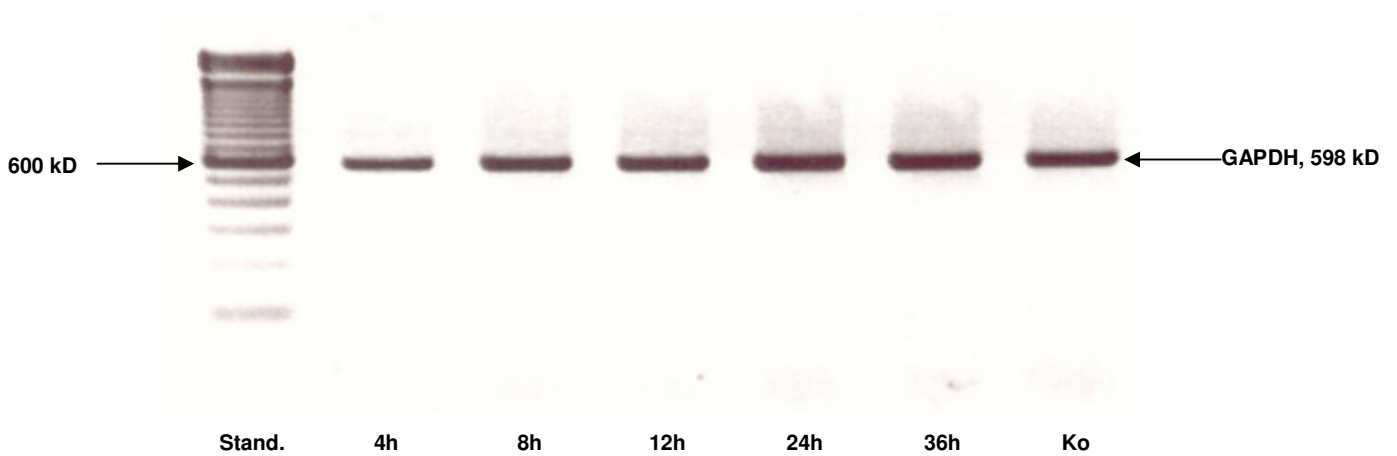


Abb. 5 PCR, Stimulation U 937. Kinetik GAPDH (Stand. = Standard; Ko = Kontrolle).

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass relevante Unterschiede in der CRP-Expression weder für unterschiedliche Stimulationsbedingungen noch für unterschiedliche Stimulationszeiten ausgemacht werden konnten. Nach diesem Abschnitt des Versuches wurde die Notwendigkeit deutlich, die Bildung

von CRP durch Hepatozyten und Monozyten auf Proteinebene näher zu untersuchen.

3.1.2 Nachweis von CRP-Protein in Hepatozyten (Westernblot und Immunpräzipitation)

Die Hepatozyten wurden in einer ersten Versuchsreihe mit konditioniertem Medium stimuliert (8, 12, 16, 20 und 24h). Im Pellet konnte kein CRP nachgewiesen werden, während die CRP-Kontrolle deutlich positiv war. Dadurch wurde gesichert, dass die Methode funktioniert hatte. Auch in zwei Wiederholungsversuchen zeigte sich allenfalls ein sehr schwaches CRP-Signal (Abb. 6).

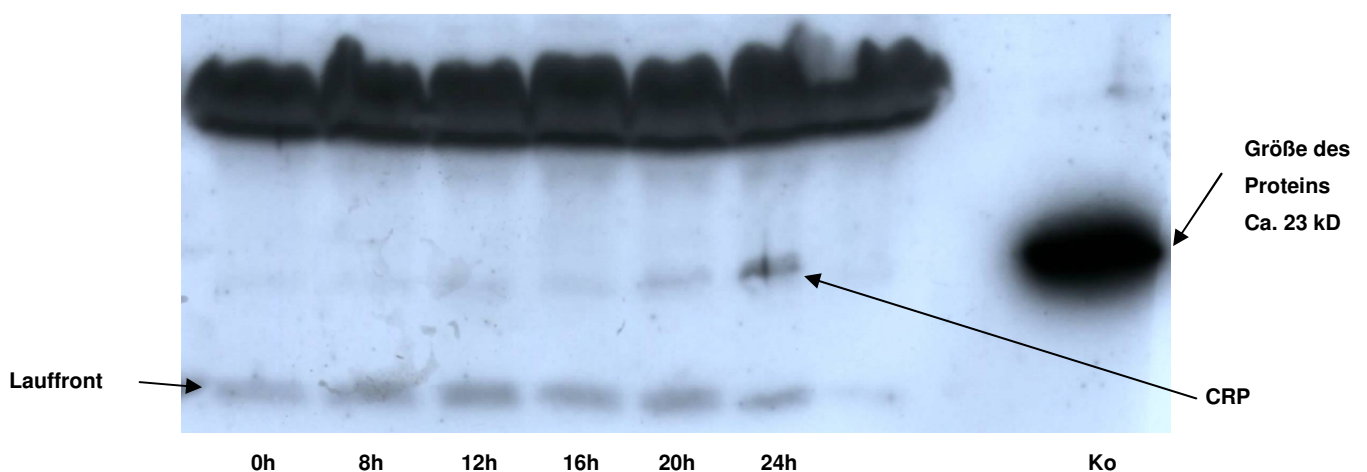


Abb. 6 Stimulation der Zelllinie Hep 3B mit konditioniertem Medium.

In einem neuen Primär-Ansatz wurden die Hepatozyten mit definierten Interleukinen stimuliert. Es wurden verschiedene Konditionen, wie z.B. 0 bis 72 Stunden in Hungermedium, 1% oder 10% FCS, 8 bis 72 Stunden Stimulation, ausprobiert. Hungermedium wurde gewählt, um eine maximale Stimulation zu provozieren und um evtl. inhibierende Substanzen im Serum auszuschließen. Bei den Banden 1 bis 4 der Abbildung 7 konnten die Zellen zwei Tage

konfluieren, danach wurden sie 24 Stunden (Bande 1), 48 Stunden (Bande 2), 72 Stunden (Bande 3) oder gar nicht (Bande 4) dem Hungermedium ausgesetzt, um danach alle für 72 Stunden mit IL-6 stimuliert zu werden. Die Zellen der Banden 5 bis 7 konnten drei Tage konfluieren und wurden danach analog Banden 1 bis 4 weiter behandelt. Die Stimulation mit IL-6 erfolgte hier jedoch nur 48 Stunden. Banden 8 und 9 stellen Positivkontrollen dar.

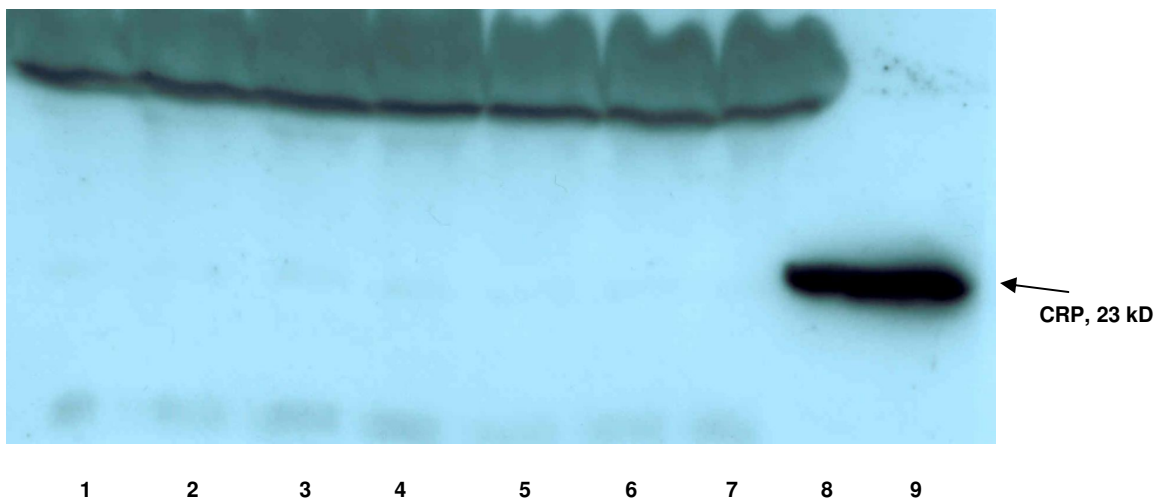


Abb. 7 Stimulation der Zelllinie Hep 3B mit Interleukinen.

Auch unter diesen vielen verschiedenen Bedingungen war kein oder nur ein sehr schwaches CRP-Signal zu erkennen.

Um die Sensitivität des Westernblots zu erhöhen, wurde eine Immunpräzipitation dem Westernblot vorangestellt. Dadurch konnte die Nachweisgrenze für CRP weiter gesenkt werden.

Die folgende Abbildung (Abb. 8) zeigt beispielhaft das Ergebnis eines Stimulationsversuches mit Interleukinen und Dexamethason (DM). Die Zellen wurden nach 24 Stunden im Hungermedium mit IL-6, IL-1 und DM für 48 Stunden (Bande 1) bzw. 72 Stunden stimuliert (Bande 2). Bei den Banden 3 und 4 erfolgte die Stimulation bei gleicher Zeitdauer nur mit DM. Die Banden 5 und 6 ergaben sich durch Stimulation der Zellen mit IL-6, IL-1 und DM für 48 bzw. 72 Stunden nach einer dreitägigen Hungerphase in einprozentigem

Medium. Banden 7 und 8 sind analog zu Banden 3 und 4 nur mit DM stimuliert worden. Bande 9 stellt die Positivkontrolle dar (extern zugegebenes präzipitiertes CRP).

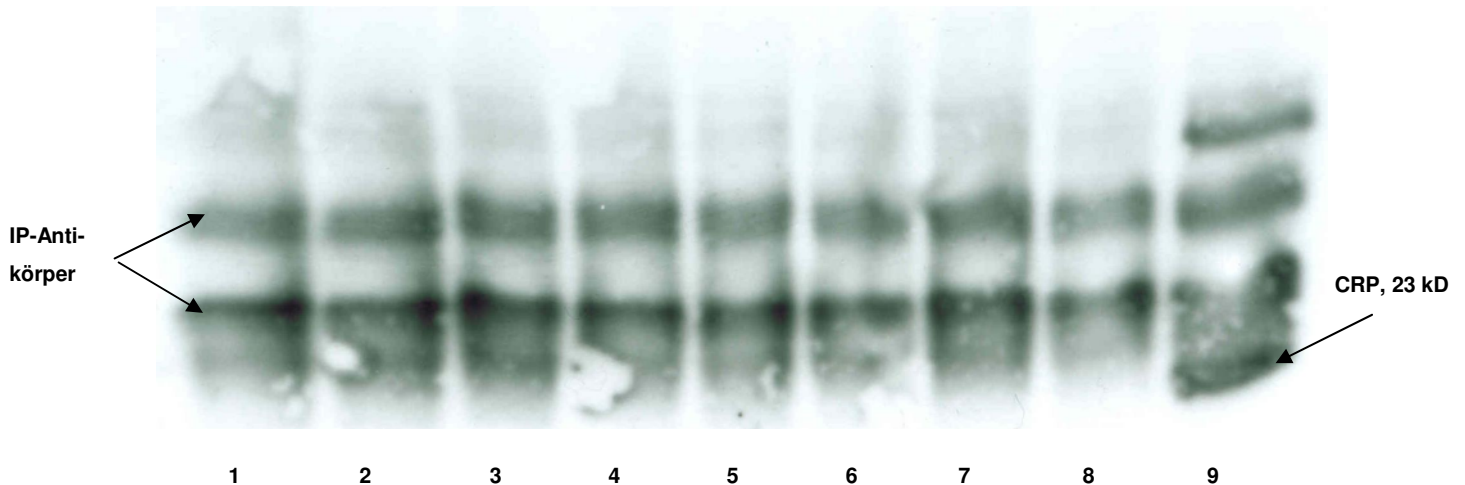


Abb. 8 Stimulation der Zelllinie Hep 3B mit Interleukinen.

Es ist zu erkennen, dass die Wiederholung der oben beschriebenen Versuchsreihe trotz Sensitivitätssteigerung durch die IP weiterhin keinen Nachweis erbrachte, dass die Hepatozyten CRP bilden.

Schließlich wurde von der Zelllinie Hep3B Abstand genommen und die Versuche an der Hepatozytenzelllinie PLC/PRF/5 wiederholt.^{28,29}

Abbildung 9 zeigt die Ergebnisse eines kombinierten Stimulationsversuches an PLC/PRF/5 mit IL-6 und IL-1 β . Die Zellen wurden bei einer Konfluenz von 80% für 24 Stunden mit Interleukin-6 und Interleukin-1 β (Bande 1), nur mit IL-6 (Bande 2) oder nur mit IL-1 β (Bande 3) stimuliert. Der Nachweis erfolgte mit Westernblot und Immunpräzipitation. Bande 4 stellt die Positivkontrolle mit IP dar. Dabei wurde eine definierte Menge CRP dem Medium zugesetzt und dann wie die anderen Proben nach Protokoll weiterverarbeitet. Bande 7 stellt die gleiche Menge CRP dar, die hier jedoch direkt im Gel aufgetragen wurde.

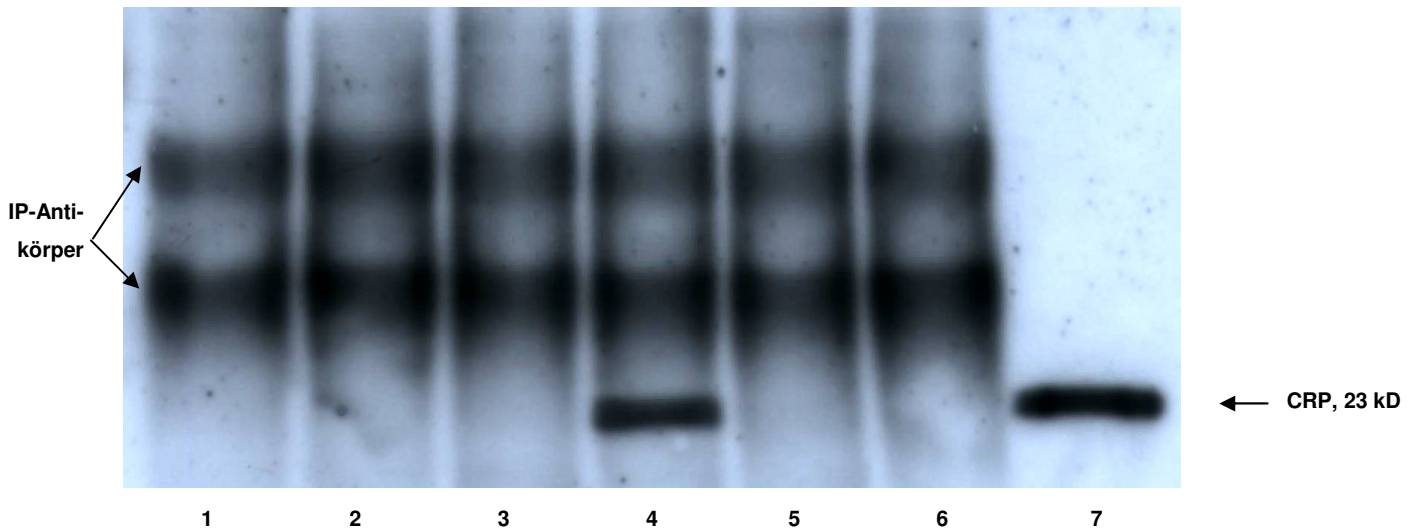


Abb. 9 Stimulation der CRP-Expression bei PLC/PRF/5.

An der nahezu identischen Stärke der beiden Banden ist zu erkennen, dass mit der IP ein sehr hoher Anteil des eingesetzten CRP-Gehalts nachgewiesen werden konnte. Trotzdem konnte auch bei diesen Zellen keine CRP-Produktion gezeigt werden.

Zusammenfassend kann man sagen, dass die PCR für den Nachweis von CRP etabliert wurde, aber keine eindeutige Zu- oder Abnahme zu beobachten war. Nachdem CRP auf Proteinebene reguliert werden kann, wurde versucht, den CRP-Nachweis mittels Westernblot zu etablieren, was auch gelang. Allerdings war der Nachweis trotz variierender Stimulationsbedingungen, Zelllinien und Nachweisverfahren sehr gering, so dass die Basis für weitere Experimente nicht gegeben erschien. Deshalb wurde beschlossen, ein anderes Verfahren zum Proteinnachweis sowie ein anderes Gewebe (Nierenschnitte) zu wählen.

3.2 Humane Nierenschnitte

3.2.1 Spezifität des clone 8

Die durchgeführten ELISAs ergaben, dass der clone 8 nur für mCRP hochspezifisch ist. Eine Reaktivität für nCRP konnte selbst bei Erhöhung der AK-Konzentration nicht gefunden werden (Abb. 10). Die Bindung von nCRP an PC-KLH wurde überprüft, indem spezifische monoklonale anti-nCRP Antikörper (1D6, 8D8) benutzt wurden.³⁰ Dieser Sachverhalt beeinflusst die Interpretation dieser und früherer Studien.

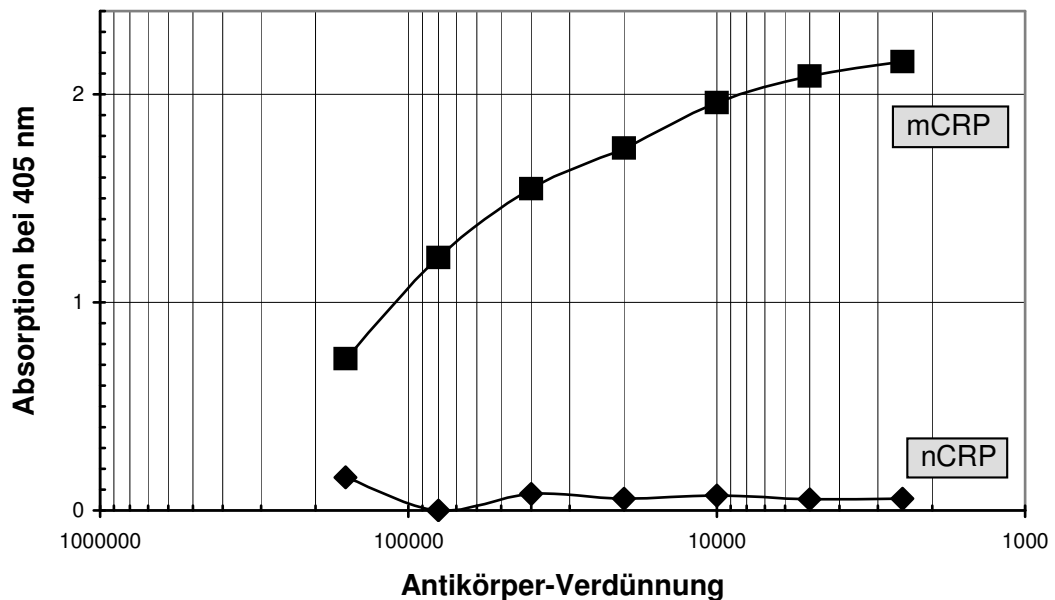


Abb. 10 Reaktivität des clone 8 mit mCRP und nCRP in Abhängigkeit von der Antikörperkonzentration.

3.2.2 Patientendaten

Das Durchschnittsalter der diabetischen Patienten zum Zeitpunkt der Biopsie betrug $59 (\pm 12)$ Jahre, der durchschnittliche Body-Mass-Index (BMI) lag bei $26,2 (\pm 5,2)$ kg/m^2 .

In der Gruppe mit leichter diabetischer Nephropathie betrug der durchschnittliche Serum-CRP-Wert 1,3 (\pm 2,0) mg/l, in der Gruppe mit mittelgradiger diabetischer Nephropathie 1,4 (\pm 1,0) mg/l und in der Gruppe mit schwerer diabetischer Nephropathie 4,5 (\pm 3,0) mg/l. Bei den Patienten mit IgA-Nephritis lag ein durchschnittlicher Serum-CRP-Wert von 3,9 (\pm 1,6) mg/l vor. Die gesunden Patienten wiesen im Mittel einen Serum-CRP-Wert von 0,3 (\pm 0,1) mg/l auf.

3.2.3 CRP-Färbung in gesunden Nieren, bei Patienten mit diabetischer Nephropathie sowie IgA-Nephritis

Für die immunhistochemischen Färbungen wurden Aortenschnitte mit atherosklerotischen Plaques als Positivkontrolle herangezogen.³¹ Nach obigem Protokoll (siehe 2.4.2) gelang es, CRP in der Intima der Aorten nachzuweisen. Das CRP-Signal war v.a. in den tieferen Bereichen der Intima zu erkennen und war von eher diffuser als fokaler Natur (Abb.11).

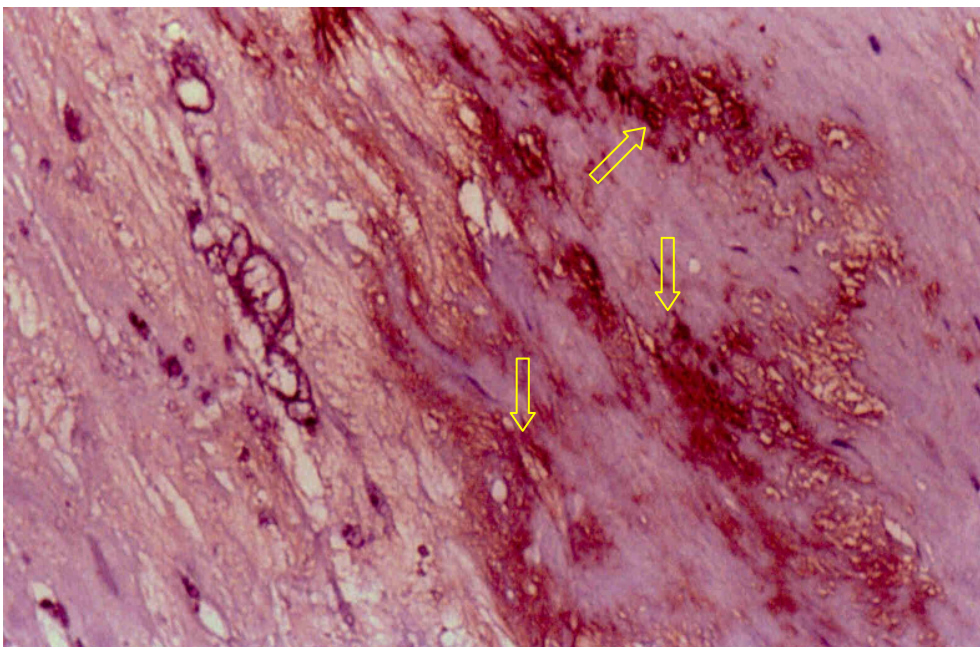


Abb. 11 Atherosklerotische Aorta (DAB, Hämalaun). Deutliches CRP-Signal (Blockpfeile).

Als Negativkontrollen dienten zum einen Versuche, bei denen der 1. Antikörper durch PBS ersetzt wurde. In diesem Fall konnte kein CRP nachgewiesen werden. Zum anderen wurden Blockierungs-Experimente durchgeführt, bei denen der 1. Antikörper vor seiner Verwendung 30 Minuten mit CRP (C-mCRP) inkubiert wurde. Dieser Versuch sollte die Spezifität des Antikörpers zeigen. Auch in diesem Fall konnte nach Blockierung kein CRP nachgewiesen werden (Abb. 12).

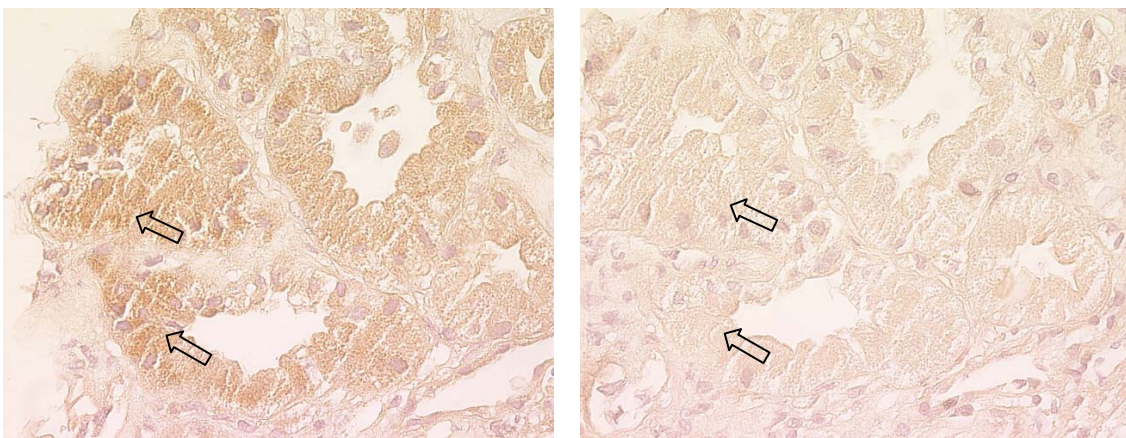


Abb. 12 Immunhistochemische Färbung nach Standard-Protokoll, links ohne, rechts mit Inkubation des 1. Antikörpers mit CRP (C-rmCRP, 10fache Menge bezogen auf IgG, 30 min). Deutliche Abnahme des CRP-Signals (Blockpfeile).

Im Biopsiematerial der gesunden Personen war ebenfalls kein CRP nachweisbar (Abb. 13). In den diabetischen Schnitten konnte in den Glomerula, im Interstitium und in den Gefäßen kein CRP nachgewiesen werden. Anders verhielt es sich in einem Teil der Tubuli der diabetischen Patienten. In der apikalen Membran und im Zytoplasma der Tubulus-Zellen war ein spezifisches CRP-Signal vorhanden. In der Gruppe mit leichter diabetischer Nephropathie war das Signal schwach, in der Gruppe mit starker diabetischer Nephropathie hingegen sehr deutlich. Das Befallsmuster der Tubuli reichte von fokal bis diffus. Es waren vorwiegend die distalen Tubuli betroffen (Abb. 14-16). In den Schnitten der Patienten mit IgA-Nephritis war kein oder nur ein sehr schwaches CRP-Signal zu erkennen (Abb. 17).

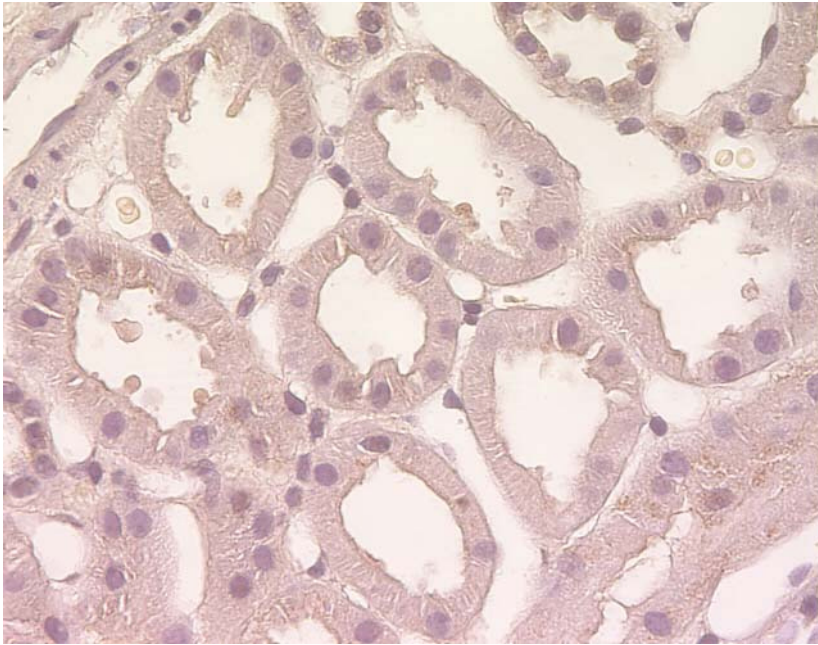


Abb. 13 Nierenbiopsie, Negativkontrolle (DAB, Hämalan).

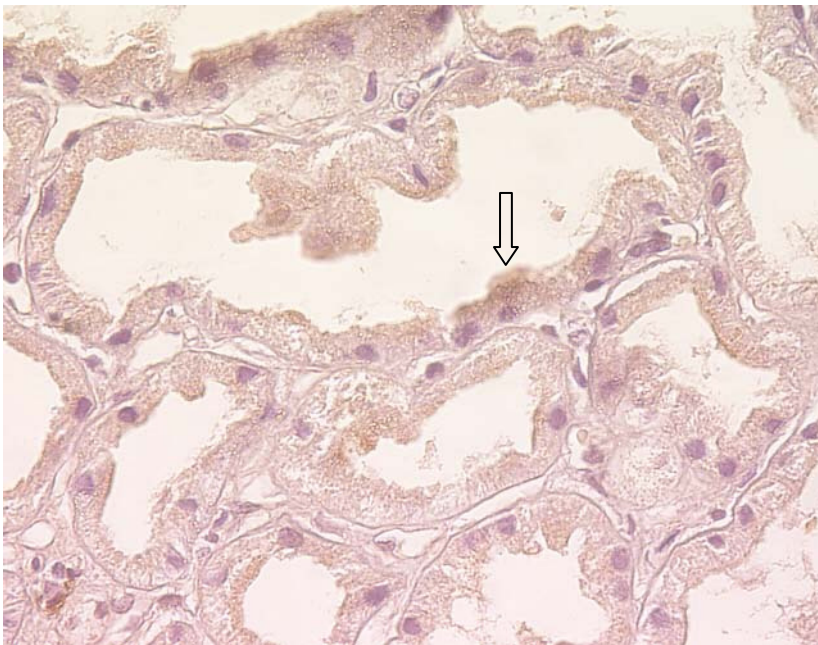


Abb. 14 Nierenbiopsie, leichte diabetische Nephropathie (DAB, Hämalan). Schwaches CRP-Signal (Blockpfeil).

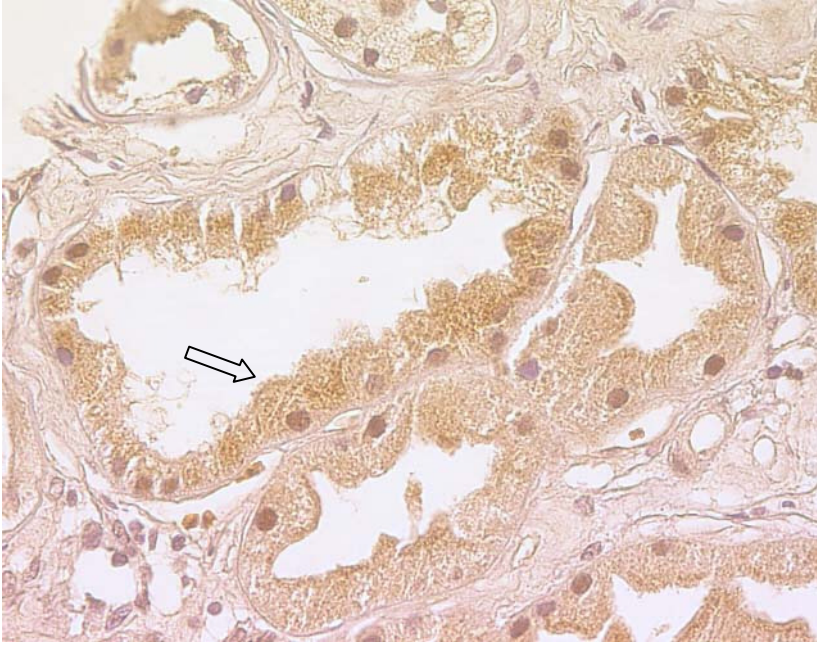


Abb. 15 Nierenbiopsie, mittelgradige diabetische Nephropathie (DAB, Hämalaun). Deutlicheres CRP-Signal (Blockpfeil).

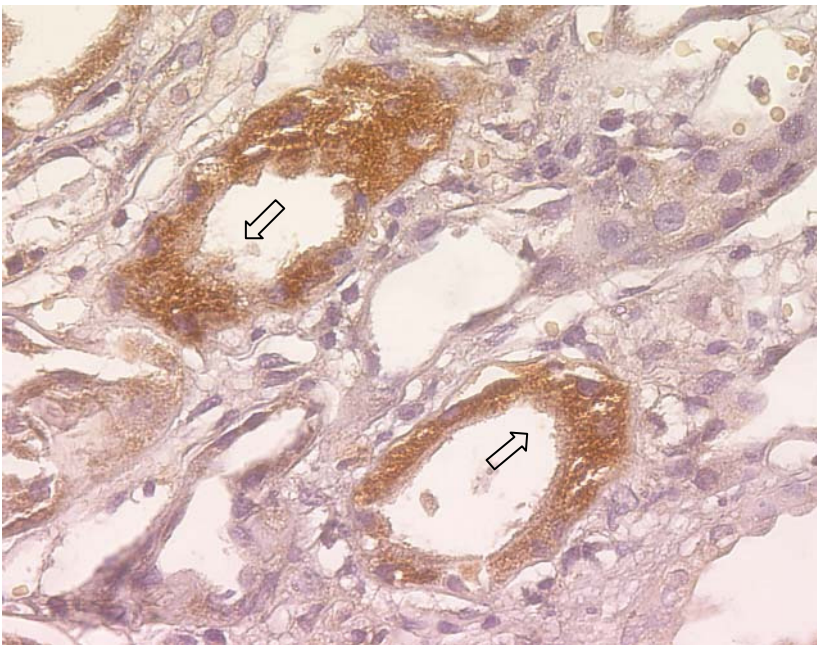


Abb. 16 Nierenbiopsie, schwere diabetische Nephropathie (DAB, Hämalaun). Starkes CRP-Signal (Blockpfeile).

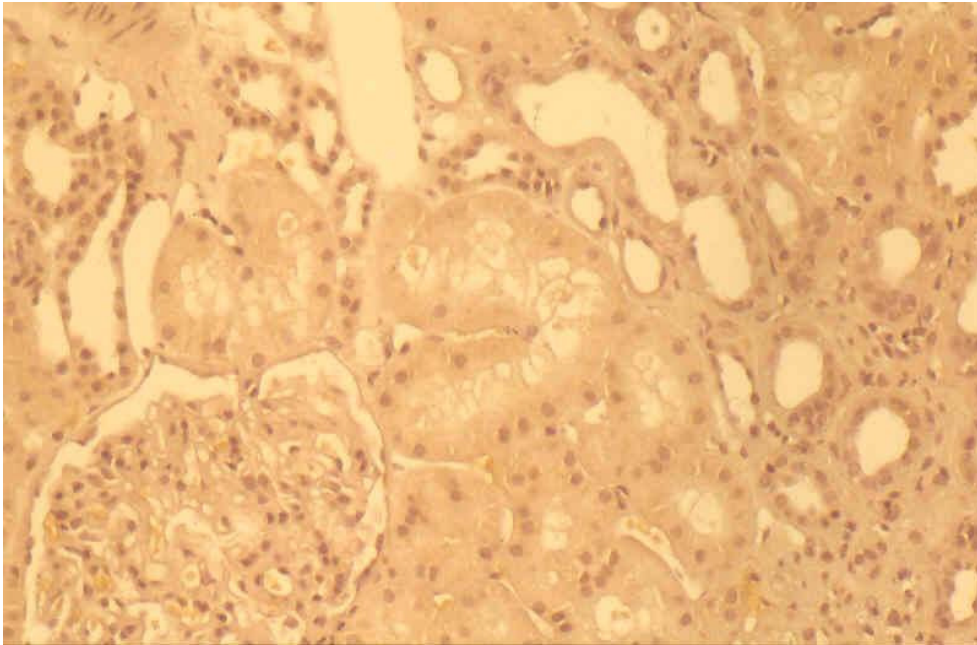


Abb. 17 IgA-Nephritis (DAB, Hämalan).

3.2.4 Laborparameter und Korrelation mit CRP-Signalstärke

Die Patienten der Gruppe mit leichter diabetischer Nephropathie hatten ein mittleres Alter von 55 (± 12) Jahren und einen mittleren BMI von 23,5 ($\pm 3,8$) kg/m². Die durchschnittliche Proteinurie in dieser Gruppe betrug 4,9 ($\pm 7,1$) g/d. Auffällig in dieser Gruppe ist ein Patient mit einer Proteinurie von 25,1 g/d, der die hohe Standardabweichung bedingt. Das CRP im Serum betrug 1,3 ($\pm 2,0$) mg/dl. Die durchschnittliche CRP-Signalstärke dieser Gruppe lag unter 1 (0,8 \pm 0,9). Die einzelnen Patienten sind in Tabelle 1 aufgeführt.

Das Durchschnittsalter der Patienten der zweiten Gruppe (mittelgradige diabetische Nephropathie) lag bei 61 (± 11) Jahren, der BMI bei 30,4 ($\pm 5,1$) kg/m². Die mittlere Proteinurie betrug in dieser Gruppe 3,5 ($\pm 1,6$) g/d. Der mittlere Serumwert für das CRP lag bei 1,4 ($\pm 1,0$) mg/dl. In den Biopsien fand sich ein durchschnittliches CRP-Signal von 1,9 ($\pm 1,0$) (siehe Tab. 2).

In der Gruppe mit schweren histologischen Veränderungen lag das Durchschnittsalter bei 66 (± 6) Jahren, der mittlere BMI bei 28,2 ($\pm 0,8$) kg/m².

Für die durchschnittliche Proteinurie ergaben sich Werte von 5,8 (\pm 4,0) g/d, für das Serum-CRP ein Wert von 4,5 (\pm 3,0) mg/dl. Das gemittelte CRP-Signal in dieser Gruppe lag bei 2,8 (\pm 0,4). Damit hatte diese Gruppe die höchsten Serum-CRP-Werte und das stärkste Signal, allerdings lag nur eine sehr geringe Gruppengröße vor (siehe Tab. 3).

Signifikante Unterschiede (Multiple Mittelwertvergleiche nach Bonferroni) ergaben sich für die Signalstärke des Clone 8 zwischen Gruppe 1 und 2 ($p < 0,035$) und zwischen Gruppe 1 und 3 ($p < 0,005$). Für den Creatininwert lag zwischen Gruppe 1 und 2 ein signifikanter Unterschied vor ($p < 0,035$). In der Varianzanalyse (One Way ANOVA) ergaben sich signifikante Mittelwertunterschiede zwischen den Gruppen für die Signalstärke ($p < 0,003$).

Pat.	Gesch.	Alter [J]	Gewicht [kg]	Größe [cm]	BMI [kg/m ²]	Prot. [g/d]	UCC [ml/min]	CREA [mg/dl]	BUN [mg/dl]	ALB [g/dl]	TP [g/dl]	CRP [mg/dl]	Signal
BF	m	45	64	180	19,8	2,0	73	1,8	30	2,7	5,7	0,4	0,5
EW	m	61	86	176	27,9	4,6	104	1,0	15	2,8	5,7	0,6	3
EH	w	31	78	169	27,3	4,4	71	1,0	32	3,1	5,7	0,3	1
HC	w	34	57	156	23,4	n.v.	52	1,6	34	3,9	6,5	0,1	0
KA	m	63	91	175	29,9	25,1	73	1,5	34	2,4	5,3	0,3	0,5
KH	m	70	74	178	23,4	0,6	8	4,3	50	3,6	6,4	2,9	0
KM	m	56	67	181	20,5	7,2	91	0,9	23	3,4	6,3	0,9	0,5
RL	w	62	45	168	15,9	0,1	8	4,2	96	4,3	2,3	0,3	0
SW	m	64	68	168	24,1	0,2	n.v.	1,8	36	4,5	8,1	n.v.	0
TG	m	52	74	181	22,6	4,5	43	1,6	19	2,8	5,5	0,6	1
WB	w	62	60	158	24,2	0,1	100	1,0	20	3,5	n.v.	6,7	2
Mean		55	70	172	23,5	4,9	62	1,9	35	3,4	5,8	1,3	0,8
SD		12	13	8	3,8	7,1	33	1,2	21	0,6	1,4	2,0	0,9

Tab. 1 Parameter der Patienten mit leichter diabetischer Nephropathie. (Pat.: Patient; Gesch.: Geschlecht; BMI: body mass index; Prot.: Proteinurie; UCC: Clearance; CREA: Creatinin; BUN: Harnstoff; ALB: Albumin; TP: Gesamteiweiß; CRP: C-reaktives Protein; Signal: Signalstärke in der Immunhistochemie; Mean: Mittelwert; SD: Standardabweichung; n.v.: Daten nicht vorhanden).

Pat.	Gesch.	Alter [J]	Gewicht [kg]	Größe [cm]	BMI [kg/m ²]	Prot. [g/d]	UCC [ml/min]	CREA [mg/dl]	BUN [mg/dl]	ALB [g/dl]	TP [g/dl]	CRP [mg/dl]	Signal
BW	m	64	n.v.	n.v.	n.v.	3,5	n.v.	1,8	27	4,1	7,3	0,1	n.b.
DA	w	62	89	160	34,8	4,0	13	2,8	43	3,4	6,4	n.v.	2
KH	m	54	115	173	38,4	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.	0,5
MC	w	35	65	168	23,0	0,5	n.v.	10,3	100	3,4	5,9	1,0	3
MO	m	60	94	172	31,8	4,7	10	6,6	73	3,3	6,5	2,3	3
PA	w	56	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.	9	4,5	53	n.v.	5,6	n.v.	2,5
RP	w	72	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.	2,5
RK	m	74	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.	2
SK	w	67	75	165	27,5	2,7	91	0,9	23	3,5	6,7	0,7	2
SF	m	66	80	172	27,0	5,5	11	5,7	155	3,4	6,1	2,8	0
Mean		61	86	168	30,4	3,5	27	4,7	68	3,5	6,4	1,4	1,9
SD		11	16	5	5,1	1,6	32	3,0	43	0,3	0,5	1,0	1,0

Tab. 2 Parameter der Patienten mit mittelgradiger diabetischer Nephropathie. (Pat.: Patient; Gesch.: Geschlecht; BMI: body mass index; Prot.: Proteinurie; UCC: Clearance; CREA: Creatinin; BUN: Harnstoff; ALB: Albumin; TP: Gesamteiweiß; CRP: C-reaktives Protein; Signal: Signalstärke in der Immunhistochemie; Mean: Mittelwert; SD: Standardabweichung; n.b.: nicht beurteilbar; n.v.: Daten nicht vorhanden).

Pat.	Gesch.	Alter [J]	Gewicht [kg]	Größe [cm]	BMI [kg/m ²]	Prot. [g/d]	UCC [ml/min]	CREA [mg/dl]	BUN [mg/dl]	ALB [g/dl]	TP [g/dl]	CRP [mg/dl]	Signal
HH	m	62	87	178	27,5	9,1	n.v.	2,9	46	2,4	6,1	3,5	2
HL	w	70	n.v.	n.v.	n.v.	0,2	n.v.	4,9	127	3,2	7,3	8,5	3
KA	m	74	77	163	29,0	8,0	32	2,6	41	3,1	n.v.	1,5	3
KR	w	59	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.	4,0	56	n.v.	n.v.	n.v.	3
Mean		66	82	171	28,2	5,8	---	3,6	67	2,9	6,7	4,5	2,8
SD		6	5	8	0,8	4,0	---	0,9	35	0,4	0,6	3,0	0,4

Tab. 3 Parameter der Patienten mit schwerer diabetischer Nephropathie. (Pat.: Patient; Gesch.: Geschlecht; BMI: body mass index; Prot.: Proteinurie; UCC: Clearance; CREA: Creatinin; BUN: Harnstoff; ALB: Albumin; TP: Gesamteiweiß; CRP: C-reaktives Protein; Signal: Signalstärke in der Immunhistochemie; Mean: Mittelwert; SD: Standardabweichung; n.v.: Daten nicht vorhanden).

Die Patienten mit meist fortgeschrittener Niereninsuffizienz durch eine IgA-Nephritis hatten ein durchschnittliches Alter von 49 (\pm 18) Jahren bei einem BMI von 25,6 (\pm 1,4) kg/m². Die Werte für Proteinurie und Serum-CRP lagen in dieser Gruppe bei 3,9 (\pm 2,3) g/d bzw. 3,9 (\pm 1,6) mg/dl. Der gemittelte Wert für das CRP-Signal war mit 0,3 (\pm 0,4) der niedrigste der vier Gruppen (siehe Tab. 4).

Pat.	Gesch.	Alter [J]	Gewicht [kg]	Größe [cm]	BMI [kg/m ²]	Prot. [g/d]	UCC [ml/min]	CREA [mg/dl]	BUN [mg/dl]	ALB [g/dl]	TP [g/dl]	CRP [mg/dl]	Signal
BH	m	69	71	162	27,0	3,8	97	0,9	19	4,0	7,6	n.v.	1
BM	m	34	95	n.v.	n.v.	2,5	105	1,5	20	4,0	7,0	6,1	0,5
GB	w	43	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.	0
HA	w	73	n.v.	n.v.	n.v.	3,1	19	4,0	37	3,2	6,5	2,9	0
HM	m	24	n.v.	n.v.	n.v.	1,8	116	1,0	9	3,8	n.v.	n.v.	0
PH	m	50	80	182	24,2	8,3	14	8,3	94	3,3	6,5	2,5	0
Mean		49	82	172	25,6	3,9	70	3,1	36	3,7	6,9	3,9	0,3
SD		18	10	10	1,4	2,3	44	2,8	30	0,3	0,5	1,6	0,4

Tab. 4 Parameter der Patienten mit IgA-Nephritis. (Pat.: Patient; Gesch.: Geschlecht; BMI: body mass index; Prot.: Proteinurie; UCC: Clearance; CREA: Creatinin; BUN: Harnstoff; ALB: Albumin; TP: Gesamteiweiß; CRP: C-reaktives Protein; Signal: Signalstärke in der Immunhistochemie; Mean: Mittelwert; SD: Standardabweichung; n.v.: Daten nicht vorhanden).

Die gesunden Patienten hatten ein durchschnittliches Alter von 20 (\pm 7) Jahren. Leider waren bei vielen Patienten Gewicht, Körpergröße, BMI und Proteinurie nicht mehr verfügbar. Der Serum-CRP-Wert lag im Mittel bei 0,3 (\pm 0,1) mg/dl, es war immunhistochemisch kein CRP in den Nieren nachweisbar (siehe Tab. 5).

Pat.	Gesch.	Alter [J]	Gewicht [kg]	Größe [cm]	BMI [kg/m ²]	Prot. [g/d]	UCC [ml/min]	CREA [mg/dl]	BUN [mg/dl]	ALB [g/dl]	TP [g/dl]	CRP [mg/dl]	Signal
BB	m	12	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.	0,6	9	4,3	7,1	0,1	0
BD	w	30	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.	155	0,8	11	n.v.	7,1	0,4	0
EJ	m	16	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.	140	0,8	12	4,9	6,9	0,4	0
SB	w	23	55,0	168	19,5	n.v.	n.v.	1,0	11	5,5	7,6	0,3	0
Mean		20	---	---	---	n.b.	148	0,8	11	4,9	7,2	0,3	0,0
SD		7	---	---	---	n.b.	8	0,1	1	0,5	0,3	0,1	0,0

Tab. 5 Parameter der gesunden Patienten (Pat.: Patient; Gesch.: Geschlecht; BMI: body mass index; Prot.: Proteinurie; UCC: Clearance; CREA: Creatinin; BUN: Harnstoff; ALB: Albumin; TP: Gesamteiweiß; CRP: C-reaktives Protein; Signal: Signalstärke in der Immunhistochemie; Mean: Mittelwert; SD: Standardabweichung; n.b.: nicht berechenbar; n.v.: Daten nicht vorhanden).

Bei den Patienten mit diabetischer Nephropathie bestand ein direkter Zusammenhang zwischen dem Grad der interstitiellen Fibrose und der CRP-Signalstärke in den Biopsien. Je stärker die Fibrose war, desto stärker war auch das CRP-Signal (Abb. 18). In der bivariaten Korrelation nach Pearson ergab sich für die zwei Größen ein Korrelationskoeffizient von $r = 0.648$ bei einer Signifikanz von $p < 0.001$.

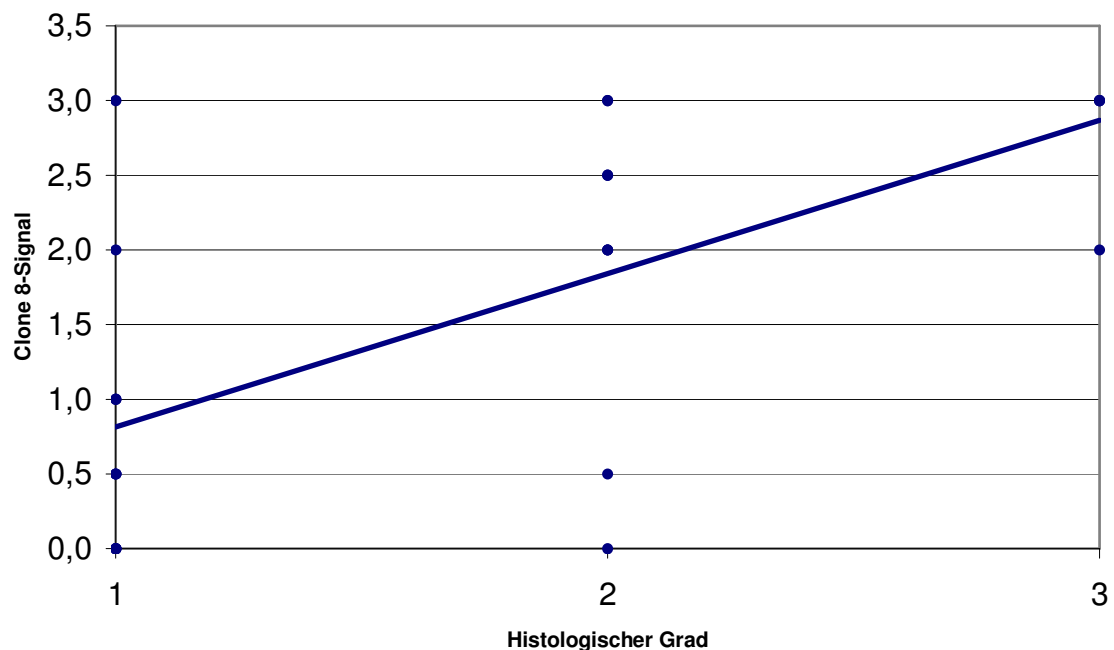


Abb. 18 Zusammenhang zwischen dem Grad der histologischen Veränderung und der Stärke des CRP-Signals.

Keinerlei Zusammenhang war zwischen der Proteinurie und den histologischen Veränderungen erkennbar (Abb. 19). Patienten mit leichter diabetischer Nephropathie hatten teilweise eine sehr hohe Proteinurie, während andere aus der Gruppe mit diabetischen Veränderungen des Grades III eine sehr geringe Proteinurie aufwiesen. Ebenso ergab sich keine Korrelation zwischen der Proteinurie oder dem Serum-CRP-Spiegel und der Stärke des CRP-Signals. Auch in den Schnitten mit IgA-Nephritis, die alle mit hoher Proteinurie einhergingen, war kein oder nur ein sehr schwaches CRP-Signal ($0,3 \pm 0,4$) zu erkennen (Abb. 20).

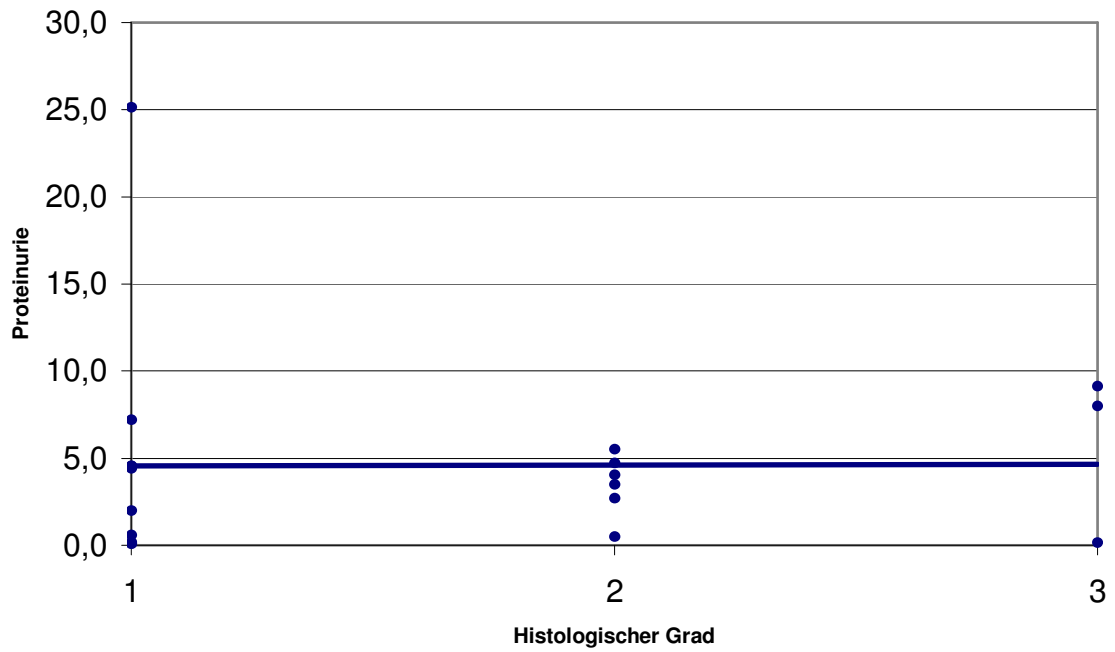


Abb. 19 Zusammenhang zwischen dem Grad der histologischen Veränderungen und der Proteinurie.

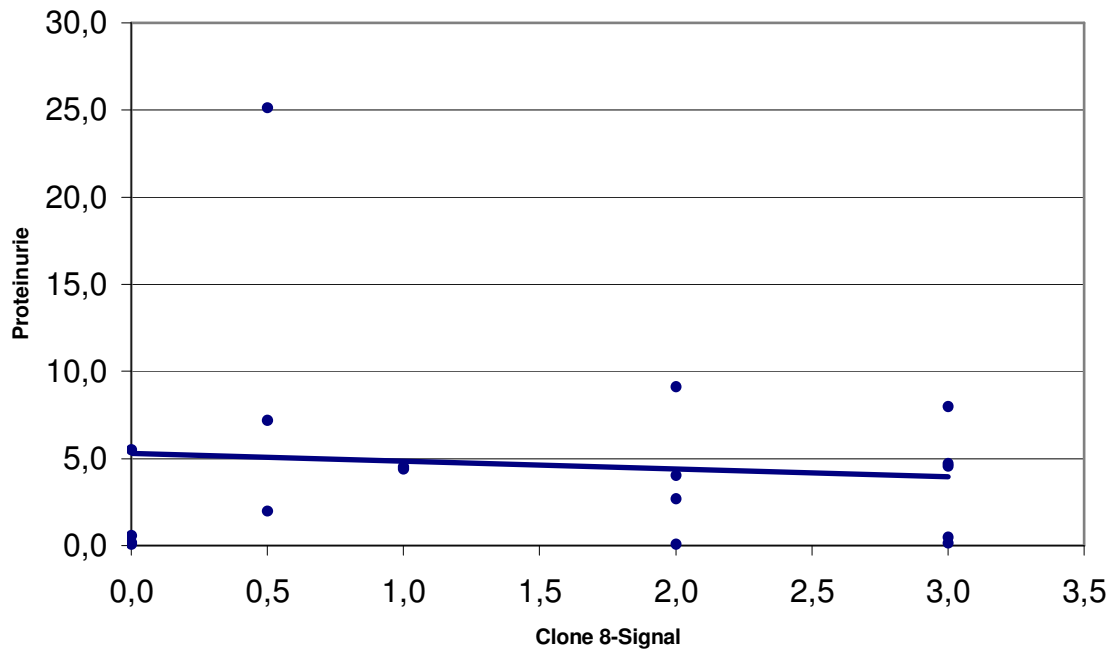


Abb. 20 Zusammenhang zwischen der Stärke des CRP-Signals und der Proteinurie.

Wie erwartet, kann man aus den Werten vermuten, dass zwischen dem histologischen Grad und dem Creatininwert im Serum eine direkte Korrelation besteht ($r = 0,398$, $p < 0,067$). Mit zunehmender Fibrose nahm auch die Clearance-Leistung der Nieren ab. Es bestand somit ein negativer Zusammenhang ($r = -0,423$, $p < 0,1$) (Abb. 21).

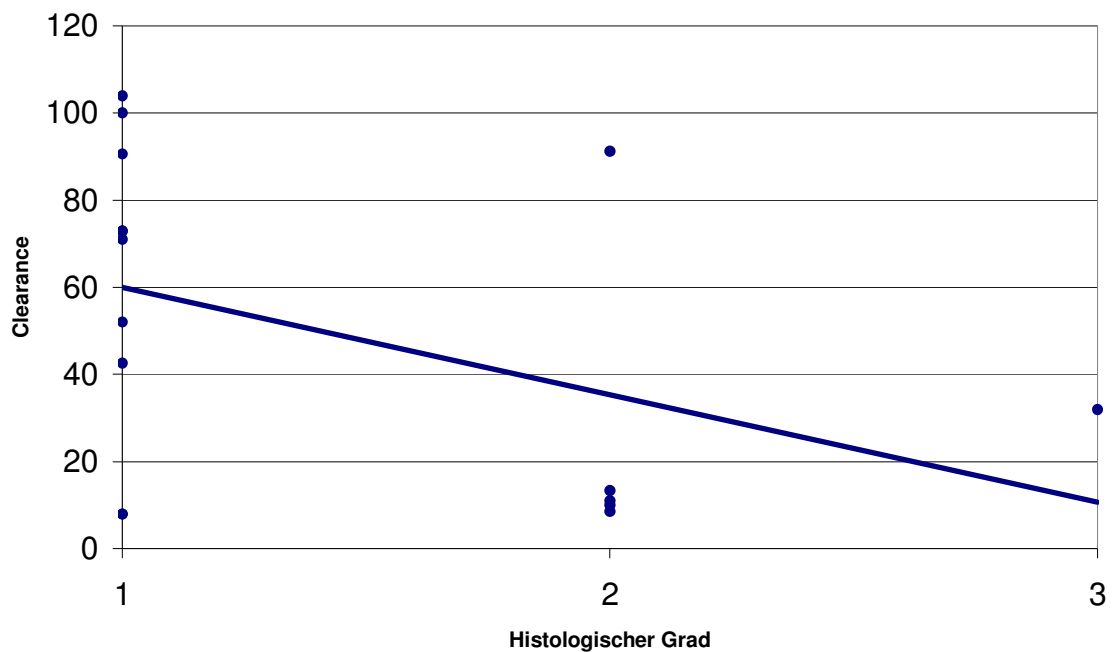


Abb. 21 Zusammenhang zwischen dem Grad der histologischen Veränderungen und der Clearance-Leistung.

4. Diskussion

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden die Methoden der PCR, des Western Blots und der Immunpräzipitation zum CRP-Nachweis in der Zellkultur etabliert. In der PCR konnte CRP zwar klar nachgewiesen werden, es war aber keine eindeutige Zu- oder Abnahme zu erkennen. Beim Nachweis auf Proteinebene mittels Westernblot waren allenfalls geringe Mengen an CRP zu detektieren, obwohl mehrere Zelllinien und Stimulationsbedingungen eingesetzt wurden. Trotz vorangeschalteter Immunpräzipitation und der damit verbundenen Sensitivitätssteigerung des CRP-Nachweises gelang es nicht, eine deutliche CRP-Bande darzustellen. Leider gab es für diese Ergebnisse keine Erklärung, da alle Versuchsbedingungen direkt der Literatur entnommen worden waren. Nachdem die Basis für weitere Versuche mit diesem experimentellen Ansatz nicht gegeben schien, wurde beschlossen, ein anderes Verfahren des Proteinnachweises sowie anderes Gewebe (humane diabetische Nierenschnitte) zu wählen.

Immunhistochemisch konnten signifikante Korrelationen zwischen dem Schweregrad der histologischen Veränderungen bei der diabetischen Nephropathie und der Signalstärke des clone 8 in den Tubuli festgestellt werden. Mit steigender Schwere der histologischen Veränderungen nahm die Signalstärke des clone 8 zu. Es bestand kein Zusammenhang zwischen Proteinurie und histologischem Schweregrad bzw. zwischen Proteinurie und Signalstärke des clone 8. Ebenso war keine Korrelation zwischen dem Serum-CRP-Wert und der Signalstärke des clone 8 vorhanden. Die Patienten mit einer IgA-Nephritis wiesen trotz einer hohen Proteinurie kein oder nur ein sehr schwaches CRP-Signal in den Tubuli auf. In den Nierenbiopsien der gesunden Personen konnte kein CRP-Signal beobachtet werden.

Die Rolle, die das CRP in der Niere spielt, ist nach wie vor unklar. Ob es eher krankheitshemmende oder -fördernde Wirkung hat, ist Gegenstand aktueller Forschung. Der Nachweis von CRP in der Niere lässt die Vermutung zu, dass ihm eine pathophysiologische Rolle zukommt. Andererseits wäre es auch denkbar, dass sich CRP im Gewebe befindet, um einen Schaden einzudämmen

und die lokale Homöostase wieder herzustellen. Leider existiert bisher kein Knock-Out-Modell, das zeigen könnte, ob ein Organismus ohne CRP lebensfähig wäre.

Für eine protektive Rolle des CRP spricht eine Arbeit von Szalai et al.³², die zeigen konnte, dass transgene Mäuse, die humanes CRP produzierten und die mit *S. pneumoniae* infiziert wurden, länger überlebten als nicht-transgene Tiere. Das gleiche traf auch für eine Infektion mit *Salmonella enterica* zu.³³ Die gleiche Gruppe konnte zeigen, dass sich CRP und Komplementsystem bei der Abwehr von *S. pneumoniae* Pathogenen gegenseitig verstärkten.³⁴ Andere Arbeiten konnten belegen, dass CRP die Adhäsion von Neutrophilen an Endothelzellen verhindern und somit die Entzündungsreaktion limitieren konnte.¹⁴ Außerdem verstärkte CRP die Phagozytose von apoptotischen Zellen durch Makrophagen.³⁵ Die Arbeiten unterstreichen Aufgaben des CRP, die in der Abwehr körperfremder Antigene, in der Regulation der Entzündungsreaktion und in der Steigerung der Beseitigung von apoptotischen und nekrotischen Zellen liegen.³⁶

Auf der anderen Seite gibt es viele Arbeiten, die einen schädigenden Effekt von CRP nachweisen. So konnte gezeigt werden, dass CRP eine gesteigerte Synthese des prokoagulatorischen Gewebefaktors durch Monozyten bewirkt und somit die Thromboseneigung verstärkt.¹⁷ Eine weitere proinflammatorische Wirkung durch CRP wird über die Bildung von löslichem Interleukin 6-Rezeptor (sIL-6R) vermittelt.³⁷ CRP bewirkte eine gesteigerte Produktion von sIL-6R, der IL-6 bindet. Der sIL-6R/IL-6 Komplex kann Herzhypertrophie und Zellproliferation induzieren und die proinflammatorische Stimulation von Endothelzellen verstärken.

Ergebnisse klinischer Studien legen ebenfalls nahe, dass CRP als schädigender Faktor anzusehen ist. Der Serum-CRP-Spiegel wird als starker Prädiktor für die kardiovaskuläre und Gesamtmortalität bei Dialysepatienten angesehen.⁴ Auch bei gesunden Menschen korreliert der CRP-Spiegel mit dem zukünftigen Risiko, einen Myokardinfarkt oder einen Schlaganfall zu erleiden oder an einer pAVK zu erkranken.^{5,7}

Ein Erklärungsansatz für die konträren Beobachtungen könnte eine Analyse des untersuchten CRP sein. Hat man noch vor wenigen Jahren der Existenz der zwei Konfigurationen, mCRP und nCRP, keine größere Bedeutung beigemessen, werden die unterschiedlichen Wirkungen der monomeren und pentameren Form zunehmend untersucht. Zouki et al.³⁸ haben 2001 einige Unterschiede herausgearbeitet. Sowohl mCRP als auch nCRP reduzieren die Expression von L-Selectin auf der Oberfläche von Neutrophilen, wobei nur mCRP die Expression von CD11b/CD18 auf Neutrophilen hochreguliert und nur mCRP die Adhäsion von Neutrophilen an humane Koronararterienendothelzellen verstärkt. Nur mCRP wirkt bei der Signalübertragung über Ras/Raf-1/MEK/Erk.

Auch im Bereich der Tumorbilogie konnte ein positiver Effekt von CRP gezeigt werden. Bei Mäusen mit Adenokarzinomen konnte durch die Behandlung mit mCRP das Voranschreiten des Tumorwachstums verlangsamt oder gestoppt werden. Teilweise kam es sogar zu einem Rückgang der Tumormasse.³⁹ Ob mCRP somit therapeutisch genutzt werden kann, wird weiter geklärt werden müssen.

Prinzipiell könnte man die Aussage treffen, dass dem mCRP eher proinflammatorische Wirkungen zukommen, während nCRP eher antiinflammatorisch wirkt.

Es hat sich gezeigt, dass das pentamere CRP-Molekül bei langer Aufbewahrung in der Abwesenheit von Calcium spontan zur monomeren Form konvertiert.³⁸ Es ist zu vermuten, dass in früheren Studien in CRP-Proben auch monomeres CRP vorhanden war. Des Weiteren muss man sich fragen, welches CRP im Gewebe immunhistochemisch nachgewiesen wurde.

Die Problematik der Unterscheidung der beiden CRP-Formen ergibt sich aber nicht nur durch die eventuelle Dissoziation von nCRP zu mCRP. Auch die zur Immunhistochemie verwendeten Antikörper könnten durch verschiedene Affinitäten zu mCRP oder zu nCRP die Deutung der Ergebnisse beeinflussen. Dieses Problem ergab sich bei dieser Arbeit mit dem Anti-CRP-Antikörper clone 8 der Firma Sigma. Laut Herstellerangaben erkennt dieser Antikörper ein Epitop auf der 23 kD-Untereinheit des CRP-Moleküls. Der Antikörper müsste

demnach in der Lage sein, sowohl mCRP als auch nCRP zu erkennen. Beobachtungen von Prof. D. Vaith aus Freiburg (briefliche Mitteilung) ließen Zweifel an der Richtigkeit der Produktbeschreibung aufkommen. Eine von Dr. Potempa durchgeführte Reaktivitätsbestimmung mit clone 8 ergab schließlich, dass dieser Antikörper in erster Linie mCRP erkennt und kaum nCRP. Bei einer Verdünnung von 1:10.000 war die Absorption für mCRP ca. 20mal höher als für nCRP. Das heißt, dass auch in der vorliegenden Arbeit in erster Linie mCRP nachgewiesen wurde. Dieser Sachverhalt ist auch bei der Interpretation früherer Studien zu berücksichtigen.

Will man dem CRP in diesem Zusammenhang eine Rolle zukommen lassen, kommen dafür drei Möglichkeiten in Betracht. 1.) CRP ist bei der diabetischen Nephropathie in einen Prozess integriert, der die Schädigung der Niere bewirkt und vorantreibt. 2.) CRP reichert sich in der Niere an, um Defekte, an deren Verursachungen es nicht beteiligt ist, einzudämmen oder zu beheben. 3.) CRP spielt bei der Entwicklung der diabetischen Nephropathie keine kausale Rolle und fungiert, wenn gemessen, nur als Marker für das Stadium und das Fortschreiten der Erkrankung.

In der vorliegenden Arbeit ergaben sich beim Vergleich der Färbungen der IgA-Nephritiden und der diabetischen Präparate Unterschiede. Der wichtigste in diesem Zusammenhang war, dass die Patienten mit IgA-Nephritis trotz annähernd gleich hoher Proteinurie so gut wie kein CRP-Signal in den Tubuli aufwiesen. Bei der IgA-Nephritis sind die Tubuli allerdings auch kaum von einer Veränderung während des Krankheitsprozesses betroffen. Ganz im Gegensatz dazu stehen die Veränderungen bei der diabetischen Nephropathie. Hier kommt es zu einer Volumenzunahme der Tubulus-Epithelien und im Bereich der Tubuli zu einer gesteigerten Glukose-Rückresorption, es bilden sich Glycogenspeichernde Zellen, schließlich kommt es zu Basalmembranverdickung und Tubulusatrophie. Dieses unterschiedliche Befallmuster der Strukturen in der Niere könnte auf eine direkte schädigende Rolle des CRP hinweisen. Wenn aber die CRP-Ablagerungen in den Tubuli ein Nekrosephänomen sind, ist unklar, warum sich dieses CRP-Signal nur in den Tubuli befindet und nicht in den Glomerula, die beim Diabetes genauso wie die Tubuli einer massiven

Schädigung unterliegen. In einer Studie von Nakahara et al.⁴⁰ konnte in den Nieren von Kindern und Jugendlichen mit proliferativen und nicht-proliferativen Nierenerkrankungen CRP-Ablagerungen auch in den kapillaren Gefäßwänden der Glomerula und des Interstitiums gefunden werden. Allerdings waren die Patienten in der vorliegenden Arbeit von einer deutlicheren Proteinurie geprägt als bei Nakahara et al.

Die Konzentrierung des CRP-Signals auf die Tubuli könnte auch mit einem Reabsorptionsphänomen erklärt werden. Dagegen sprechen aber wiederum zwei Gründe. Zum einen bestand bei den Diabetikern keine Korrelation zwischen der Proteinurie und der Stärke des CRP-Signals, zum anderen war bei den IgA-Nephritiden, wie schon beschrieben, trotz starker Proteinurie kein CRP in den Tubuli nachweisbar.

Eine weitere Vermutung über die Rolle des CRP in der Niere lässt sich auf der Basis der Arbeit von Lögering et al.⁴¹ formulieren, die gezeigt hat, dass renale Tubuluszellen membrangebundenes CRP produzieren können. Die gleiche Gruppe konnte auch nachweisen, dass bei einer Nierentransplantatabstoßung CRP im Urin erscheint, unabhängig vom CRP-Spiegel im Serum.⁴² Auch konnte im Rahmen der vorliegenden Arbeit keine Korrelation zwischen dem Serum-CRP und dem CRP-Signal im Gewebe festgestellt werden. Es könnte also vermutet werden, dass CRP reparative Aufgaben übernimmt und lokal gebildet wird.

Die endgültige Aufklärung der Funktion und Funktionsweise des CRP bedarf weiterer Forschung. Allerdings kann der Nachweis von CRP in den Tubuli jetzt schon wichtige Hinweise auf das Stadium der diabetischen Nephropathie geben. Wenn die Fallzahlen in dieser Arbeit auch gering waren, so kann man auf der Basis der Untersuchungen dennoch vermuten, dass ein Zusammenhang zwischen der Stärke des CRP-Signals in den Tubuli und den histologischen Veränderungen respektive dem Stadium der Krankheit besteht. Der immunhistochemische Nachweis von CRP in der Niere ist also ein weiterer Parameter für die Progression der diabetischen Nephropathie.

5. Zusammenfassung

CRP hat in den letzten Jahren durch seine prädiktiven Eigenschaften und durch das vermehrte Interesse an Inflammation immer mehr an Relevanz gewonnen. Obwohl das Vorhandensein von zwei verschiedenen Konformationen seit längerem bekannt ist, wurde erst in den letzten Jahren den unterschiedlichen Funktionen des mCRP und nCRP Aufmerksamkeit geschenkt. Ziel dieser Arbeit war es herauszufinden, welche Faktoren zu einer gesteigerten hepatischen Synthese von CRP führen, welche Relevanz CRP in der Niere von Diabetikern einnimmt, und ob es möglich ist, eine Unterscheidung zwischen mCRP und nCRP zu treffen. Die Synthese von CRP durch Hepatozyten sollte im Zellkulturexperiment nachgewiesen werden. Als Nachweisverfahren dienten die RT-PCR und der Westernblot. Trotz Variation in den Stimulationsbedingungen konnte keine CRP-Bildung nachgewiesen werden. Um die Rolle des CRP in der Niere zu überprüfen, wurden insgesamt 25 Nierenbiopsien von Diabetikern immunhistochemisch gefärbt. Dabei ergab sich eine eindeutige Korrelation zwischen dem Grad der histologischen Veränderung und der CRP-Signalstärke. Allerdings ergaben die Werte der untersuchten Nieren doch einen sehr deutlichen Hinweis darauf, dass CRP in der Niere als Progressionsfaktor für die diabetische Nephropathie herangezogen werden kann. Bezüglich des dritten Ziels dieser Arbeit ergab die Charakterisierung des Clone 8-Antikörpers, dass er entgegen den Herstellerangaben fast ausschließlich mCRP erkennt. Ob das Signal in den Tubuli aber ausschließlich auf einer Ablagerung von mCRP beruht oder ob nur das mCRP erkannt wurde, konnte diese Arbeit nicht klären. Es konnten aber Vermutungen erhärtet werden, die von einer in situ Bildung von CRP in den Tubuli ausgehen.

6. Literaturverzeichnis

- ¹ Tillet WS, Francis T Jr (1930) Serological reactions in pneumonia with a nonprotein somatic fraction of pneumococcus.
J Exp Med 52: 561
- ² Kaplan MH, Volanakis JE (1974) Interaction of C-reactive protein complexes with the complement system. I. Consumption of human complement associated with the reaction of C-reactive protein with pneumococcal C-polysaccharide and with the choline phosphatides, lecithin and sphingomyelin.
J Immunol 112: 2135-2147
- ³ Agrawal A, Kilpatrick JM, Volanakis JE (1993)
In: Mackiewicz A, Kushner I, Baumann H: Acute Phase Proteins: Molecular Biology, Biochemistry, and Clinical Applications. CRC Press, Ann Arbor MI, 1993.
- ⁴ Zimmermann J, Herrlinger S, Pruy A, Metzger T, Wanner C (1999) Inflammation enhances cardiovascular risk and mortality in hemodialysis patients.
Kidney Int 55: 648-658
- ⁵ Ridker PM, Cushman M, Stampfer MJ, Tracy RP, Hennekens CH (1998) Plasma Concentration of C-Reactive Protein and Risk of Developing Peripheral Vascular Disease.
Circulation 97: 425-428
- ⁶ Gussekloo J, Schaap MCL, Frölich M, Blauw GJ, Westendorp RGJ (2000) C-Reactive Protein Is a Strong but Nonspecific Risk Factor of Fatal Stroke in Elderly Persons.
Arterioscler Thromb Vasc Biol 20: 1047-1051
- ⁷ Ridker PM, Cushman M, Stampfer MJ, Tracy RP, Hennekens CH (1997) Inflammation, aspirin, and the risk of cardiovascular disease in apparently healthy men.
N Engl J Med 336(14): 973-979
- ⁸ Emsley J, White HE, O'Hara BP, Oliva G, Srinivasan N, Tickle IJ, Blundell TL, Pepys MB, Wood SP (1994) Structure of pentameric human serum amyloid P component.
Nature 367: 338-345

-
- ⁹ Oliveira EB, Gotschlich EC, Liu TY (1979) Primary structure of human C-reactive protein. *J Biol Chem* 254: 489-502
- ¹⁰ Diehl EE, Haines GK 3rd, Radosevich JA, Potempa LA (2000) Immunohistochemical localization of modified C-reactive protein antigen in normal vascular tissue. *Am J Med Sci* 319(2): 79-83
- ¹¹ Marnell LL, Mold C, Volzer MA, Burlingame RW, Du Clos TW (1995) C-reactive protein binds to Fc gamma RI in transfected COS cells. *J Immunol* 155(4): 2185-2193
- ¹² Bharadwaj D, Stein MP, Volzer M, Mold C, Du Clos TW (1999) The major receptor for C-reactive protein on leukocytes is fcgamma receptor II. *J Exp Med* 190(4): 585-590
- ¹³ Torzewski M, Rist C, Mortensen RF, Zwaka TP, Bienek M, Waltenberger J, Koenig W, Schmitz G, Hombach V, Torzewski J (2000) C-Reactive Protein in the Arterial Intima. Role of C-Reactive Protein Receptor-Dependent Monocyte Recruitment in Atherogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 20: 2094-2099
- ¹⁴ Zouki C, Beauchamp M, Baron C, Filep JG (1997) Prevention on In Vitro Neutrophil Adhesion to Endothelial Cells through Shedding of L-Selectin by C-Reactive Protein and Peptides Derived from C-Reactive Protein. *J Clin Invest* 100(3): 522-529
- ¹⁵ Tebo JM, Mortensen RF (1991) Internalization and degradation of receptor bound C-reactive protein by U-937 cells: induction of H₂O₂ production and tumoricidal activity. *Biochim Biophys Acta* 1095(3): 210-216
- ¹⁶ Cermak J, Key NS, Bach RR, Balla J, Jacob HS, Vercellotti GM (1993) C-Reactive Protein Induces Human Peripheral Blood Monocytes to Synthesize Tissue Factor. *Blood* 82(2): 513-520
- ¹⁷ Ross R (1999) Atherosclerosis – An Inflammatory Disease. *N Eng J Med* 340: 115-126

-
- ¹⁸ Torzewski J, Torzewski M, Bowyer DE, Fröhlich M, Koenig W, Waltenberger J, Fitzsimmons C, Hombach V (1998) C-Reactive Protein Frequently Colocalizes With the Terminal Complement Complex in the Intima of Early Atherosclerotic Lesions of Human Coronary Arteries. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 18: 1386-1392
- ¹⁹ Zwaka TP, Hombach V, Torzewski J (2001) C-Reactive Protein-Mediated Low Density Lipoprotein Uptake by Macrophages. Implications for Atherosclerosis. *Circulation* 103: 1194-1197
- ²⁰ Pasceri V, Willerson JT, Yeh ET (2000) Direct proinflammatory effect of C-reactive protein on human endothelial cells. *Circulation* 102(18): 2165-2168
- ²¹ Pasceri V, Chang J, Willerson JT, Yeh ET (2001) Modulation of C-Reactive Protein-Mediated Monocyte Chemoattractant Protein-1 Induction in Human Endothelial Cells by Anti-Atherosclerosis Drugs. *Circulation* 103: 2531-2534
- ²² Lindner TH (2001) Molekulargenetik der diabetischen Nephropathie. *Spektrum der Nephrologie* 6/2001: 12-23
- ²³ The kidney: structure and function. By Bohle A, Gärtner H-V, Laberke H-G, Krück F. Stuttgart; New York: Schattauer, 1989. ISBN 3-7945-1154-9
- ²⁴ Miller K, Michael AF (1976) Immunopathology of renal extracellular membranes in diabetes mellitus. Specificity of tubular basement-membrane immunofluorescence. *Diabetes* 25(8): 701-708
- ²⁵ Goldman ND, Liu T-Y (1986) Biosynthesis of Human C-reactive Protein in Cultured Hepatoma Cells Is Induced by a Monocyte Factor(s) Other than Interleukin-1. *J Biol Chem* 262: 2363-2368
- ²⁶ Peten EP, Striker LJ, Carome MA, Elliott SJ, Yang CW, Striker GE (1992) The contribution of increased collagen synthesis to human glomerulosclerosis: a quantitative analysis of alpha 2IV collagen mRNA expression by competitive polymerase chain reaction. *J Exp Med* 176(6): 1571-1576

²⁷ Shields MJ, Siegel JN, Clark CR, Hines KK, Potempa LA, Gewurz H, Anderson B (1991) An appraisal of polystyrene-(ELISA) and nitrocellulose-based (ELIFA) enzyme immunoassay systems using monoclonal antibodies reactive toward antigenically distinct forms of human C-reactive protein.

J Immunol Methods 141(2):253-61

²⁸ Taylor, AW, Ku N, Mortensen RF (1990) Regulation of cytokine-induced human c-reactive protein production by transforming growth factor- β .

J Immunol 145: 2507-2513

²⁹ Steel DM, Whitehead, AS (1991) Heterogeneous modulation of acute-phase-reactant mRNA levels by interleukin-1 β and interleukin-6 in the human hepatoma cell line PLC/PRF/5.

Biochem J 277: 477-482

³⁰ Ying SC, Gewurz H, Kinoshita CM, Potempa LA, Siegel JN (1989) Identification and partial characterization of multiple native and neoantigenic epitopes of human C-reactive protein by using monoclonal antibodies.

J Immunol 143: 221-228

³¹ Bhakdi S, Torzewski M, Klouche M, Hemmes M (1999) Complement and Atherogenesis. Binding of CRP to Degraded, Nonoxidized LDL Enhances Complement Activation.

Arterioscler Thromb Vasc Biol 19: 2348-2354

³² Szalai AJ, Briles DE, Volanakis JE (1995) Human C-reactive protein is protective against fatal *Streptococcus pneumoniae* infection in transgenic mice.

J Immunol 155(5): 2557-2563

³³ Szalai AJ, VanCott JL, McGhee JR, Volanakis JE, Benjamin WH Jr. (2000) Human C-Ractive Protein Is Protective against Fatal *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium Infection in Transgenic Mice.

Infect Immun 68(10): 5652-5656

³⁴ Szalai AJ, Briles DE, Volanakis JE (1996) Role of Complement in C-Reactive-Protein-Mediated Protection of Mice from *Streptococcus pneumoniae*.

Infect Immun 64(11): 4850-4853

-
- ³⁵ Gershov D, Kim S, Brot N, Elkon KB (2000) C-Reactive protein binds to apoptotic cells, protects the cells from assembly of the terminal complement components, and sustains an antiinflammatory innate immune response: implications for systemic autoimmunity. *J Exp Med* 192(9): 1353-1364
- ³⁶ Volanakis JE (2001) Human C-Reactive Protein: Expression, Structure, and Function. *Mol Immunol* 38(2-3): 189-197
- ³⁷ Jones SA, Novick D, Horiuchi S, Yamamoto N, Szalai AJ, Fuller GM (1999) C-Reactive Protein: A Physiological Activator of Interleukin 6 Receptor Shedding. *J Exp Med* 189(3): 599-604
- ³⁸ Zouki C, Haas B, Chan JSD, Potempa LA, Filep JG (2001) Loss of Pentameric Symmetry of C-Reactive Protein Is Associated with Promotion of Neutrophil-Endothelial Cell Adhesion. *J Immunol* 167: 5355-5361
- ³⁹ Kresl JJ, Potempa LA, Anderson B, Radosevich JA (1999) Inhibition of mouse mammary adenocarcinoma (EMT6) growth and metastases in mice by a modified form of C-reactive protein. *Tumor Biol* 20(2): 72-87
- ⁴⁰ Nakahara C, Kanemoto K, Saito N, Oyake Y, Kamoda T, Nagata M, Matsui A. (2001) C-reactive protein frequently localizes in the kidney in glomerular diseases. *Clin Nephrol* 55(5): 365-70
- ⁴¹ Lögering BA, Jabs WJ, Kreft B, Steinhoff J (2001) Human Renal Tubular Cells Express Membrane-Bound C-Reactive Protein. *Kidney Blood Press Res* 24: 329
- ⁴² Steinhoff J, Einecke G, Niederstadt C, de Groot K, Fricke L, Machnik H, Sack K (1997) Renal graft rejection or urinary tract infection? The value of myeloperoxidase, C-reactive protein, and alpha2-macroglobulin in the urine. *Transplantation* 64(3): 443-447

Danksagung

Zum Gelingen dieser Arbeit haben viele Personen und einige ganz besonders beigetragen:

Ich danke Herrn Prof. Dr. Wanner für die Förderung meiner Arbeit und seine wertvollen Tipps.

Für die Übernahme des Koreferats und die gute Zusammenarbeit bedanke ich mich bei Herrn Prof. Dr. Dämmrich.

Ich möchte mich bei Frau Sabine Roth für die unkomplizierte Zusammenarbeit und die wertvollen Verbesserungsvorschläge bedanken.

Ganz besonders bin ich Frau Dr. Schwedler zu herzlichem Dank verpflichtet, die meine Arbeit während der letzten Jahre so herausragend betreut hat.

Ich bedanke mich außerdem bei den Mitarbeitern des Nephrologischen Labors und des Biozentrums für die technische und logistische Unterstützung und für deren Hilfsbereitschaft.

Lebenslauf

Name und Adresse: Frank Guderian, Nopitschstrasse 6a, 97074 Würzburg

Geburtsdatum und –ort: 06. September 1975 in Kempten (Allgäu)

Staatsangehörigkeit: deutsch

Familienstand: verheiratet

Schulischer Werdegang: 1982 – 1986 Grundschule Martinszell
1986 – 1995 Gymnasium Immenstadt
Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

Zivildienst: 1995 – 1996 Klinikum Kempten Oberallgäu, Chirurgischer OP

Studium: 1996 – 1998 Studium der Humanmedizin an der Universität Ulm
Physikum im Sommer 1998
1998 – 2003 Studium der Humanmedizin an der Julius-
Maximilians-Universität in Würzburg
1. Staatsexamen 31.08.1999
2. Staatsexamen 05.09.2002
3. Staatsexamen 19.11.2003

Promotionsthema: „Zellulärer und gewebsspezifischer Nachweis von C-reaktivem Protein.“

Famulaturen: - Allgemeinchirurgische Abteilung des Klinikums Kempten
- Dialysezentrum Würzburg
- Nephrologische Abteilung der Universität Würzburg
- Poliklinik für Kinder- und Jugendpsychiatrie der Universität Würzburg

Praktisches Jahr: 1. Tertial: Chirurgie im Juliusspital Würzburg
Würzburg 2. Tertial: Kinder- und Jugendpsychiatrie an der Universität
3. Tertial: Innere Medizin in der Medizinischen Poliklinik der
Universität Würzburg

Hilfskraft-/Mitarbeiter-
tätigkeiten: - 4 Monate im Chirurgischen OP, Klinikum Kempten
- 12 Monate im Dialysezentrum Würzburg
- 6 Monate im Nephrologischen Labor der Universität Würzburg



Frank Guderian